



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

**EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA ARC EN EL ESTRIADO Y EL HIPOCAMPO DE
RATAS SOMETIDAS A UN APRENDIZAJE INCREMENTADO Y LA POSIBLE
RELACIÓN CON LA LIBERACIÓN DE CORTICOSTERONA**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA

M. en C. DIEGO ALEXANDER GONZALEZ FRANCO

TUTORA

DRA. GINA LORENA QUIRARTE
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. PATRICIA ILEANA JOSEPH BRAVO
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

DRA MARIA TERESA MORALES GUZMÁN
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

CAMPUS UNAM-JURIQUILLA, QUERÉTARO, QRO.
OCTUBRE DE 2017



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.

Los miembros del Comité Tutor certificamos que la tesis elaborada por: Diego Alexander Gonzalez Franco, cuyo título es: “EXPRESIÓN DE LA PROTEINA ARC EN EL ESTRIADO Y EL HIPOCAMPO DE RATAS SOMETIDAS A UN APRENDIZAJE INCREMENTADO Y LA POSIBLE RELACIÓN CON LA LIBERACIÓN DE CORTICOSTERONA” se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biomédicas y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Dra. María Elvira Galarraga Palacio
Presidente

Dra. Gina Lorena Quirarte
Secretario (Tutor)

Dra. Martha Lilia Escobar Rodríguez
Vocal

Dr. Mauricio Díaz Muñoz
Vocal

Dr. Pavel Ernesto Rueda Orozco
Vocal

Aprobado por el Comité Académico

RESUMEN

El entrenamiento intenso, se refiere al entrenamiento mediado por experiencias emotivas, tales como el condicionamiento aversivo motivado por intensidades relativamente altas de choque eléctrico, que produce una memoria altamente resistente a la extinción. También se ha demostrado que el entrenamiento intenso protege a la consolidación de la memoria contra los efectos amnésicos de una amplia variedad de tratamientos farmacológicos, administrados de forma sistémica o directamente en las estructuras cerebrales. Sin embargo, los mecanismos que subyacen a este efecto protector son aún desconocidos. Para determinar un posible correlato neurobiológico del efecto protector del entrenamiento intenso, grupos independientes de ratas Wistar fueron entrenados en la tarea de evitación inhibitoria de un solo ensayo, utilizando diferentes intensidades de choque eléctrico (0.0, 0.5, 1.0 y 2.0 mA). Algunas ratas de cada grupo fueron sacrificadas 45 min después del entrenamiento, para la detección inmunohistoquímica de la proteína Arc en cada una de las regiones del estriado y el hipocampo; otras ratas fueron examinadas para la extinción de la conducta durante seis días consecutivos, comenzando 48 h después del entrenamiento. Los resultados mostraron que el entrenamiento con 1.0 y 2.0 mA produjeron una retención óptima, la cual, fue significativamente mayor que la obtenida al entrenar con 0.5 y 0.0 mA. Además, el grupo entrenado con 2.0 mA presentó una mayor resistencia a la extinción que los demás grupos. Por otro lado, el entrenamiento con 1.0 y 2.0 mA, indujo la expresión de la proteína Arc en un mayor número de neuronas, únicamente en el estriado ventral, pero no en el dorsal de ambos grupos; también se observó, una mayor área de señal de Arc en el grupo entrenado con el choque más alto. En contraste, en el hipocampo se observó un aumento en el número de neuronas que expresan la proteína Arc en los grupos 0.5 y 1.0 mA, únicamente en la región del giro dentado (GD), pero no así, en las demás regiones del hipocampo; presentando un área de señal de Arc mayor en el grupo entrenado con el choque más bajo. Además, también se observó un incremento en la liberación de corticosterona circulante producido únicamente por el choque eléctrico más alto. Concluimos que el cambio en la expresión de Arc inducido por el entrenamiento intenso podría estar vinculado a un proceso de eliminación de la interferencia competitiva entre los sistemas de memoria espacial y de hábitos, facilitando así el almacenamiento de la información como un hábito y no como un evento, lo que explicaría el aumento en la resistencia a la extinción de este tipo de entrenamientos.

ABSTRACT

Intense training refers to training mediated by emotionally arousing experiences, such as aversive conditioning motivated by relatively high intensities of foot-shock, which produces a strong memory that is highly resistant to extinction. Intense training protects memory consolidation against the amnesic effects of a wide variety of treatments, administered systemically or directly into brain structures. However, the mechanisms that underlie this protective effect are still unknown. To determine a potential neurobiological correlate of the protective effect of intense training, independent groups of Wistar rats were trained in a one-trial step-through inhibitory avoidance task using different intensities of foot-shock (0.0, 0.5, 1.0, and 2.0 mA). Some rats from each group were sacrificed 45 min after training for immunohistochemical Arc protein detection in the striatal and hippocampal regions; other rats were tested for extinction during six consecutive days, starting 48 h after training. The results showed that training with 1.0 and 2.0 mA produced optimal retention scores, which were significantly higher than those obtained with 0.5 and 0.0 mA. In addition, the group trained with 2.0 mA presented higher resistance to extinction than the other groups. On the other hand, training with 1.0 and 2.0 mA induced the expression of the Arc protein in a higher number of neurons in the ventral striatum, but not in the dorsal striatum of both groups; there was a larger Arc signal area in the group trained with the highest foot-shock. In contrast, in the hippocampus, there was an increase in the number of neurons expressing the Arc protein in the 0.5 and 1.0 mA groups, only in the dentate gyrus (GD) region, but not in the other regions of the hippocampus; showing a larger Arc signal area in the group trained with the lowest intensity. In addition, an increase in the circulating corticosterone release was induced only by the higher electrical foot-shock. We conclude that the change in Arc expression induced by intense training could be linked to a process of elimination of competitive interference between spatial and habit memory systems, thus facilitating the storage of information as a habit rather than as an event, which would explain the increase in the extinction resistance of this type of training.

DEDICATORIA

Quiero dedicar esta tesis a mi familia, a María Helena Franco Hernández, mi madre, quien desde antes de que pueda recordar, ha dado todo de sí para mi bienestar, me ha enseñado a levantarme sin importar cuan fuertes sean las dificultades a las que me enfrente y me ha dado su fuerza y apoyo incondicional para luchar por ser lo que siempre quise ser, un hombre de ciencia.

A Rodrigo González Tovar, mi padre, que toda la vida me ha dado un ejemplo de respeto y solidaridad, de quien aprendí que todo problema tiene más de una solución y que cuando es necesario, las herramientas más simples pueden solucionar un gran problema con un poco de imaginación e improvisación, gracias a él que siempre alimento mi vida con inventiva y curiosidad científica, las cuales al final hicieron lo que soy ahora y permitieron la realización de esta tesis.

A Fabián Andrés González Franco, mi hermano menor, una de mis mayores fuentes de motivación y orgullo, que todo mi esfuerzo sea uno de los ejemplos que le permitan luchar por sus sueños y llegar más allá de lo que cualquier persona pueda aspirar; ojalá que algún día este escrito pueda servirle como base en su camino por la ciencia.

A Paola Cristina Bello Medina, mi esposa, mi mejor amiga, mi colega, mi compañera de aventuras, el amor de mi vida, le dedico esta tesis porque sin su infinito apoyo que me ha brindado todos estos años, sin la paciencia incondicional que ha tenido conmigo, sin su ayuda desinteresada, sin sus enseñanzas y consejos esta tesis no hubiera podido existir Gracias por todos los momentos mágicos y científicos que hemos vivido todos estos años, por ser mi realidad y mi fantasía al mismo tiempo, por nunca haber soltado mi mano incluso cuando creí que no podría caminar más, por todas las cosas que mi cerebro no logra recordar, pero que ella sabe que de todas formas habitan mi corazón, por todo y mucho más simplemente gracias.

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** y al **Instituto de Neurobiología**, a todas las personas que hacen parte de esta enorme maquinaria de investigación les agradezco por permitirme demostrar mis capacidades y talentos, apoyando así a la producción y el crecimiento de la ciencia.

A la **Dra. Gina Lorena Quirarte** por permitirme desarrollar éste y otros proyectos de investigación, por sus invaluable consejos y tutoría, por todas las discusiones científicas, por abrirme un espacio todos estos años en su laboratorio y por apoyarme cada vez que lo necesité.

Al **Dr. Víctor Ramírez Amaya** por su orientación en la realización de este proyecto.

Al comité tutor, conformado por la **Dra. Patricia Joseph Bravo** y la **Dra. Teresa Morales**, por sus sugerencias y revisiones académicas que pulieron y moldearon este trabajo, así como por sus correcciones a este escrito que permitieron mejorarlo sustancialmente.

Al **Dr. Roberto Agustín Prado Alcalá** por sus revisiones y críticas constructivas al proyecto, en particular durante el escrito del artículo científico.

Al comité sinodal conformado por la **Dra. María Elvira Galarraga Palacio**, la **Dra. Martha Lilia Escobar Rodríguez**, el **Dr. Mauricio Díaz Muñoz** y el **Dr. Pavel Ernesto Rueda Orozco**, quienes por medio de sus revisiones colaboraron con la creación de este documento.

Al señor **Ángel Méndez**, la señora **Bertha Islas** y el señor **Cutberto Dorado** por su apoyo como técnicos laboratoristas, en el desarrollo de este y otros proyectos de investigación.

A los técnicos académicos, **la M.V.Z. Norma Serafín, la Dra. Andrea C. Medina y a el Dr. Carlos Lozano**, por su apoyo y por su colaboración técnica y administrativa, la cual fue indispensable para la culminación de esta etapa.

A todas las personas que son parte del **Doctorado en Ciencias Biomédicas**, ya que sin ustedes este posgrado no sería la gran opción para el desarrollo de la ciencia que es hoy en día.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por el apoyo financiero con la beca 333697 y el apoyo de investigación (Proyectos 251634, 130524 y 130802).

Al **Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT)** de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (Proyectos IN202414 y IN216510).

A la unidad de enseñanza y posgrado, particularmente a la **M. en C. Leonor Casanova Rico** por todo su apoyo y colaboración.

A las unidades de apoyo:

- **Biblioteca:** a el **Dr. Francisco J. Valles**, y la **Lic. Soledad Medina Malagón** por su gran labor manteniendo disponible el conocimiento cuando fue necesario.
- **Cómputo:** **Ing. Ramón Martínez Olvera, M. en C. Alberto Lara Rubalcava, Ing. Omar González y la Ing. Sandra Hernández García** por el constante apoyo con sus conocimientos en sistemas informáticos.
- **Videoconferencia:** a la **Lic. Ma. De Lourdes Lara Ayala** por su ayuda con todas y cada una de las videoconferencias tanto para los exámenes tutoriales como para las clases y conferencias a las que tuve el placer de asistir.
- **Bioterio:** al **M.V.Z. Martín García Servín** y a la **Dra. Alejandra Castilla León**, por su constante colaboración con el cuidado de animales para los proyectos realizados.
- **Microscopia:** a la **Ing. Elsa Nydia Hernández Ríos** por su invaluable ayuda,

comprensión y consejos que me brindo durante todos estos años de trabajo, los cuales permitieron que este proyecto terminara con éxito.

A todos mis amigos y compañeros de laboratorio, en especial a **Martha, Rafael, Cristina, Iván y Erika**, que, con sus críticas, consejos y enseñanzas durante todos estos años, me apoyaron no solo en la realización de este proyecto, sino que también me permitieron desarrollarme como investigador y como persona.

A mi padre, madre y hermano por su apoyo incondicional, por su fe y su confianza, por cada uno de los consejos, por todo el amor que me han dado desde que tengo memoria.

A mi esposa la **Dra. Paola Cristina Bello Medina**, por sus consejos académicos, por las largas horas de discusión sobre experimentos y sus resultados, por el apoyo técnico cuando mis dos manos no fueron suficientes, por siempre haber estado ahí desde hace 14 años, cuando juntos empezamos esta aventura de la ciencia.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	II
ABSTRACT.....	III
DEDICATORIA.....	IV
AGRADECIMIENTOS.....	V
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	3
1. APRENDIZAJE Y MEMORIA.....	3
1.1. Condicionamiento clásico.....	4
1.2. Condicionamiento instrumental.....	4
1.3. Clasificación de la memoria.....	5
2. EL APRENDIZAJE INCREMENTADO.....	8
3. EL ESTRIADO.....	13
3.1. Anatomía.....	14
3.1.1. Citoarquitectura.....	19
3.2. Participación del estriado en el aprendizaje y la memoria.....	21
3.2.1. Estudios por medio de lesiones.....	22
3.2.2. Heterogeneidad funcional del estriado.....	24
3.2.3. El estriado y la navegación espacial.....	27
4. EL HIPOCAMPO.....	28
4.1. Anatomía.....	28
4.2. Conectividad.....	40
4.3. Participación del hipocampo en el aprendizaje y la memoria.....	42
4.3.1. Teoría de la memoria declarativa.....	43
4.3.2. Teoría del mapa cognitivo.....	44
4.3.3. Teoría de la memoria episódica.....	45

5.	GENES DE EXPRESIÓN INMEDIATA TEMPRANA	46
6.	ARC COMO INDICADOR DE ACTIVIDAD	48
7.	EL ESTRÉS EN EL APRENDIZAJE Y LA MEMORIA.....	50
III.	PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	53
IV.	OBJETIVO GENERAL	53
V.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	53
VI.	HIPÓTESIS.....	54
VII.	MÉTODOS GENERALES	54
1.	Sujetos.....	54
2.	Manipulación.....	55
3.	Aparatos	55
4.	Análisis estadístico	56
4.1.	Datos conductuales	56
4.2.	Datos histológicos	57
VIII.	EXPERIMENTO 1: El entrenamiento de la tarea de evitación inhibitoria con choques eléctricos de alta intensidad produce un aprendizaje incrementado	57
1.	Entrenamiento y pruebas de extinción.....	57
2.	Resultados	58
IX.	EXPERIMENTO 2: El entrenamiento intenso en la tarea de evitación inhibitoria, incrementa la expresión de Arc en las regiones ventrales del estriado y el giro dentado del hipocampo.....	60
1.	Obtención y procesamiento de tejido.....	61
2.	Histología	62
3.	Análisis de imágenes	63
4.	Resultados histológicos del estriado	65
4.1.	Análisis de área de señal.....	65
4.2.	Conteo celular de las regiones ventrales del estriado.....	67
5.	Resultados histológicos del hipocampo	68

5.1. Análisis de área de señal.....	68
5.2. Conteo celular del giro dentado	70
X. EXPERIMENTO 3: El incremento de la concentración de corticosterona en sangre está relacionado con la intensidad del choque eléctrico y no con la intensidad del entrenamiento en la tarea de evitación inhibitoria	71
1. Medición de CORT por radioinmunoensayo	71
2. Resultados	71
XI. DISCUSIÓN.....	73
XII. PERSPECTIVAS	79
XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
XIV. ÍNDICE DE FIGURAS	108
XV. APENDICE 1: Artículo publicado, derivado de esta tesis	109

I. INTRODUCCIÓN

La información proveniente de diferentes experiencias, no siempre es almacenada o evocada, con la misma intensidad; es bien sabido que los eventos con carga emocional son más fáciles de recordar que las experiencias neutras. Se ha descrito que esta facilitación de la memoria es modulada por la liberación de las hormonas del estrés, las cuales interactúan con neurotransmisores modificando el proceso de consolidación (McGaugh, 2013; Schwabe, Joëls, Roozendaal, Wolf, & Oitzl, 2012).

Un modelo para estudiar este mejoramiento de la memoria inducido por experiencias emotivas, es el entrenamiento intenso, el cual puede darse por un incremento del número de ensayos o de sesiones de entrenamiento, que usualmente son utilizados para alcanzar cierto nivel de desempeño; de igual forma, cuando en condicionamientos aversivos, se utilizan intensidades relativamente altas de choque eléctrico (Prado-Alcalá, Medina, Serafín, & Quirarte, 2012).

El entrenamiento intenso se caracteriza principalmente por inducir una alta resistencia a la extinción (Bello-Medina, Flores, Quirarte, McGaugh, & Prado Alcalá, 2016; Garín-Aguilar et al., 2012; Prado-Alcalá, Haiek, Rivas, Roldán-Roldán, & Quirarte, 1994), así como en algunos casos, induce un efecto protector de la memoria contra una amplia variedad de tratamientos amnésicos, administrados tanto sistémicamente como directamente en estructuras cerebrales. Entre estos tratamientos se encuentran los bloqueadores de canales de sodio (Garín-Aguilar, Medina, Quirarte, McGaugh, & Prado-Alcalá, 2014; Salado-Castillo, Sánchez-Alavéz, Quirarte, Martínez García, & Prado-Alcalá, 2011), los inhibidores de síntesis de proteínas (Díaz-Trujillo et al., 2009) y los antagonistas a receptores de neurotransmisores (Cobos-Zapiaín et al., 1996; Durán-Arévalo, Cruz-Morales, & Prado-Alcalá, 1990; Solana-Figueroa, Salado-Castillo, Quirarte, Galindo, & Prado-Alcalá, 2002).

Son varias las estructuras que han sido estudiadas con el propósito de elucidar los mecanismo que subyacen al efecto protector inducido por el entrenamiento intenso, entre ellas se encuentran el hipocampo (Quiroz et al., 2003) y el estriado (Pérez-Ruíz & Prado-Alcalá, 1989; Prado-Alcalá & Cobos-Zapiaín, 1977). Las cuales han sido ampliamente vinculadas al procesamiento de información de la tarea de

evitación inhibitoria (Ambrogi-Lorenzini, Baldi, Bucherelli, Sacchetti, & Tassoni, 1999; Bammer, 1982; Izquierdo & Medina, 1993; Packard & Knowlton, 2002; Prado-Alcalá et al., 2006; Prado-Alcalá et al., 2012; Rossato et al., 2006).

Sin embargo, es poca la información obtenida hasta ahora sobre la activación neuronal de estas estructuras; así como de la respuesta al estrés. Es por eso, que el principal objetivo de este estudio es determinar si las diferentes intensidades de choque eléctrico, administradas durante el entrenamiento de ratas en la tarea de evitación inhibitoria, inducen un cambio en los patrones de activación neuronal en las diferentes regiones del estriado y el hipocampo.

Para cumplir con este objetivo, se midió, la expresión de la proteína Arc (por sus siglas en ingles Activity-regulated cytoskeletal associated protein, también conocido como Arg3.1) (Link et al., 1995; Lyford et al., 1995), en el estriado y el hipocampo. Este gen que pertenece al grupo de genes de expresión inmediata temprana, ha sido ampliamente utilizado como un indicador de activación neuronal y de cambios plásticos (Okuno, 2011). Por último, se midió la corticosterona circulante como un indicador del nivel de estrés que inducen las diferentes intensidades de choque eléctrico y observar si ésta tiene alguna relación con el entrenamiento intenso.

II. ANTECEDENTES

1. APRENDIZAJE Y MEMORIA

Por aprendizaje entendemos al proceso por el cual la experiencia produce cambios en el sistema nervioso que pueden ser duraderos y se manifiestan en el comportamiento. Estos cambios no son debidos a conductas innatas, maduración o estados transitorios del organismo como por ejemplo la fatiga o el efecto de drogas (Hilgard & Bower, 1987). Por otro lado, la memoria es un fenómeno o proceso generalmente inferido a partir de dichos cambios, el cual da a nuestras vidas un sentido de continuidad y consta de la codificación y el almacenamiento de la información, la cual queda disponible para su posterior reutilización (Morgado, 2005).

Según Aguado-Aguilar (2001), el aprendizaje y la memoria son dos procesos psicológicos íntimamente relacionados y puede decirse que constituyen, en realidad, dos momentos en la serie de procesos a través de los cuales los organismos manejan y elaboran la información proporcionada por los sentidos.

Por otro lado, para Dudai (1989), el aprendizaje es una generación de representaciones internas perdurables, dependiente de la experiencia y/o una modificación duradera de estas representaciones, dependiente también de la experiencia; dichas representaciones son versiones estilizadas del mundo (versiones simplificadas en donde se realzan las características más importantes), codificadas neuronalmente y capaces por si mismas de guiar la conducta del individuo.

Un ejemplo de cómo pueden medirse los cambios conductuales o fisiológicos inducidos por el aprendizaje, son el registro de las reacciones de huida ante los estímulos aversivos en el miedo aprendido, también puede medirse el aprendizaje de este tipo, a través del registro de los cambios de distintos índices fisiológicos, como el ritmo cardíaco, el respiratorio o la sudoración de la piel. Aunque el aprendizaje no es en sí mismo el cambio en la conducta, el registro de ésta es actualmente la única manera viable para estudiar este proceso (Aguado-Aguilar, 2001).

Con respecto a la medición de la memoria también se han implementado parámetros que se pueden medir conductualmente, como es el caso de las pruebas de retención en múltiples tareas conductuales, las cuales tienen como función, estudiar el proceso en donde la consolidación juega un papel muy importante.

Otro aspecto importante del estudio del aprendizaje y la memoria es su clasificación. El aprendizaje lo podemos diferenciar en dos categorías: el asociativo y el no asociativo; El primero implica que el cambio conductual se debe a la experiencia conjunta de dos eventos que aparecen relacionados en el tiempo (aprendizaje asociativo); el último a la simple repetición de un único evento con la misma frecuencia e intensidad a lo largo del tiempo (aprendizaje no asociativo) (Anderson, 2000). En este estudio nos enfocaremos al aprendizaje asociativo, el cual está subdividido en dos principales tipos: el condicionamiento clásico y el condicionamiento instrumental.

1.1. Condicionamiento clásico

Este tipo de aprendizaje fue inicialmente descrito y estudiado por Pavlov en sus famosos experimentos sobre la salivación en los perros. En estos estudios el sujeto es expuesto repetidamente a la asociación de dos estímulos ambientales; el sonido de una campana (E1 o estímulo condicionado) y la comida (E2 o estímulo incondicionado), esto permite a los animales aprender a anticiparse a sucesos biológicamente relevantes mediante la identificación de señales indicativas de los mismos (estímulos condicionados o EC). El conocimiento de la relación entre las señales y las consecuencias permite que conductas reflejas que inicialmente eran provocadas por un conjunto reducido de estímulos (estímulos incondicionados o EI) sean provocadas por nuevos estímulos que se convierten en estímulos condicionados, de modo que el animal actúa de forma anticipatoria, prediciendo la aparición del estímulo incondicionado (Aguado-Aguilar, 2001).

1.2. Condicionamiento instrumental

Otro tipo de aprendizaje es aquel que le permite al animal incrementar o disminuir conductas en relación a las consecuencias que estas producen, ya sea porque le procuran recompensas como alimento o compañía sexual o porque le permiten escapar o evitar situaciones peligrosas (Aguado-Aguilar, 2001). Este aprendizaje es también conocido como condicionamiento operante, término que fue introducido por Skinner (1938). En el condicionamiento operante las conductas se emiten espontáneamente y sus consecuencias determinan el aprendizaje. Las consecuencias agradables (reforzador) tienden a fortalecer una conducta, en cambio las consecuencias desagradables (castigo) tienden a debilitarla.

1.3. Clasificación de la memoria

Por otro lado, la memoria posee igualmente una gran variedad de clasificaciones; por ejemplo, para referirse a la duración de los recuerdos, a finales del siglo XIX, William James (1890) acuñó los términos ‘memoria primaria’ y ‘memoria secundaria’ que son el equivalente moderno de las memorias de corto y de largo plazo. Por otro lado, al clasificarlas según su propósito se propusieron la memoria de trabajo (Baddeley & Hitch, 1974) y la memoria de referencia (Olton, Becker, & Handelman, 1979). Otra forma de clasificar la memoria es según el tipo de información almacenada, en donde se pueden separar las memorias declarativas y las no declarativas (Zola-Morgan & Squire, 1990) o también conocidas como memoria explícita e implícita (Tulving, 1972). Por último, podemos clasificarla según su dirección temporal en memoria retrospectiva y prospectiva (Schacter et al., 2012).

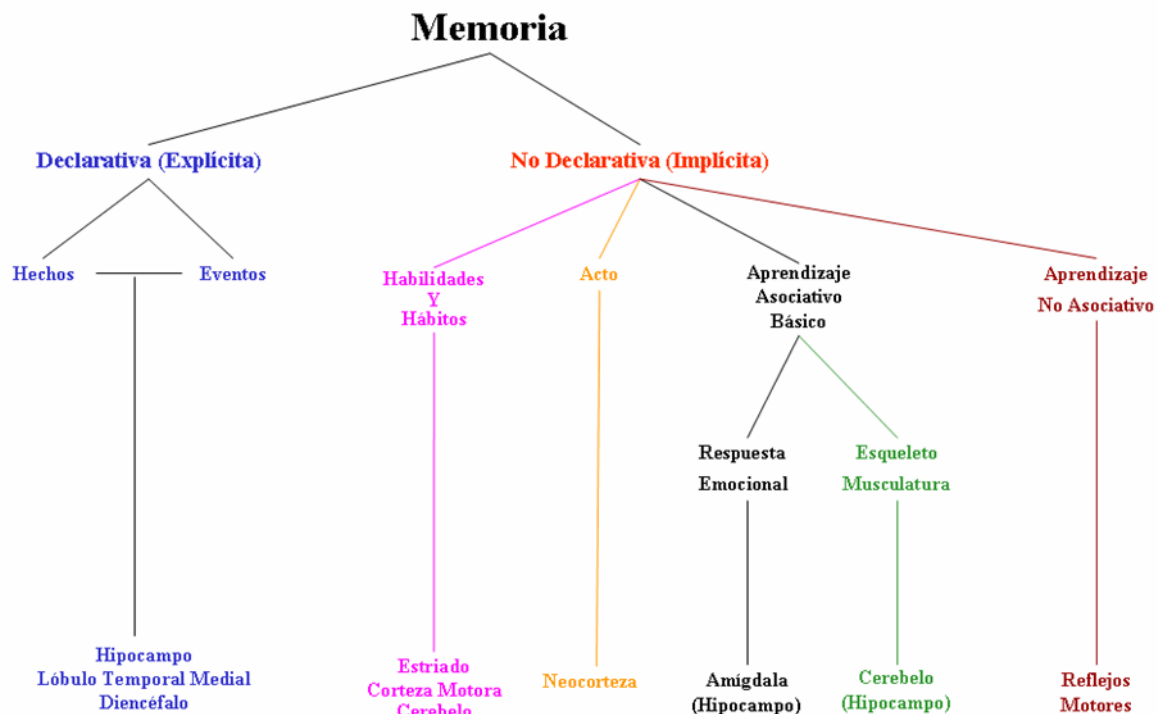


Figura 1. Esquema que muestra una clasificación de la memoria y las estructuras cerebrales asociadas a cada tipo de memoria. Modificado de Thompson y Kim (1996).

Como sustrato anatómico para estas clasificaciones de memoria se han descrito estructuras específicas, cuya actividad es indispensable como centro principal de procesamiento para el almacenamiento de la información. Como ejemplo podemos señalar a la amígdala, el hipocampo, el estriado, diferentes áreas de la corteza cerebral entre otras estructuras, las cuales se encuentran reportadas en numerosos experimentos como las principales responsables de la formación de diferentes tipos de memoria (Figura 1).

Otra forma de abordar el estudio del aprendizaje y la memoria son las nociones teóricas y fisiológicas para explicar la forma en que el cerebro procesa y almacena la información. La discusión al respecto se ha centrado en el papel que las neuronas juegan en tal procesamiento.

Santiago Ramón y Cajal (1909) dio el primer paso al intuir los procesos de plasticidad a partir de la forma de las neuronas y proponer que el número y fuerza de las conexiones neuronales son la base física del aprendizaje y el soporte de la memoria. Posteriormente Donald Hebb (1949) propuso que los cambios en la eficiencia de la comunicación sináptica permitían el establecimiento de un orden en los patrones de actividad de grupos específicos de neuronas como el mecanismo mediante el cual se almacena la información en el sistema nervioso.

En 1966 el noruego Terje Lomo observó por primera vez que breves trenes de estímulos incrementaban la eficacia de la transmisión en las sinapsis entre la vía perforante y las células granulares del giro dentado en el hipocampo; años más tarde, Bliss y Lomo (1973) descubrieron que una estimulación de frecuencia moderadamente alta en la misma vía producía incrementos estables y duraderos de la respuesta postsináptica, lo que se denominó potenciación sináptica a largo plazo (LTP, por sus siglas en inglés long-term potentiation). Estudios posteriores *in vitro* confirmaron que se trataba de un fenómeno no sólo duradero, sino también de inducción rápida lo que lo convertía en un buen candidato como mecanismo celular del aprendizaje y la memoria (Morgado, 2005).

Diferentes investigaciones en el tema de la plasticidad sináptica hipocampal muestran que tanto el aprendizaje (Bailey, Kandel, & Harris, 2015; Takeuchi, Duzkiewicz, & Morris, 2014) como la LTP (Bliss & Collingridge, 1993; Lynch, 2004) producen cambios en la estructura de las conexiones sinápticas, y dado que este tipo de cambios tienden a persistir por más tiempo, se considera que estos pueden ser la

base de la formación de la memoria de largo plazo (Lamprecht & LeDoux, 2004).

Se ha demostrado que, en milisegundos, la actividad de espigas que llegan a una región presináptica glutamatérgica, promueve la liberación de este neurotransmisor al espacio sináptico, el cual se une a los receptores AMPA (por sus siglas en inglés α -amino-3-hidroxy-5-metil-4-isoxazole propionic acid) y a los receptores NMDA (N-metil-D-aspartato). La activación de los receptores AMPA causa la apertura de su poro, permitiendo el flujo de iones, principalmente Na^+ , lo que da lugar a una despolarización postsináptica. Por otro lado, los receptores NMDA contienen un tapón de magnesio que impide el flujo de iones al unirse con el glutamato (Vyklícky et al., 2014). Sin embargo, si la activación de los receptores NMDA (N-metil-D-aspartato), por el glutamato liberado presinápticamente, coincide con la despolarización de la membrana celular postsináptica, inducida por entradas disparadoras de espigas en otras sinapsis, se produce la liberación del tapón de magnesio; produciéndose así, la entrada de calcio en la sinapsis. por lo tanto, el receptor NMDA es un detector de coincidencias permitiendo el paso de calcio únicamente cuando la actividad presináptica y la actividad postsináptica coinciden (Lamprecht & LeDoux, 2004).

La entrada de calcio en la sinapsis, induce la activación de cinasas que, modulando determinados sustratos, inducen cambios en el citoesqueleto de la neurona en el plazo de minutos y activan factores de transcripción de ARNm y síntesis de proteínas para receptores AMPA, los cuales migran hacia los lugares modificados y en pocas horas, se insertan en la membrana y contribuyen a la estabilización de los cambios ocurridos en el citoesqueleto de la neurona postsináptica (Lamprecht & LeDoux, 2004). En todo este proceso, llama especialmente la atención la celeridad (minutos) con la que el aprendizaje es capaz de producir cambios morfológicos en el sistema nervioso (Figura 2).

Las conexiones sinápticas pueden inducir un incremento o decremento en su eficiencia sináptica. Cuando se efectúa un incremento, como ya se dijo, se le denomina LTP; por el contrario, al decremento se le conoce como depresión a largo plazo (LTD, por sus siglas en inglés long-term depression), pues supone una disminución duradera en la magnitud de la respuesta post-sináptica excitadora (Bliss & Lomo, 1973).

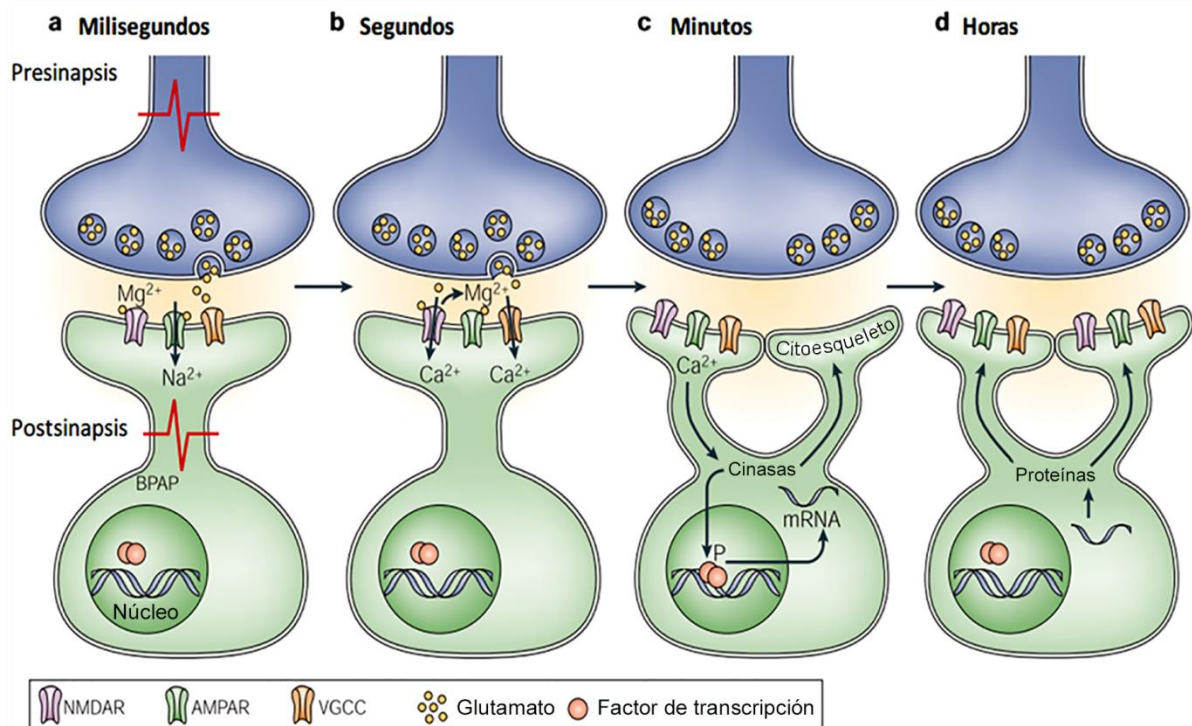


Figura 2. Mecanismos moleculares implicados en la iniciación y el mantenimiento de la plasticidad sináptica. a) La liberación de glutamato dependiente de actividad proveniente de las neuronas presinápticas conduce a la activación de los receptores AMPA (AMPA) y a la despolarización de la neurona postsináptica. La despolarización ocurre localmente en la sinapsis y/o por la propagación inversa de potenciales de acción (BPAP por sus siglas en inglés). b) La despolarización de la neurona postsináptica permite la remoción del Mg^{2+} que inhibe al receptor a NMDA (NMDAR) y así el Ca^{2+} puede fluir a través del receptor. La despolarización también activa los canales de calcio dependientes de voltaje (VGCC), que es otra fuente de calcio para la sinapsis. c) El influjo de calcio en la sinapsis activa quinasas que, a su vez modulan la actividad de sus sustratos; estos sustratos contribuyen a los cambios locales en la sinapsis, como la alteración morfológica a través de la regulación citoesquelética, o inducen la transcripción de ARN en el núcleo mediante el control de factores de transcripción. d) El transcrito de ARNm se traduce en proteínas que son capturadas por las sinapsis activadas y contribuyen a la estabilización de los cambios sinápticos. Modificado de Lamprecht y LeDoux (2004).

2. EL APRENDIZAJE INCREMENTADO

Las experiencias con alto contenido emocional, generalmente son recordadas con mayor detalle y durante más tiempo que las experiencias con contenido neutro, esto indica que no toda la información se aprende, almacena o evoca, con la misma intensidad. Estas experiencias emotivas, inducen un tipo de aprendizaje conocido como “aprendizaje incrementado” (Prado-Alcalá et al., 2006), en el cual, la información es almacenada de tal forma que su pérdida con el paso del tiempo es muy escasa, lo

que operacionalmente se denomina como resistencia a la extinción (Garín-Aguilar et al., 2012; Prado-Alcalá et al., 2012).

Ejemplos de “aprendizaje incrementado” son el trastorno de estrés postraumático (PTSD por sus siglas en inglés post-traumatic stress disorder) (Parsons & Ressler, 2013; Pitman et al., 2012; Sherin & Nemeroff, 2011; Tipps, Raybuck, & Lattal, 2014), el aprendizaje motivado por adicciones (Hyman, 2005; Torregrossa, Corlett, & Taylor, 2011), y el entrenamiento intenso (Prado-Alcalá et al., 2012). Este último se refiere al aprendizaje mediado por un mayor número de sesiones de entrenamiento, o al condicionamiento aversivo de un solo ensayo, mediado por altas intensidades de choque eléctrico (Prado-Alcalá et al., 2012; Prado-Alcalá et al., 2007). En el presente trabajo nos enfocamos en el entrenamiento intenso para el estudio del aprendizaje incrementado.

El aprendizaje incrementado, inducido por el entrenamiento intenso, ha sido estudiado principalmente en la tarea de evitación inhibitoria (IA), en la cual, además de generar una mayor resistencia a la extinción (Bello-Medina et al., 2016; Garín-Aguilar et al., 2012; Prado-Alcalá et al., 1994), también se ha demostrado que induce un efecto protector contra una amplia variedad de tratamientos amnésicos, administrados sistémicamente o directamente en estructuras cerebrales (Prado-Alcalá, 1995; Prado-Alcalá et al., 2012).

En la tarea de evitación inhibitoria el animal aprende a evitar un acontecimiento nocivo suprimiendo una conducta concreta, es decir, la inhibición de una actividad innata o de un hábito adquirido (Bureš, Burešová, & Huston, 1976); la tarea de evitación inhibitoria será descrita a profundidad más adelante en la sección de método.

Entre los trabajos realizados en esta línea de investigación se encuentran aquellos en los que se realizó el bloqueo del sistema colinérgico mediante la administración sistémica o intracerebral de antagonistas a los receptores metabotrópicos para acetilcolina; este tratamiento induce un marcado deterioro en el almacenamiento de información relacionado con varias tareas conductuales, demostrando así su participación en la consolidación de la memoria (Gold, 2003; Prado-Alcalá, Fernandez-Samblancat, & Solodkin-Herrera, 1985); sin embargo como puede observarse en la Figura 3, cuando los sujetos son sometidos a un entrenamiento intenso, los efectos amnésicos provocados por dicho tratamiento desaparecen (Durán-Arévalo et al., 1990); mostrando así el efecto protector de la

memoria, asociado con el aprendizaje incrementado.

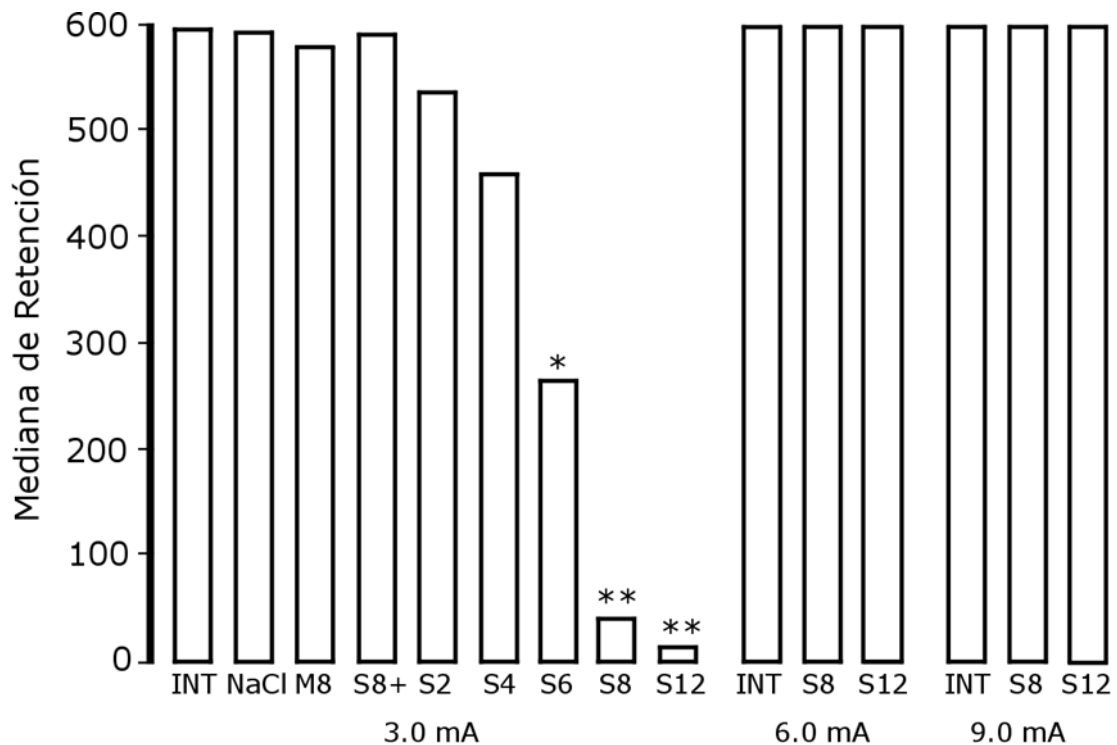


Figura 3. Medianas de la retención de los datos obtenidos 24 horas después del entrenamiento en la tarea de evitación inhibitoria con intensidades de choque eléctrico de 3.0, 6.0 o 9.0 mA. INT, grupo intacto; NaCl, grupo inyectado con solución salina isotónica; M8, grupo inyectado con 8 µg de metiloscopolamina; S, grupos inyectados con escopolamina (2, 4, 6, 8 o 12 µg). Todos los tratamientos fueron administrados 5 minutos después del entrenamiento excepto para el grupo S8+ el cual fue inyectado 60 minutos después del entrenamiento * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ con respecto al grupo intacto. Modificado de Durán-Arévalo et al. (1990).

En otro estudio en el que se indujo la depleción total de la serotonina del sistema nervioso central, por medio de la administración intraperitoneal de p-cloroanfetamina (PCA), un análogo clorado de la amfetamina, se observó que las ratas que recibieron un entrenamiento moderado, mostraron un marcado cuadro amnésico. Sin embargo, al incrementarse el estímulo aversivo durante el entrenamiento, la consolidación de la memoria se ve protegida (Figura 4), demostrándose así que el efecto protector no es exclusivo del sistema colinérgico (Solana-Figueroa et al., 2002).

Algunos otros estudios en este campo, se han realizado con la finalidad de encontrar las estructuras implicadas en el aprendizaje incrementado; por ejemplo, se ha determinado que el bloqueo colinérgico del estriado, inducido por la administración

local de atropina, interfiere con la retención de la evitación inhibitoria. Sin embargo, este mismo tratamiento farmacológico no produjo ningún cambio en la memoria de ratas entrenadas con intensidades altas de choque eléctrico (Díaz del Guante, Rivas-Arancibia, Quirarte, & Prado-Alcalá, 1990; Giordano & Prado-Alcalá, 1986).

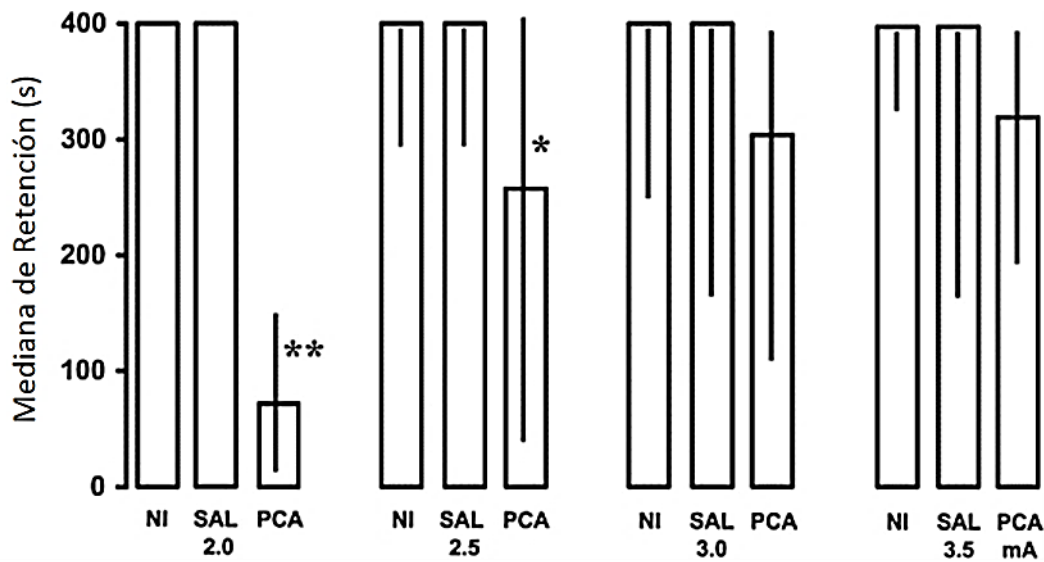


Figura 4. Medianas de la retención de los datos obtenidos de ratas no inyectadas (NI) y de ratas que fueron inyectadas con solución salina (SAL) o con 2.5 mg/Kg de p-cloroanfetamina (PCA), todos estos grupos fueron entrenados con 2.0, 2.5, 3.0 y 3.5 mA. Las inyecciones fueron administradas 30 minutos antes del entrenamiento. El $*p < 0.02$, $**p < 0.0005$. Los resultados muestran el efecto protector contra la amnesia, inducido por el aprendizaje incrementado. Modificado de Solana-Figueroa et al. (2002).

Incluso cuando se bloquea completamente la actividad estriatal por medio de la administración directa de lidocaína, fármaco que bloquea los canales de sodio impidiendo la propagación del potencial de acción, lo cual induce un estado amnésico, (Figura 5). Dicha amnesia fue únicamente observada en las ratas sometidas a entrenamientos con choques eléctricos moderados, haciéndose el tratamiento inocuo en los animales entrenados con choques eléctricos de mayor intensidad (Pérez-Ruíz & Prado-Alcalá, 1989).

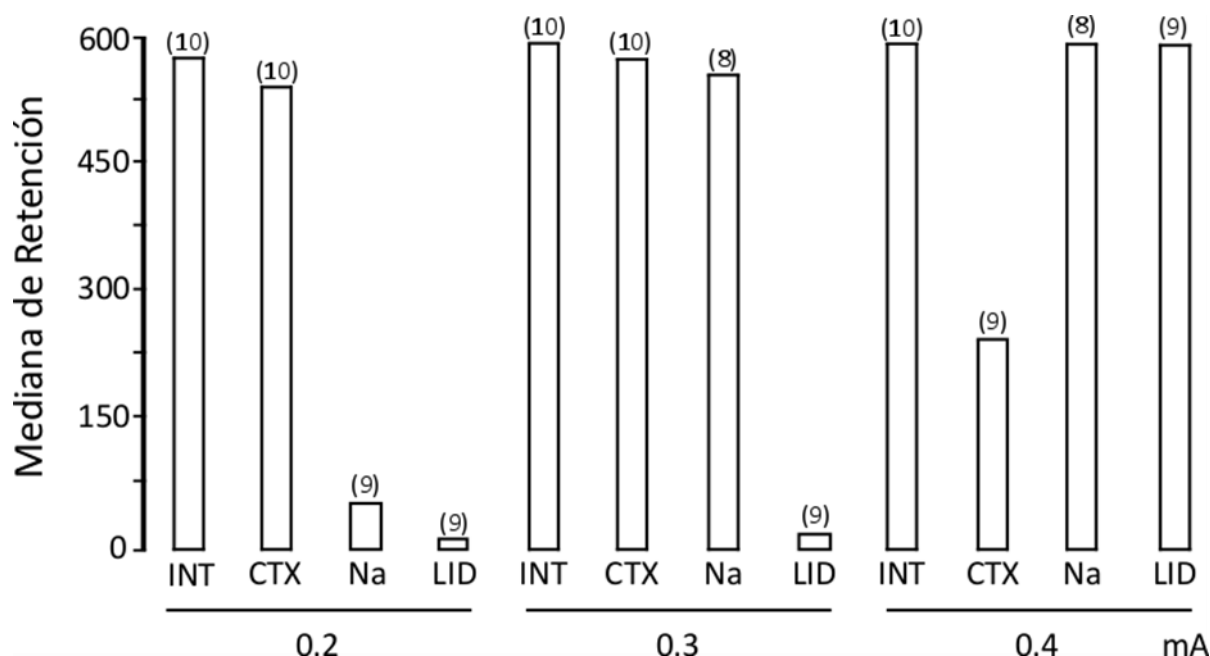


Figura 5. Medianas de la retención de los datos obtenidos 24 horas después del entrenamiento. INT, grupo intacto; CTX, grupo inyectado con lidocaína en la corteza; Na, grupo inyectado con solución salina isotónica en el estriado; LID, grupo inyectado con lidocaína en el estriado. Las intensidades de choque eléctrico fueron 0.2, 0.3, y 0.4 mA; los números en paréntesis corresponden al número de animales para cada grupo. Modificado de Pérez-Ruiz y Prado-Alcalá (1989).

Otra de las estructuras cerebrales que ha sido estudiada es la sustancia nigra en donde la administración de bicuculina y picrotoxina (fármacos que bloquean el sistema GABAérgico) muestran de nuevo los mismos resultados, amnesia en las ratas que fueron entrenadas de forma moderada y ningún efecto en las sometidas a un entrenamiento con altas intensidades de choque eléctrico (Cobos-Zapiaín et al., 1996).

Estudios realizados en la amígdala y el hipocampo han demostrado las lesiones de estas estructuras no producen efectos sobre la memoria de ratas sometidas a un entrenamiento intenso (Garín-Aguilar et al., 2014; Salado-Castillo et al., 2011).

El efecto protector en contra de la amnesia, también ha sido estudiado en otros mamíferos como los gatos. En estos animales se realizaron lesiones reversibles en el núcleo caudado, por medio inyecciones de cloruro de potasio a altas concentraciones (KCl 3M), este tratamiento induce una despolarización aguda y sostenida de las membranas neuronales bloqueando así la actividad neuronal de dicha estructura. Las lesiones indujeron un estado amnésico en los grupos con entrenamiento moderado, sin embargo, en los animales con entrenamiento intenso se observó una retención

equivalente a la del grupo control (Prado-Alcalá & Cobos-Zapiaín, 1979).

Estudios recientes han demostrado que la administración de inhibidores de la síntesis de proteínas como la cicloheximida inyectada sistémicamente (Díaz-Trujillo et al., 2009) o cuando se administra anisomicina directamente en el estriado dorsal (Gonzalez-Franco, Bello-Medina, Serafín, Prado-Alcalá, & Quirarte, en preparación), no se producen efectos amnésicos cuando los animales son entrenados con intensidades altas de choque eléctrico en la tarea de evitación inhibitoria (Figura 6).

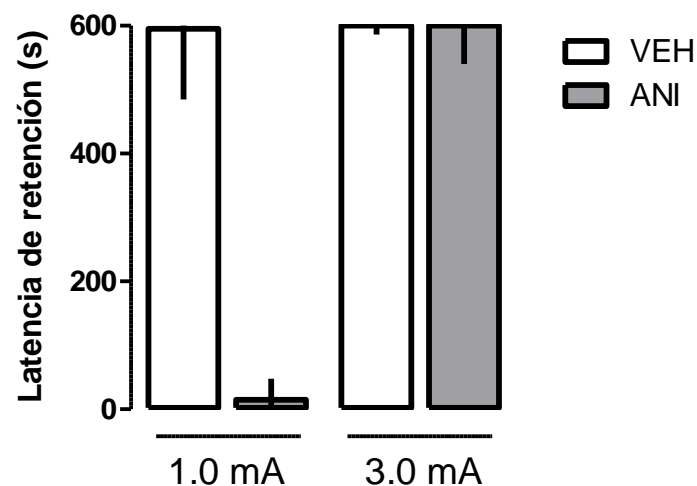


Figura 6. Medianas con rangos intercuartiles de la latencia de retención, 48 horas después del entrenamiento. ANI, grupos de ratas a los cuales se les administró 125 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de anisomicina directamente en el estriado dorsal; VEH, grupos de ratas a los cuales se les administró únicamente el vehículo. Treinta minutos después, los animales fueron entrenados en la tarea de evitación inhibitoria con una intensidad moderada o alta de choque eléctrico (Gonzalez-Franco et al., en preparación).

3. EL ESTRIADO

Como se ha mencionado previamente, en el proceso de consolidación de la memoria participan varias estructuras cerebrales que funcionan como núcleos de procesamiento para que la información sea almacenada. El estriado (también llamado caudado-putamen) es el componente principal de un grupo de estructuras subcorticales conocidas como los ganglios basales. Diversas investigaciones aportan evidencia de que esta estructura tiene un importante papel en el aprendizaje y la

memoria, particularmente en las asociaciones estímulo-respuesta y en la memoria de hábitos (McDonald & White, 1993; Packard & Knowlton, 2002).

3.1. Anatomía

En roedores y pequeños animales que presentan una corteza lisa, el estriado está compuesto por un solo núcleo indiferenciado, el cual es penetrado por las fibras de la cápsula interna y en la que no pueden diferenciarse el núcleo caudado y el putamen (Figura 7A). En carnívoros y en primates el estriado es, estrictamente hablando, una estructura de mayor tamaño y la cápsula interna forma una lámina gruesa de fibras que separa casi completamente el núcleo caudado del putamen (Kemp & Powell, 1971).

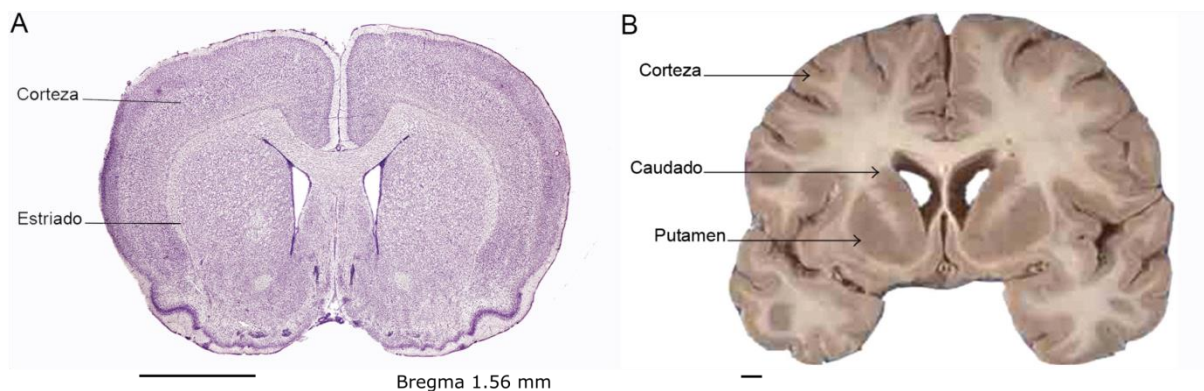


Figura 7. A. Sección coronal de un cerebro de rata teñido con violeta de cresilo mostrando el estriado como una única estructura y la corteza. B. Sección coronal de un cerebro humano que muestra la corteza, el caudado y el putamen separados por la capsula interna, estas dos estructuras combinadas forman el estriado. Las barras de escala equivalen a 5 mm en ambas imágenes. Modificado de Paxinos y Watson (2007) y Evans, Kelly, Precious y Rosser (2012) .

Aunque en la rata, el estriado mantiene una organización anatómica constante a lo largo de toda su extensión, en realidad es una estructura heterogénea con varios tipos de divisiones. El estriado recibe entradas glutamatérgicas provenientes de casi todas las regiones de la corteza cerebral y además de los núcleos mediales e intralaminares del tálamo y de igual forma es el blanco principal de las neuronas dopaminérgicas cuyos cuerpos celulares están situados en la parte superior del tallo cerebral (Figura 8) (Voorn, Vanderschuren, Groenewegen, Robbins, & Pennartz, 2004).

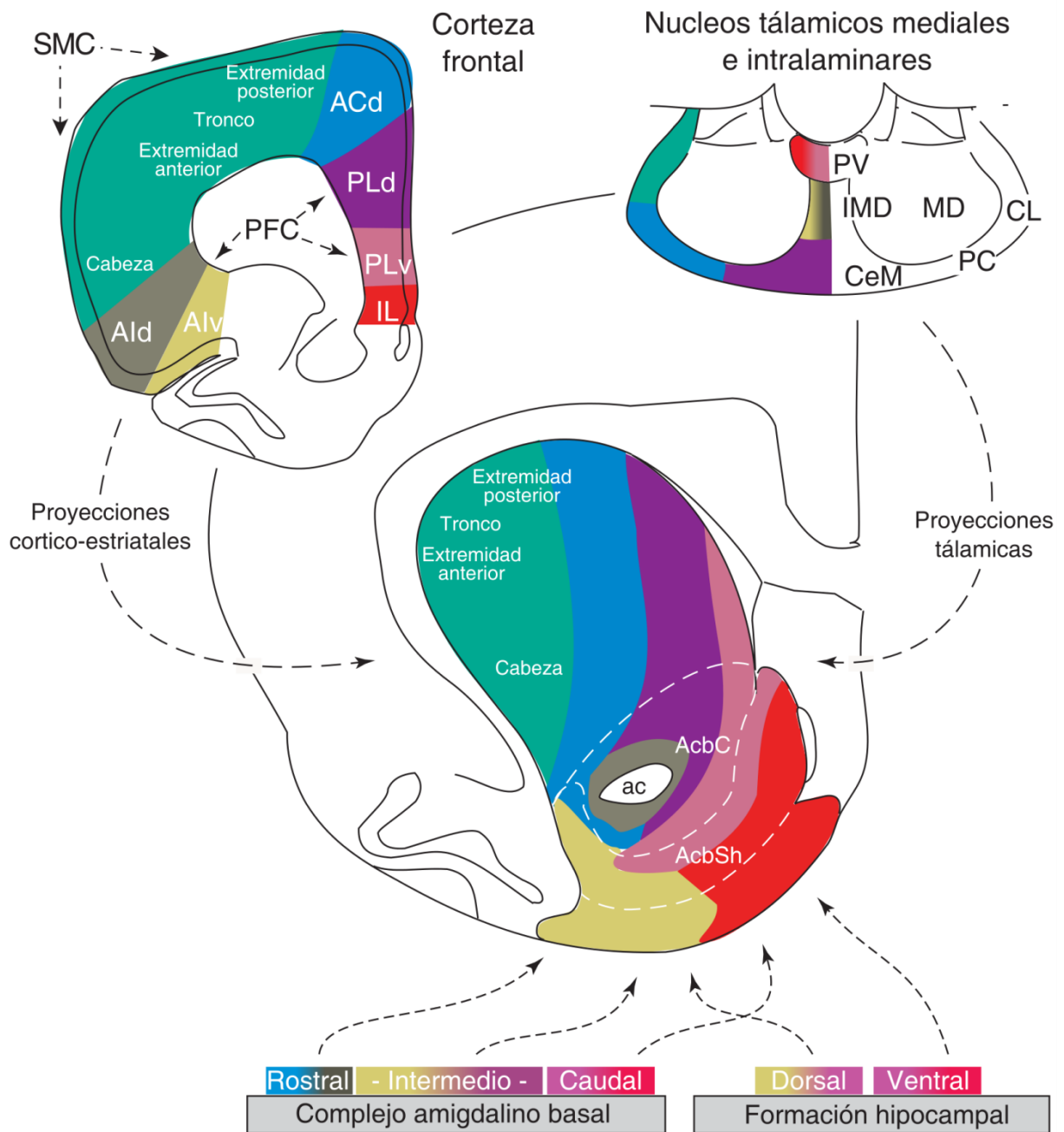


Figura 8. Corte coronal del estriado de la rata en el que se muestran las divisiones funcionales según su conectividad. Abreviaturas: ac, comisura anterior; AcbC, núcleo accumbens core; AcbSh, núcleo accumbens shell; ACd, corteza cingulada dorsal anterior; Ald, corteza insular agranular dorsal; Alv, corteza insular agranular ventral; CeM, núcleo central talámico medial; CL, núcleo central talámico lateral; IL, corteza infralímbica; IMD, núcleo talámico intermediodorsal; MD, núcleo talámico mediodorsal; PC, núcleo talámico paracentral; PFC, corteza prefrontal; PLd, corteza prelímbica dorsal; PLv, corteza prelímbica ventral; PV, núcleo talámico paraventricular; SMC, corteza sensoriomotora. Modificado Voorn et al. (2004).

Las diferentes entradas de información dividen el estriado en regiones que participan diferencialmente en el procesamiento de información, por un lado, el estriado dorsolateral, está relacionado con el aprendizaje de procedimiento, el aprendizaje de tipo estímulo-respuesta y el aprendizaje de hábitos, por otra parte, el estriado dorsomedial está implicado en el aprendizaje de acciones dirigidas a objetivos y a la navegación espacial (Devan & White, 1999; Ito & Doya, 2015; Kreitzer & Malenka, 2008; Lozano, Serafín, Prado-Alcalá, Roozendaal, & Quirarte, 2013; Packard & Knowlton, 2002; Voorn et al., 2004; White & McDonald, 2002). Además, debido a sus conexiones con estructuras límbicas como el hipocampo y la amígdala, se ha propuesto que la región ventral del estriado puede también participar en el procesamiento de información motivacional, la cual ha sido atribuida a estructuras cercanas como el núcleo accumbens (Voorn et al., 2004). Sin embargo, es muy poca la información disponible acerca de esta región estriatal.

En cuanto a sus eferencias, el estriado no posee conexiones directas a la médula espinal, por lo cual, su participación en la ejecución del movimiento se lleva a cabo a través de sus conexiones con el globo pálido interno (GPi) y en menor medida, a través de la sustancia nigra pars reticulata (SNpr) a través del sistema motor extrapiramidal que proyecta al tallo cerebral y de ahí a la médula espinal a través de los tractos rubro-espinal, retículo-espinal y vestíbulo-espinal (McGeorge & Faull, 1989). El estriado también posee eferencias a través del GPi a los núcleos talámicos ventral anterior, ventral lateral e intralaminares, que proyectan a las áreas motoras, premotoras, motoras suplementarias y a la corteza prefrontal presentando conexiones de regreso a las mismas regiones corticales por medio de salidas palidales que posteriormente se conectan de nuevo a las diferentes regiones corticales por medio de los núcleos talámicos anteriormente mencionados (Kimura & Graybiel, 1995).

Estas eferencias estriatales viajan a través de dos vías: la vía directa del GPi y la SNpr, que ejerce un efecto desinhibidor y contiene GABA, sustancia P y dinorfina (Deniau & Chevalier, 1985), y la vía indirecta a través del globo pálido externo (GPe) que es inhibitoria y contiene GABA, encefalina y viaja a través del GPe a los núcleos subtalámicos de ahí al GPi, al SNpr y al tálamo (Figura 9) (Albin, Young, & Penney, 1989; Yin & Knowlton, 2006).

Una hipótesis muy interesante, es que los giros fronto-córtico-estriatales son usados por el estriado para esencialmente entrenar a la corteza para producir

respuestas motoras aprendidas en presencia de patrones particulares de información sensorial; sin embargo es importante notar que las eferencias palidales y nigrales también proyectan directamente al tallo cerebral, lo cual permite un rápido acceso al control espinal de respuestas motoras (Wise, Murray, & Gerfen, 1996). Otra conexión que cabe destacar es la vía tálamo-estriatal en la cual se ha reportado el traslape de las eferencias estriatales con las regiones en donde se encuentran las células de proyección de la vía cortico estriatal (Mengual, de las Heras, Erro, Lanciego, & Gimenez-Amaya, 1999).

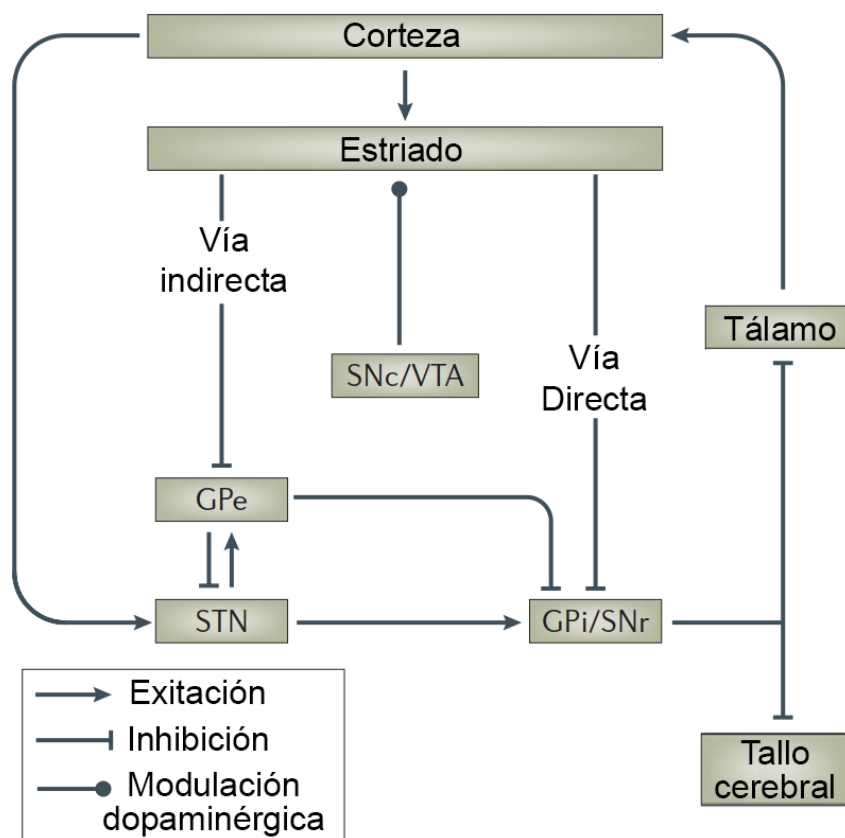


Figura 9. Diagrama de las aferencias y eferencias estriatales, GPe, globo pálido externo; GPi, globo pálido interno; SNc, sustancia nigra pars compacta; SNr, sustancia nigra pars reticulata; STN, núcleo subtalámico. Modificado de Yin y Knowlton (2006).

Con respecto a la neuroquímica estriatal también se han reportado características anatómicas importantes, como son las prominentes aferencias dopaminérgicas provenientes de la sustancia nigra y el área ventral tegmental que inervan al estriado dorsal y ventral (Dudman & Gerfen, 2015). Las vías corticoestriatal,

tálamoestriatal y las aferencias del sistema límbico incluyendo a la amígdala y al hipocampo, utilizan neurotransmisores excitatorios aminoacídicos siendo predominante el glutamato (Fonnum, Storm-Mathisen, & Divac, 1981).

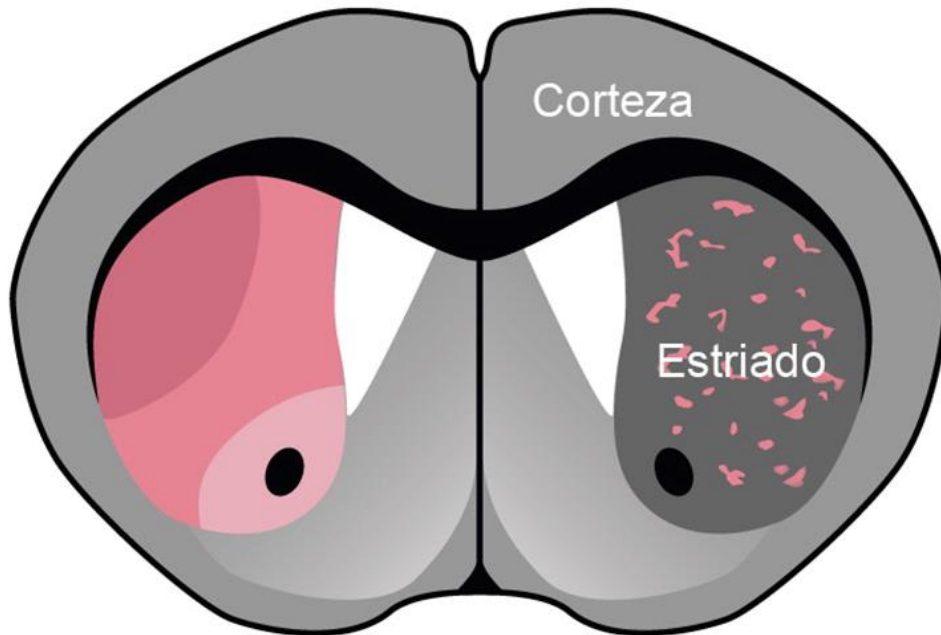


Figura 10. Esquema de un corte coronal del cerebro de rata, se muestran la corteza y el estriado. En el hemisferio izquierdo se ilustran esquemáticamente las divisiones dorsolateral, dorsomedial y ventral. En el hemisferio derecho se ilustran los parches estriatales (rosa) y la matriz (gris oscuro). Modificado de Kreitzer (2009).

Otra característica importante es la compartimentalización neuroquímica del estriado, la cual es conocida como el complejo parche-matriz que presenta características que no pueden ser observadas a simple vista en la aparente homogeneidad celular del estriado (Figura 10). El parche, también denominado estriosoma consiste en grupos de neuronas que presentan bajos niveles de acetilcolina y altos niveles de distintos opioides y sustancia p; en contraste, la matriz presenta células con altos niveles de acetilcolina y somatostatina. Las aferencias dopaminérgicas se distribuyen tanto en el parche como en la matriz, sin embargo, la sustancia nigra inerva preferente a la matriz, de la misma manera que el área ventral tegmental inerva mayoritariamente al parche. Por otro lado las conexiones corticoestriatales y talamoestriatales están más asociadas a la matriz y las conexiones

del sistema límbico (como la amígdala y el hipocampo) con el parche (Packard & Knowlton, 2002). Las investigaciones acerca de la funcionalidad del parche y la matriz en el aprendizaje y la memoria indican que la matriz es la principal responsable de las funciones mnémicas del estriado (White, 1989).

3.1.1. Citoarquitectura

Los primeros indicios de una organización compartamental en el estriado de los mamíferos adultos están recopilados en algunos comentarios sobre la citoarquitectura de esta estructura subcortical. Los antiguos neuroanatomistas observaron que el estriado parece citoarquitectónicamente homogéneo comparado con la corteza cerebral, que presentaba una laminación evidente (Prensa, Parent, & Gimenez-Amaya, 1999).

Como la mayoría de los núcleos del sistema nervioso central, el estriado está constituido por neuronas de proyección (también conocidas como células de Golgi de tipo I) e interneuronas (células de Golgi de tipo II). Las primeras se caracterizan por poseer cuatro o cinco dendritas pobladas densamente con espinas y un axón que proporciona abundantes ramas colaterales antes de salir del estriado. Estas neuronas, conocidas como neuronas medianas espinosas, son GABAérgicas y constituyen gran porcentaje de la población total neuronal del estriado. En el caso de la rata y del gato se ha estimado que las neuronas de proyección constituyen hasta un 95% de la población total estriatal, en el mono este porcentaje disminuye a un 76% y es un poco menor en el estriado humano (Kreitzer, 2009; Prensa et al., 1999).

Las interneuronas estriatales, cuyos axones no proyectan fuera de los límites del estriado, son mucho menos numerosas y pueden ser categorizadas anatómicamente en células GABAérgicas de tamaño medio y grandes células colinérgicas (Kawaguchi, Wilson, Augood, & Emson, 1995). Aunque sólo representan un bajo porcentaje del total de neuronas, incluyen una gran variedad de grupos celulares con propiedades neuroquímicas diferentes. Las interneuronas GABAérgicas de tamaño mediano pueden clasificarse también histoquímicamente en tres subtipos: (a) células positivas a parvalbúmina; (b) células positivas a somatostatina, neuropéptido Y (NPY) y óxido nítrico sintasa (NOS), y (c) células positivas a calretinina (Bennett & Bolam, 1993; Cowan, Wilson, Emson, & Heizmann, 1990; Chesselet & Graybiel, 1986; Smith & Parent, 1986; Vincent et al., 1983).

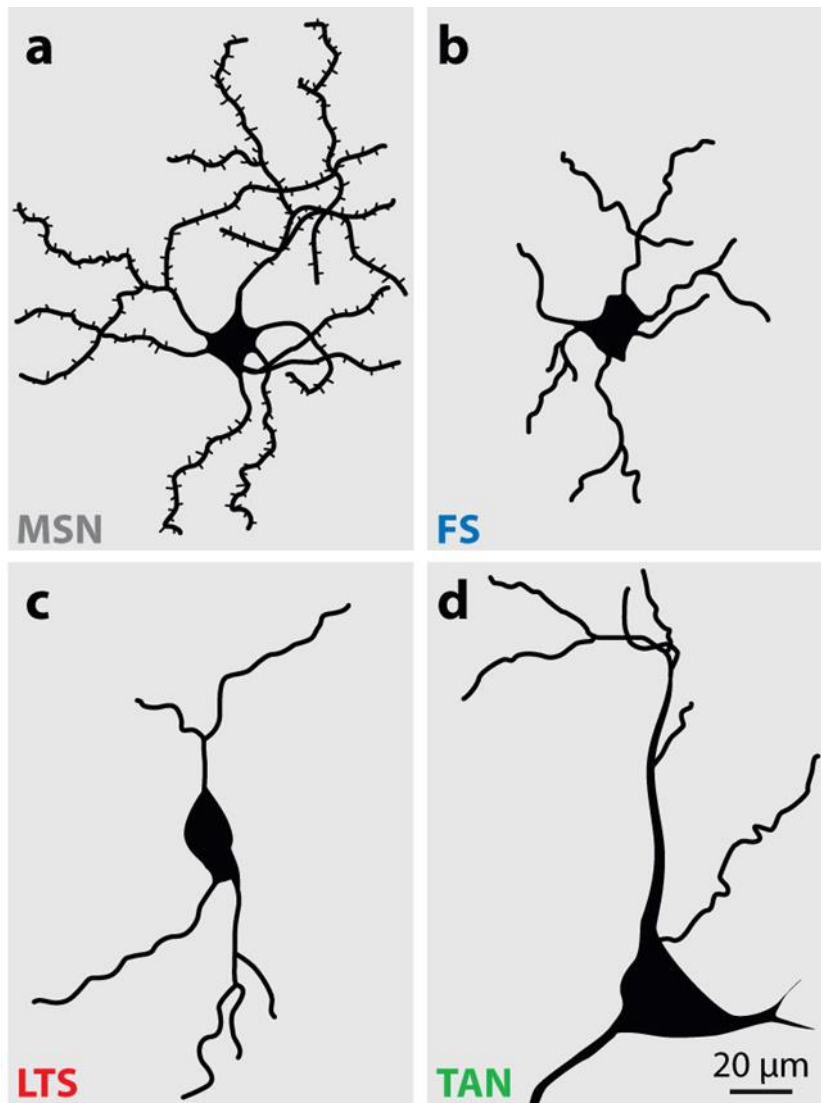


Figura 11. Tipos de células localizadas en el estriado de rata. Las representaciones esquemáticas de (a) neurona mediana espinosa (MSN), (b) interneurona de disparo rápido (FS), (c) interneurona de bajo umbral de disparo (LTS), y (d) neurona colinérgica de actividad tónica (TAN). Modificado de Kreitzer (2009).

Fisiológicamente, estas tres clases de interneuronas GABAérgicas muestran al menos dos tipos diferentes de patrones de disparo (Kawaguchi et al., 1995; Tepper & Bolam, 2004). Las neuronas positivas a la parvalbúmina muestran velocidades de disparo rápidas y sostenidas en respuesta a la inyección de corriente y se conocen alternativamente como interneuronas de disparo rápido (FS por sus siglas en inglés fast spiking). Las interneuronas positivas a la somatostatina tienen tasas de disparo más bajas y potenciales de tipo meseta, se conocen como interneuronas de bajo

umbral de disparo (LTS por sus siglas en inglés low-threshold spiking). Aunque las interneuronas positivas a la calretinina no han sido clasificadas fisiológicamente, también pueden presentar algunas características de las interneuronas LTS (Tepper & Bolam, 2004). Finalmente, las interneuronas colinérgicas pueden caracterizarse fisiológicamente por su actividad tónica, sus fuertes corrientes activadas por hiperpolarización y por su actividad espontánea en condiciones fisiológicas (Figura 11) (Wilson, Chang, & Kitai, 1990).

Es interesante señalar que recientemente la literatura en el área indica que según se asciende en la escala filogenética la proporción de interneuronas aumenta y disminuye la de neuronas de proyección. Este hecho resulta especialmente atractivo desde un punto de vista funcional porque podría indicar que el estriado en el hombre posee una mayor capacidad de integración y de procesamiento de la información nerviosa que llega a los ganglios basales desde la corteza cerebral, el tálamo, el núcleo subtalámico y ciertos núcleos del tronco del encéfalo como son el locus coeruleus y el núcleo dorsal del raquídeo (Deus, Pujol, & Espert, 1996; Roberts, Gaither, Peretti, Lapidus, & Chute, 1996).

3.2. Participación del estriado en el aprendizaje y la memoria

Como se mencionó anteriormente, numerosos estudios con animales experimentales han vinculado al estriado, en funciones cognitivas tales como el aprendizaje y la memoria (Divac, Rosvold, & Szwarcbart, 1967). Estos estudios han demostrado el papel que tiene esta estructura en el aprendizaje de hábitos o de estímulo-respuesta (S-R por sus siglas en inglés stimulus-response), tanto en ratas (Graybiel, 1998; Jog, Kubota, Connolly, Hillegaart, & Graybiel, 1999; Kesner, Bolland, & Dakis, 1993; McDonald & White, 1993; Packard & McGaugh, 1992; Packard & Teather, 1997; Packard & Teather, 1998; White, 1997), como en primates (Fernandez-Ruiz, Wang, Aigner, & Mishkin, 2001; Kimura, 1995; Teng, Stefanacci, Squire, & Zola, 2000) y humanos (Butters, Salmon, & Heindel, 1994; Heindel, Butters, & Salmon, 1988; Knowlton, Mangels, & Squire, 1996; Martone, Butters, Payne, Becker, & Sax, 1984). Varios de estos estudios apoyan la participación del estriado en el aprendizaje y la memoria mediante el uso de metodologías experimentales que

disocian al estriado, al hipocampo y la amígdala, como tres sistemas de memoria independientes (McDonald & White, 1993; White & McDonald, 2002).

3.2.1. Estudios por medio de lesiones

Varios estudios han demostrado la participación del estriado en el aprendizaje y la memoria por medio de técnicas de lesión cerebral. El primer uso de esta metodología, para probar directamente el papel selectivo hipotético del estriado en el aprendizaje de S-R, involucró un estudio en el que se utilizaron dos tareas conductuales en el laberinto radial de ocho brazos (Packard, Hirsh, & White, 1989).

El laberinto radial de ocho brazos fue diseñado por Olton y Samuelson en 1976 para medir el aprendizaje espacial y la memoria en ratas. El aparato original consiste en ocho brazos espaciados de forma equidistante, cada uno irradiando desde una pequeña plataforma central circular; al final de cada brazo hay un sitio de alimentación, cuyo contenido no es visible desde la plataforma central (Olton & Samuelson, 1976).

En la versión estándar de cambiar-ganar (del inglés win-shift), las ratas obtienen alimento como recompensa, al visitar cada brazo del laberinto y se evalúa negativamente si el roedor entra más de una vez en cada brazo dentro de una sesión diaria de entrenamiento. Por otro lado, en una versión denominada permanecer-ganar (del inglés win-stay), las ratas obtuvieron recompensas al visitar dos veces, cuatro de los ocho brazos del laberinto que fueron seleccionados e iluminados aleatoriamente, por cada sesión de entrenamiento diario. Para esta metodología las visitas a los brazos de laberinto sin iluminación fueron evaluadas como errores. Cuando las ratas fueron entrenadas en estas dos tareas, después de recibir lesiones electrolíticas bilaterales en el estriado; se observó que las lesiones del estriado perjudicaron la adquisición de la tarea de permanecer-ganar, pero no afectaron la adquisición de la tarea de cambiar-ganar (Figura 12). Esto indicó una disociación que demuestra la participación del estriado en el aprendizaje de tareas del tipo S-R (Packard et al., 1989).

De manera interesante este mismo trabajo también demostró que las lesiones del sistema hipocampal (fimbria-fórnix) producen un patrón opuesto en los resultados, demostrando una doble disociación de las funciones mnemónicas entre el estriado y el sistema hipocampal. Estos hallazgos fueron replicados posteriormente en un estudio que empleó lesiones neurotóxicas del estriado, el hipocampo y la amígdala. Este estudio investigó la participación de cada una de estas estructuras en el

aprendizaje y la memoria, utilizando un conjunto de condiciones experimentales para estudiar los efectos de las lesiones en las tres regiones cerebrales por medio de un laberinto radial de 8 brazos (McDonald & White, 1993).

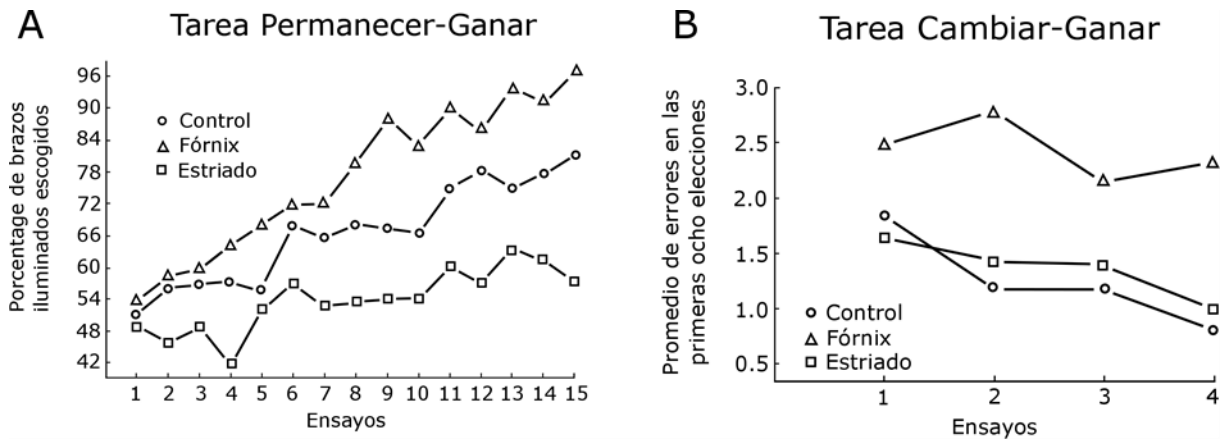


Figura 12. Desempeño de ratas con lesiones electrolíticas en el estriado o el fórnix, que fueron entrenadas en el laberinto radial de ocho brazos bajo dos paradigmas conductuales diferentes. A. Porcentaje de brazos correctos escogidos (brazos iluminados sobre brazos totales por 100), por cada grupo durante los 15 ensayos de adquisición en el paradigma de permanecer-ganar. B. Promedio de errores en las primeras ocho elecciones durante la adquisición del paradigma cambiar-ganar. Como se puede observar en las gráficas, las lesiones estriatales dificultan el aprendizaje de S-R, pero no la memoria espacial. Por otro lado, también es posible observar que la lesión del sistema hipocampal, induce una facilitación del aprendizaje de S-R y una disminución en el aprendizaje espacial. Modificado de Packard et al. (1989).

Para investigar la participación del estriado en la memoria S-R, un estudio adicional utilizó dos tipos de tareas en el laberinto acuático, utilizando un modelo similar al propuesto originalmente por Morris (1984). Dos esferas de goma que sobresalían por encima de la superficie del agua sirvieron como señales. Una esfera (correcta) estaba ubicada en la parte superior de una plataforma, la cual se podía utilizar para escapar del agua; la otra esfera (incorrecta), estaba situada en la parte superior de una vara delgada y por lo tanto no proporcionaba ningún escape. Las dos esferas también diferían en aspecto visual (diferentes patrones horizontales o verticales de líneas blancas o negras). En la versión espacial de la tarea, la plataforma correcta se localizó en la misma ubicación espacial, pero se varió la apariencia visual de la esfera para cada ensayo. Por lo tanto, esta versión de la tarea requiere que las ratas aprendan a acercarse a la esfera correcta en base a la ubicación espacial, y no al patrón visual. En la versión de S-R de la tarea, la plataforma correcta se localizó en

diferentes ubicaciones espaciales en cada uno de los ensayos, pero el patrón visual de la esfera fue consistente con la plataforma de escape. Por lo tanto, esta tarea podría ser adquirida mediante el aprendizaje de un enfoque de respuesta a la señal visual es decir de S-R. Las lesiones del estriado dorsal perjudican la adquisición de este tipo de tarea, sin afectar la adquisición de la tarea espacial (Packard & McGaugh, 1992).

Otros estudios numerosos han utilizado lesiones irreversibles en el estriado antes del entrenamiento, para demostrar deficiencias en la adquisición de tareas de aprendizaje que teóricamente podrían ser adquiridas por un sistema de memoria de tipo S-R o de hábitos. Por ejemplo en ratas, las lesiones del estriado perjudican la adquisición de la conducta de evitación activa bidireccional (Green, Beatty, & Schwartzbaum, 1967; Kirkby & Kimble, 1968; Neill & Grossman, 1970), discriminaciones táctiles simultáneas, conducta de callejón recto simple (Kirkby, Polgar, & Coyle, 1981; Salinas & White, 1998), memoria de referencia invariante en una tarea de laberinto radial con solo cuatro brazos reforzados (Colombo, Davis, & Volpe, 1989), aprendizaje de discriminación de condicionamiento visual (Reading, Dunnett, & Robbins, 1991; Winocur & Eskes, 1998).

3.2.2. Heterogeneidad funcional del estriado.

Como ha sido mencionado anteriormente el estriado es, a pesar de su aparente homogeneidad, una estructura heterogénea debido a las diversas aferencias que contiene, las cuales conectan con regiones específicas de esta estructura cerebral. Esta heterogeneidad permite que el estriado procese la información de forma modular, presentando diferentes funciones dependiendo de la región que sea analizada.

En particular la principal división regional relacionada con el procesamiento de información en el aprendizaje y la memoria es la que divide al estriado en las regiones dorsolateral, dorsomedial y ventral. La primera ha sido relacionada con el aprendizaje de hábitos o de S-R; la segunda con el aprendizaje de acciones dirigidas a un objetivo o meta (GDA, por sus siglas en inglés goal-directed actions) y la última se cree que puede participar también en el procesamiento de información emotiva debido a que posee conexiones similares a las del núcleo accumbens incluyendo una fuerte entrada glutamatérgica proveniente de la amígdala (Yin & Knowlton, 2006). Sin embargo, no hay estudios que comprueben esta teoría.

Como puede ser observado en el apartado 3.2.1, los primeros esfuerzos para comprender las funciones del estriado, fueron fuertemente influenciados por la teoría de S-R/reforzador. De acuerdo con la opinión dominante, el estriado es el responsable del aprendizaje S-R reforzado por recompensas por medio de un proceso gradual de formación de hábitos (Miller, 1981; Robbins, Giardini, Jones, Reading, & Sahakian, 1990; Yin & Knowlton, 2006).

Sin embargo, a pesar de la evidencia de la participación del estriado en el aprendizaje de hábitos, muchos otros hallazgos no pueden ser explicados con este tipo de aprendizaje. Por ejemplo, los estudios que registran neuronas del núcleo caudado en monos que realizan una tarea de sacadas, han demostrado que la actividad neuronal que codifica para la dirección preferida de la sacada podría cambiar con respecto a la ausencia o presencia del reforzamiento; además, esta actividad se modifica rápidamente a medida que se presentan nuevas contingencias (Kawagoe, Takikawa, & Hikosaka, 1998; Lauwereyns et al., 2002a; Lauwereyns, Watanabe, Coe, & Hikosaka, 2002b). La grabación simultánea de la actividad eléctrica en la corteza prefrontal (PFC) y el estriado, ha demostrado que la actividad de esta última estructura se adapta rápidamente a la contingencia antes que la actividad de la PFC. Incluso dicha actividad puede adaptarse a las nuevas contingencias antes de que se produzcan mejoras significativas en el desempeño conductual (Pasupathy & Miller, 2005). Estos datos demuestran que ciertos mecanismos del aprendizaje en el estriado no tienen las características del aprendizaje de hábitos, que la anticipación a las recompensas futuras tiene un papel crucial en la regulación de la actividad estriatal y que los cambios en la actividad neuronal como resultado del aprendizaje ocurren a un ritmo demasiado rápido para ser explicado por los cambios lentos y graduales planteados por la teoría tradicional de S-R/reforzador (Yin & Knowlton, 2006).

Estos resultados variables en la funcionalidad del estriado probablemente se deben a que en muchos de los primeros estudios, se realizaron lesiones muy amplias en el estriado de roedores, sin tener en cuenta la distinción medial/lateral de esta estructura; pero, dado que el daño parece haber sido más prominente en la región lateral; esto explicaría por qué la mayoría de los resultados sugieren una mayor participación del estriado en el aprendizaje de hábitos (Yin & Knowlton, 2006). De hecho en primates el estriado esta funcionalmente especializado y dividido en dos regiones circunscritas: por un lado se encuentra el núcleo caudado, que recibe

entradas de las cortezas de asociación (el cual corresponde a la región dorsomedial del estriado de roedores) y por otro lado se encuentra el putamen, que recibe entradas principalmente de las cortezas sensorio-motoras (correspondiendo a la región dorsolateral del estriado de roedores) (Joel & Weiner, 2000).

Estos estudios han demostrado que el DMS, al igual que el hipocampo dorsal, está involucrado en el aprendizaje de lugar o flexible; mientras que el DLS participa en el aprendizaje de respuesta o inflexible. En particular, las lesiones del DMS dan como resultado una preferencia por la respuesta basada en pistas en la tarea del laberinto acuático. Teniendo en cuenta estos resultados y los diferentes patrones de conectividad anatómica, se ha propuesto que el DMS pertenece al mismo sistema funcional que el hipocampo (Devan, McDonald, & White, 1999; Devan & White, 1999).

Otros estudios han demostrado que en una tarea de intervalos variables de palanqueo (la cual se sabe que induce un aprendizaje de hábitos) es insensible al protocolo de devaluación de la recompensa; sin embargo cuando los animales reciben una lesión excitotóxica en el DLS, se produce una disminución en el número de respuestas de palanqueo en comparación al grupo control, mostrando un daño en el sistema de aprendizaje de hábitos; mientras que posiblemente, el sistema alternativo de GDA, es decir el DMS, suple al DLS en el control de la conducta (Yin & Knowlton, 2006).

En otro estudio, para evaluar el papel del DMS en el aprendizaje de GDA, se utilizó un procedimiento de entrenamiento con dos acciones y dos resultados bajo un programa de razón variable. El cual, se sabe genera un aprendizaje de GDA que es sensible a la devaluación de la asociación y a la degradación de la contingencia (Colwill & Rescorla, 1988). Tanto las lesiones pre y post-entrenamiento, así como la inactivación reversible del DMS (principalmente la región posterior), bloquearon la sensibilidad a la devaluación y degradación de la tarea (Yin, Ostlund, Knowlton, & Balleine, 2005). Además, el bloqueo local de los receptores NMDA (N-metil-D-aspartato), que son necesarios para la inducción del LTP en esta región, previno específicamente el aprendizaje de nuevas contingencias GDA sin perjudicar el desempeño de la tarea (Yin, Knowlton, & Balleine, 2005). Por lo tanto, el DMS parece ser un sustrato neuronal crucial para el aprendizaje y la expresión de las acciones dirigidas a objetivos. Cuando esta región se encuentra bloqueada, el comportamiento

del animal se vuelve habitual incluso en condiciones de entrenamiento que resultan en aprendizajes de GDA para ratas del grupo control (Yin & Knowlton, 2006).

Estos estudios dejan en claro como el estriado funciona como una estructura modular que es capaz de procesar distintos tipos de información y controlar distintos aspectos de la conducta en particular de la conducta instrumental, lo que además podría significar que estos módulos podrían activarse dependiendo de los requerimientos cognitivos a los cuales se enfrenta el sujeto en un momento dado.

3.2.3. El estriado y la navegación espacial

El análisis de los efectos de lesiones circunscritas realizadas en el estriado en la conducta, sugieren la especialización regional en el aprendizaje y la toma de decisiones (Wickens, Budd, Hyland, & Arbuthnott, 2007). Además, el estriado ha sido fuertemente relacionado con las conductas de navegación (Mizumori, Yeshenko, Gill, & Davis, 2004; Poldrack & Packard, 2003; Yeshenko, Guazzelli, & Mizumori, 2004), de esta manera, se ha propuesto que las lesiones en el estriado afectan las conductas que consisten en relacionar un estímulo reforzante con su ubicación espacial, presentándose un intervalo de tiempo entre la presentación del estímulo y la solicitud que se le hace al sujeto para que lo ubique; estas conductas son comúnmente denominadas de respuesta demorada; de igual forma se ha visto este efecto en las conductas de evitación condicionada (Packard & Knowlton, 2002).

El estriado durante mucho tiempo ha sido considerado selectivamente importante para la memoria no declarativa como la de procedimiento o instrumental. Esto se contrapone con el procesamiento de contexto espacial que se suele atribuir al hipocampo. Sin embargo, la evidencia neurofisiológica de los mecanismos de navegación adaptativa revela que distintos sistemas neuronales como el estriado y el hipocampo continuamente procesan información pertinente a la tarea, independientemente de la estrategia cognitiva escogida; por ejemplo, las representaciones neuronales tanto del hipocampo y del estriado reflejan la ubicación espacial, la dirección de la cabeza, la ubicación de la recompensa, y las características del movimiento egocéntrico. Por lo tanto, el procesamiento continuo en paralelo a través de sistemas de memoria puede ser la norma y no la excepción (Mizumori, Puryear, & Martig, 2009).

La participación del estriado en los sistemas de navegación se ve sustentada dado que la frecuencia de disparo de muchas neuronas estriatales se encuentra modulada por movimientos egocéntricos, cuando se registran ratas que se mueven libremente durante una tarea de memoria espacial en un laberinto (Mizumori, Cooper, Leutgeb, & Pratt, 2000; Yeshenko et al., 2004). Muchas de estas neuronas estriatales son sensitivas al movimiento y parecen estar relacionadas con los componentes de velocidad y aceleración (Yeshenko et al., 2004); además de que se ha observado un incremento de disparo relativo en las neuronas estriatales asociadas a la dirección de la cabeza cuando el animal explora un ambiente (Mizumori et al., 2000).

La información procesada acerca de movimientos específicos o secuencias de movimientos, modulan la expresión de campos de lugar estriatales, siendo más sensibles al reconocimiento del cambio de un lugar de recompensa en un ambiente familiar, que los producidos por las neuronas hipocampales, por esta razón se les ha denominado como células de lugar del estriado (Mizumori et al., 2004; Yeshenko et al., 2004).

4. EL HIPOCAMPO

Otra estructura que participa en procesos cognitivos como el aprendizaje y la memoria es el hipocampo. Dicha estructura cerebral ha sido ampliamente estudiada desde que en 1957 fuese publicado el caso del paciente HM (siglas de Henry Molaison, utilizadas para proteger su privacidad), el cual fue sometido a una cirugía de extirpación bilateral del lóbulo temporal medial como tratamiento contra la epilepsia que sufría desde los 10 años. Dicha cirugía generó una severa amnesia anterógrada y permitió vincular al hipocampo con el procesamiento y almacenamiento de la información que da lugar a la memoria de largo plazo (Scoville & Milner, 1957).

4.1. Anatomía

El hipocampo recibe su nombre por su semejanza a un hipocampo o caballito de mar. Dicha estructura se encuentra ubicada dorsalmente en roedores y ventralmente en humanos. Esta estructura consta de tres divisiones citoarquitectonicamente distintas; El giro dentado (GD), el cuerno de Amón o *Cornu*

Ammonis (CA), que está subdividido en tres campos (CA1, CA2 y CA3) y el subículo (Figura 13). Las tres divisiones del hipocampo comparten la apariencia característica de tres capas que en una clasificación más antigua se consideraba la característica definitoria del llamado allocortex o allocorteza (Witter, 2012; Witter, Groenewegen, Lopes da Silva, & Lohman, 1989).

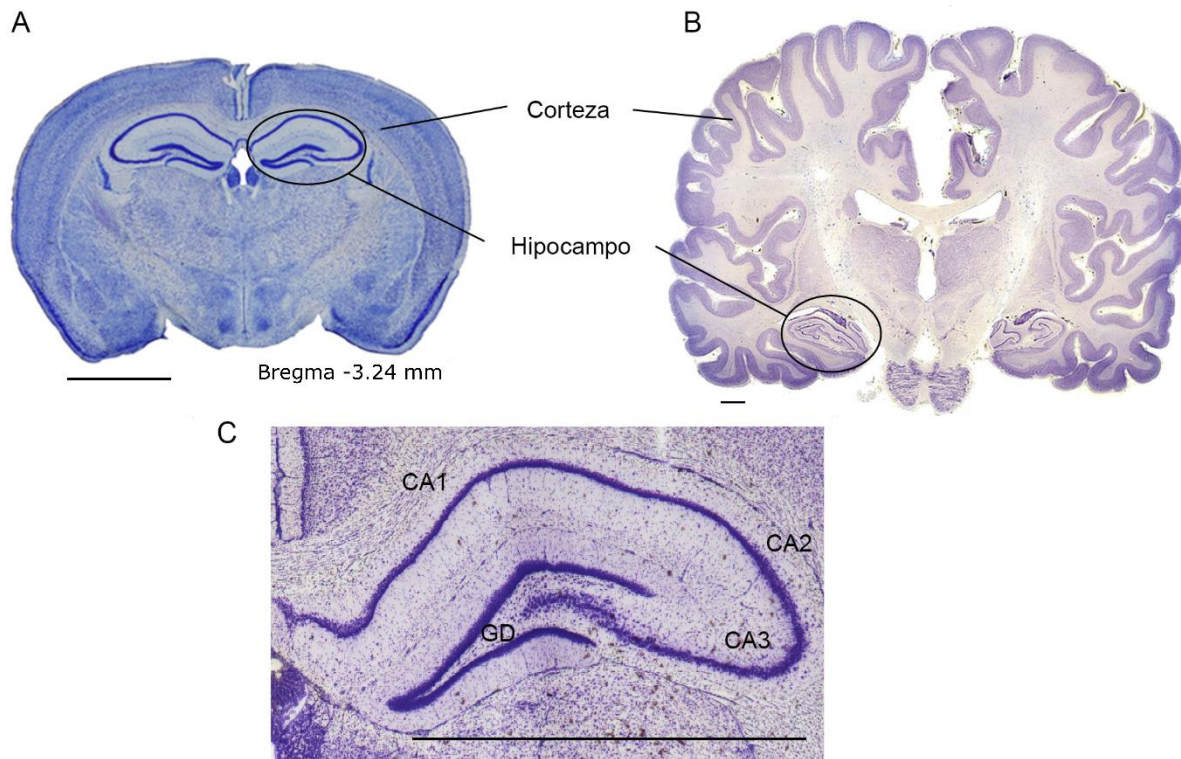


Figura 13. A. Sección coronal de un cerebro de rata teñido con violeta de cresilo mostrando el hipocampo en la región dorsal y la corteza. B. Sección coronal de un cerebro humano que muestra la corteza y el hipocampo ubicado en la región ventral. C. Acercamiento al hipocampo de rata en donde se señalan las regiones de CA1, CA2, CA3 y GD. Las barras de escala equivalen a 5 mm en todas las imágenes. Modificado de DeFelipe (2015) y Paxinos y Watson (2007).

4.1.1. Giro dentado

El giro dentado está comprendido por tres capas. La más superficial se denomina capa molecular, la cual se encuentra relativamente libre de células y una parte sustancial está cerca de la fisura hipocampal. Le sigue la capa celular principal o capa granular compuesta principalmente por apilamientos columnares densamente empaquetados de células granulares, se encuentra justo debajo de la capa molecular. La capa granular y la capa molecular forman una estructura en forma de "V" o "U",

dependiendo de la posición septo-temporal. La porción de la capa granular adyacente a CA1 y a la fisura hipocampal, se denomina banda interna (también es denominada banda superior, suprapiramidal, dorsal o encerrada) y la porción restante de la capa granular se denomina banda externa (también es denominada banda inferior infrapiramidal, ventral o libre). El punto donde se unen las dos bandas se llama gino, ápice o cresta. La capa de células granulares rodea la tercer capa del GD, llamada hilus o capa polimórfica (Cappaert, Van Strien, & Witter, 2015).

La capa molecular está ocupada principalmente por las dendritas de las células granulares, células en canasta y diversas células polimórficas, así como las arborizaciones axonales terminales de varias fuentes. Sin embargo, algunos tipos de células neuronales también se encuentran en la capa molecular (Cappaert et al., 2015). Las células en canasta que tienen un cuerpo celular multipolar o triangular y dan lugar a un axón que parece contribuir al plexo de la cesta dentro de la capa granular. Estas células se tiñen positivamente para el péptido intestinal vasoactivo (VIP por sus siglas en inglés vasoactive intestinal peptide) y tienen dendritas sin espinas que permanecen principalmente dentro de la capa molecular (Hazlett & Farkas, 1978; Kosaka, Hama, & Nagatsu, 1987; Kosaka, Hama, & Wu, 1984; Ribak & Seress, 1983). También se encuentran las células candelabro o célula axoaxónicas, llamadas así por el hecho de que su axón desciende desde la capa molecular hasta la capa granular, se colateraliza profusamente y luego termina exclusivamente en los segmentos axónicos iniciales de las células granulares (Kosaka, 1983; Somogyi et al., 1985; Soriano & Frotscher, 1989). Otro tipo celular son las células de la capa molecular asociadas a la vía perforante (MOPP por sus siglas en inglés molecular layer perforant path-associated cell) las cuales tienen su soma en la profundidad de la capa molecular, debido a su distribución axonal preferencial dentro de los dos tercios externos de la capa molecular (Han, Buhl, Lörinczi, & Somogyi, 1993).

El tipo celular principal del GD son las células granulares. Las estimaciones van desde aproximadamente 600 mil hasta 2.2 millones en el GD de rata (Amaral, Ishizuka, & Claiborne, 1990; Boss, Peterson, & Maxwell Cowan, 1985; Gaarskjaer, 1978; Seress & Pokorny, 1981; West, Coleman, & Flood, 1988). Esta variabilidad en el conteo es debida principalmente a la proliferación de células granulares, que continúa lentamente durante la vida adulta (neurogénesis) (Bayer, Yackel, & Puri, 1982; Bayer, 1982; Kempermann, Song, & Gage, 2015). Las células granulares del

GD tienen un cuerpo celular elíptico con un ancho de 10 μm y una altura de 16 μm aproximadamente (Figura 14). Cada célula granular está estrechamente unida a otras del mismo tipo y en la mayoría de los casos no hay ninguna envoltura glial que intervenga entre las células (Claiborne, Amaral, & Cowan, 1990; Desmond & Levy, 1982).

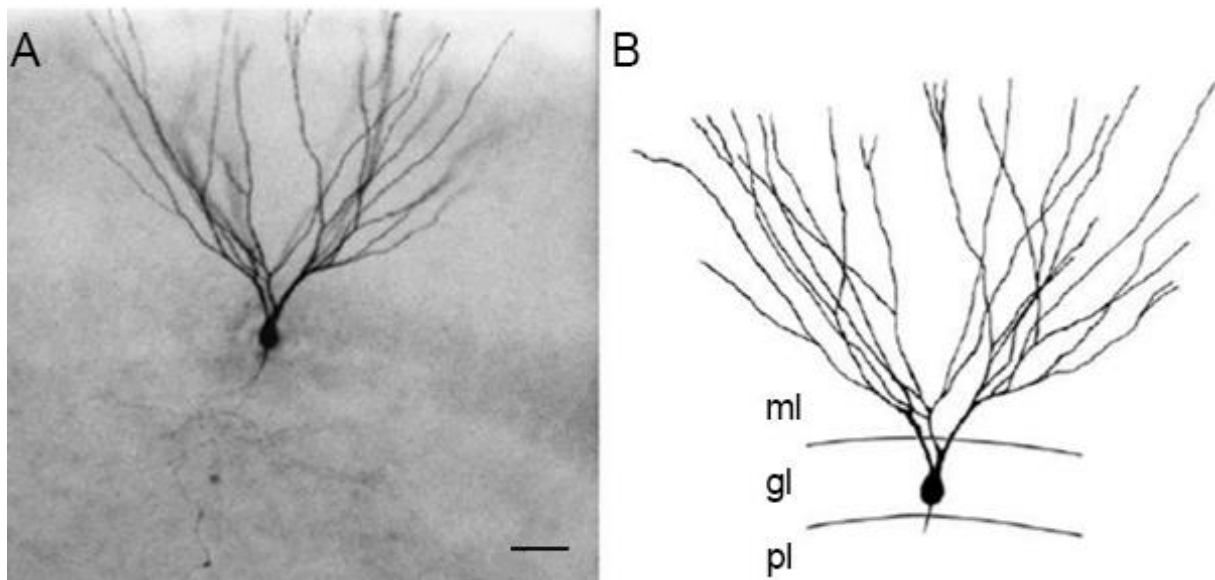


Figura 14. Neurona granular del giro dentado. A. fotomicrografía y B. Dibujo lineal de una célula granular prototípica que fue rellenada de Lucifer-yellow en una corte hipocampal. Las dendritas surgen principalmente de la superficie apical del cuerpo celular, y el axón emerge de la superficie basal. Las dendritas espinosas se extienden en la capa molecular hasta la fisura hipocampal, y el axón se colateraliza profusamente dentro de la capa polimórfica. Barra de calibración 1/4 25 mm para A y 20 mm para B. Modificado de Amaral, Scharfman y Lavenex (2007).

La célula granular tiene un árbol dendrítico espinoso muy característico en forma de cono con todas las ramas dirigidas hacia la porción superficial de la capa molecular; la mayoría de las puntas distales del árbol dendrítico terminan justo en la fisura del hipocampo o en la superficie ventricular (Claiborne et al., 1990; Desmond & Levy, 1982). Los árboles dendríticos de las células de granulares que están ubicados en la banda interna o superior, tienden a ser más grandes en promedio (aproximadamente 3.500 μm) que los de las células de la banda externa o inferior (aproximadamente 2.800 μm). Interesantemente las células ubicadas más profundamente en el GD, tienen un único proceso apical que asciende, sin ramificación, entre las células más superficiales, al llegar a la capa molecular, esta

dendrita comienza a ramificarse de manera similar a las de las neuronas más superficialmente posicionadas. Las dendritas de todas las células granulares de la capa molecular tienen numerosas espinas dendríticas, que aumentan de longitud conforme se alejan del soma (Stanfield & Cowan, 1979; Vuksic et al., 2008). Curiosamente, las células que se encuentran superficialmente en la capa granular a menudo muestran espinas somáticas en la superficie del soma que da cara a la capa molecular (Victoria Stirling & Bliss, 1978).

Otro tipo celular encontrado en la capa granular son las células en canasta, las cuales se ubican en una subregión de la capa granular denominada capa subgranular, la cual se ubica entre la capa más profunda de la capa granular y el hilus. Los somas de las células en canasta son de forma piramidal y reciben el nombre de células encanasta debido a que los axones de estas células forman plexos pericelulares que rodean los somas de las células granulares. Fueron descritas por Ramon y Cajal (1909) y sus somas de 25-35 μm de diámetro tienen una única dendrita apical principal sin espinas, la cual se dirige hacia capa molecular para luego dividirse en varias ramas sin espinas, además de dos o tres dendritas basales primarias que se ramifican y extienden en el hilus. También se ha descrito un segundo tipo de células en canasta, que tienen un árbol dendrítico restringido al hilus.

Dentro de la misma región subgranular se encuentran otros tipos celulares con formas de soma y configuraciones dendríticas claramente distintas. Algunos de estos son multipolares con varias dendritas sin espinas, que entran en la capa molecular y en el hilus, mientras que otros tienden a ser más fusiformes con una forma de distribución dendrítica similar. Todas estas células comparten características estructurales finas tales como núcleos con invaginaciones, citoplasma somático extenso con cuerpos de Nissl grandes y varillas intranucleares (Ribak & Seress, 1983; Seress & Ribak, 1983; Seress & Ribak, 1984; Seress & Ribak, 1985; Seress & Ribak, 1990). Estas células contribuyen a la inervación dentro de la capa celular granular o envían sus axones a la capa molecular (Freund & Buzsáki, 1996). Muchas de estas neuronas son inmunorreactivas para GABA y lo más probable es que modulen la actividad de las células granulares (Cappaert et al., 2015).

Con respecto a los tipos celulares que se encuentran en el hilus, es poco lo que se sabe sobre la mayoría de ellos. El tipo de célula más común, es la célula musgosa. Los cuerpos celulares de las células musgosas son grandes (25-35 μm) y son a

menudo de forma triangular o multipolar. Tres o más dendritas gruesas emergen del cuerpo celular y se extienden por largas distancias dentro del hilus, de vez en cuando una dendrita también se extiende a través de la capa granular y la capa molecular. Las dendritas de células musgosas prácticamente nunca salen de los confines del hilus. Cada dendrita principal se bifurca una o dos veces y generalmente da lugar a unas cuantas ramas laterales. La característica más distintiva de la célula musgosa es que todas las dendritas proximales están cubiertas por espinas muy grandes y complejas llamadas "excrecencias torneadas" que son los sitios de terminación de los axones de las fibras musgosas (Frotscher, Seress, Schwerdtfeger, & Buhl, 1991; Ribak, Seress, & Amaral, 1985). Aunque las excrecencias torneadas también se observan en las dendritas proximales de las células piramidales en CA3, son más densas en las células musgosas. Las dendritas distales de la célula musgosa tienen espinas pedunculadas típicas que son menos densas que en las células piramidales del hipocampo (Cappaert et al., 2015).

Otro tipo de células que también se encuentran en el hilus son las células de tipo fusiforme. Las dendritas de estos tipos de células se ubican principalmente paralelas a la capa granular y pueden extenderse para casi toda la longitud de una banda del GD. También hay un grupo de células pequeñas, redondas o multipolares en el hilus que dan lugar a un plexo estrellado de delgadas dendritas sin espinas y a un plexo axonal local ramificado. En algunos casos, se ha informado que estas células distribuyen axones en el CA, llegando incluso hasta el subículo (Sik, Penttonen, & Buzsáki, 1997). También se han descrito células multipolares de espina larga con un árbol dendrítico confinado al hilus, similar a las células descritas anteriormente, que se proyectan a los dos tercios externos de la capa molecular (Han et al., 1993). Aparentemente están invadidas por las fibras musgosas (Gulyás, Miettinen, Jacobowitz, & Freund, 1992) y distribuyen un axón principal en la sustancia blanca subyacente, lo que sugiere que estas células se proyectan fuera del hipocampo (Amaral, 1978; Freund & Buzsáki, 1996). Finalmente, también se han descrito células de candelabros que tienen un árbol dendrítico confinado al hilus y pueden recibir conexiones de las fibras musgosas. La mayoría de sus axones terminan en los segmentos axónicos iniciales de las células musgosas (Martínez, Lübke, Del Río, Soriano, & Frotscher, 1996).

4.1.2. El cuerno de Amón o *Cornu Ammonis*

El CA se encuentra dividido en tres regiones CA3, CA2 y CA1. Las regiones CA3 y CA2 se caracterizan a primera vista por tener células grandes mientras que el CA1 tiene células más pequeñas. Además de las diferencias en el tamaño de las células piramidales en CA3 y CA1, existe una clara diferencia de conexión. Las células piramidales del CA3 reciben entradas de la fibra musgosa del GD, no así las células piramidales del CA1. La región de CA2 es cuestión de controversia. Según lo definido originalmente por Lorente de Nó, era una zona estrecha de células interpuestas entre CA3 y CA1 que tenían cuerpos celulares grandes como CA3, pero no reciben inervación de las fibras musgosas. La evidencia reciente indica que efectivamente hay una CA2 estrecho (250 μm aproximadamente), localizado distal al bulbo final de la proyección de las fibras musgosas. Esta región tiene diferencias en sus conexiones y sus funciones en comparación con las otras regiones del CA (Jones & McHugh, 2011; Piskorowski & Chevaleyre, 2012).

El CA también posee una organización laminar, la cual es generalmente similar para todas sus regiones. La capa celular principal se denomina capa piramidal o *stratum pyramidale*. La capa anexa, relativamente libre de células y situada más profundamente que la capa piramidal, se llama *stratum oriens*. Únicamente en la región de CA3, se encuentra una estrecha zona acelular, llamada *stratum lucidum*, la cual se encuentra justo encima de la capa celular piramidal, y está ocupada por los axones de las fibras musgosas provenientes del GD. En el extremo distal del *stratum lucidum* hay un ligero engrosamiento de la capa donde las fibras musgosas se doblan temporalmente. Este "bulbo final" marca el borde entre CA3 y CA2. Debido a que el haz de fibras musgosas no termina de forma abrupta, es posible que dentro de esta región de transición entre CA3 distal y CA2 esté presente una población mixta de CA3 conectada a fibra musgosa y neuronas CA2 no conectadas (Cappaert et al., 2015).

Neurona piramidal de CA3

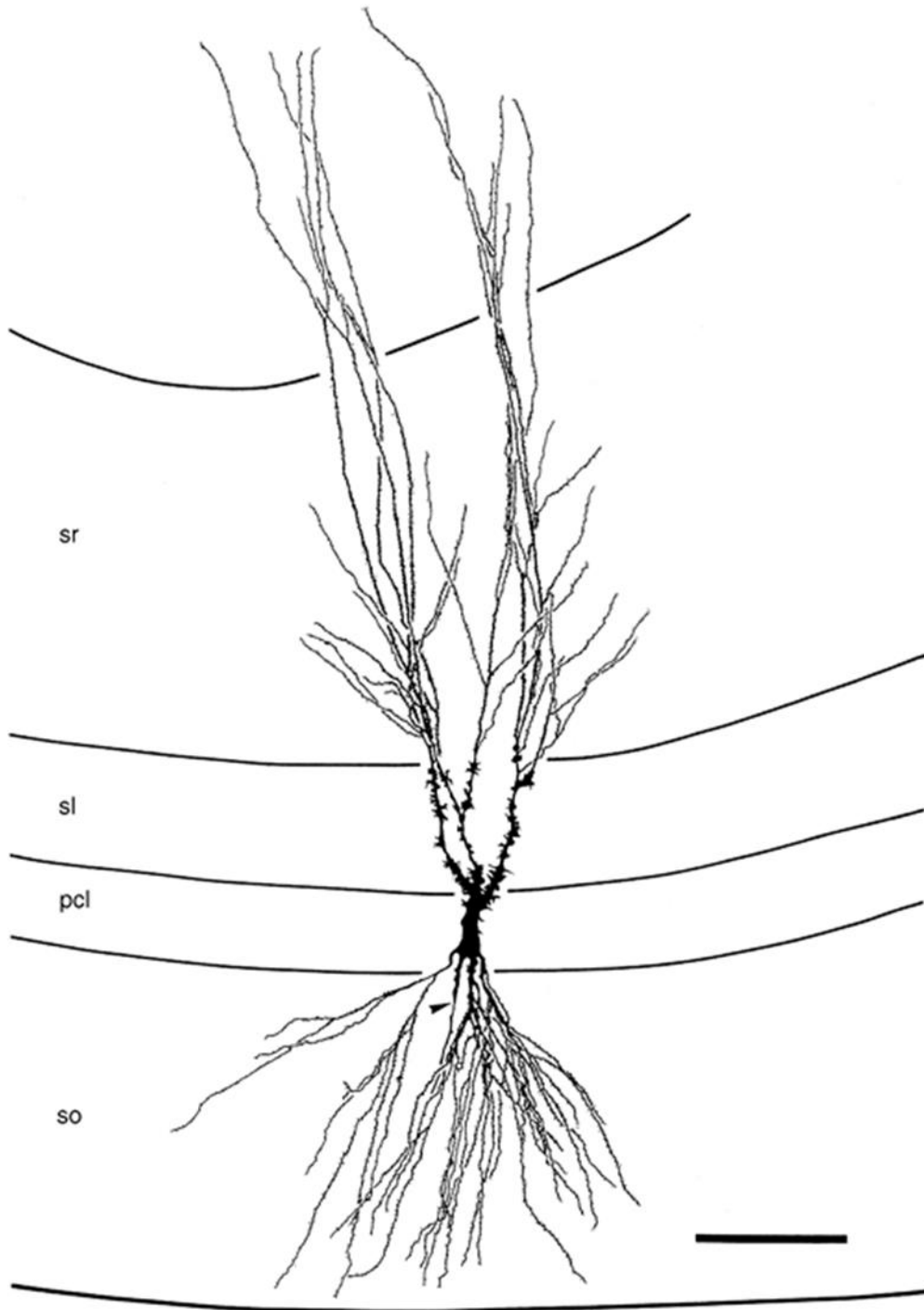


Figura 15. Dibujo en cámara lucida de una neurona piramidal de CA3 localizada en la porción media del campo. Dado que esta neurona se encuentra fuera de la zona del haz de fibras musgosas infrapiramidal, la mayoría de las excrescencias torcidas se localizan en las dendritas proximales apicales. El axón de esta neurona está indicado por una punta de flecha. pcl, capa de células piramidales; sl, stratum lucidum; so, stratum oriens; sr, stratum radiatum. Barra de escala equivalente a 100 μ m. Modificado de Andersen, Morris, Amaral, Bliss y O'Keefe (2009).

Sobre el *stratum lucidum* del CA3 y sobre la capa piramidal de CA2 y CA1, se encuentra el *stratum radiatum*. En esta capa se encuentran las conexiones de asociación (entre las neuronas del CA3) y las conexiones colaterales de Schaffer (CA3 hacia CA1). La parte más superficial del hipocampo se denomina *stratum lacunosum moleculare*, en el que las fibras de la vía perforante procedentes de la corteza entorrinal se desplazan y terminan; a esta región también llegan conexiones con otras regiones como por ejemplo el núcleo reuniens en la línea medial del tálamo que conecta con el CA1 (Cappaert et al., 2015).

El principal tipo neuronal del CA es la neurona piramidal, que constituye la gran mayoría de las neuronas en la capa piramidal. Generalmente, este tipo neuronal tiene un árbol dendrítico basal que se extiende dentro del *stratum oriens* y un árbol dendrítico apical que se extiende hasta la fisura hipocampal. Las dendritas de las neuronas piramidales del CA3 próximas al GD muestran excrescencias torneadas (es decir, los componentes postsinápticos de las sinapsis entre las fibras musgosas de las células granulares del GD y las dendritas de las neuronas piramidales del CA3). Estas excrescencias se observan en las dendritas basales y apicales, a diferencia de las neuronas del CA3 más alejadas del GD (Figura 15), donde estas excrescencias se ubican principalmente en las dendritas apicales; esto implica que existe un mayor aporte, por parte de las fibras musgosas, a estas neuronas en particular (Cappaert et al., 2015; Freund & Buzsáki, 1996; Klausberger, 2009; Scorcioni, Lazarewicz, & Ascoli, 2004; Somogyi & Klausberger, 2005; Spruston, 2008).

A diferencia del CA3, las neuronas piramidales del CA2 aparentemente no reciben conexiones de las fibras musgosas y carecen de las excrescencias torneadas (Ishizuka, Cowan, & Amaral, 1995; Lorente de Nò, 1934). El CA2 contiene una población mixta de neuronas grandes, similares a las del CA3, así como células con árboles dendríticos más pequeños, parecidas a las neuronas piramidales del CA1 (Figura 16). Las dendritas apicales de las neuronas piramidales CA2 se ramifican más en el *stratum lacunosum-moleculare*; mientras que en el CA3, las dendritas apicales se ramifican más en el *stratum radiatum* (Ishizuka et al., 1995). La mayor parte de la longitud dendrítica de las neuronas piramidales del CA2 se encuentra en el *stratum oriens* (38%), aproximadamente el 31% en el estrato radiactivo y el 31% en el estrato *lacunosum-moleculare*, mientras que en el CA1 las células piramidales tienden a ser más pequeñas y más homogéneas que las del CA3 y el CA2. Los árboles dendríticos

de las células piramidales del CA1 tienen una longitud media de 13.5 mm (Ishizuka et al., 1995) y 47% de la longitud dendrítica se encuentra en el *stratum radiatum*, 34% en el *stratum oriens* y el 18% en el *stratum lacunosum-moleculare* (Figura 17). Las células piramidales del CA1 reciben 92% de su entrada GABAérgica en las dendritas (Klausberger, 2009). La porción proximal de la dendrita apical de las células piramidales, de hasta 200 μm de distancia del soma, recibe el aporte preferencial de las interneuronas GABAérgicas, mientras que las porciones más distales reciben densidades crecientes de entradas excitatorias (Papp, Leinekugel, Henze, Lee, & Buzsáki, 2001). Al menos dos tipos de neuronas piramidales se pueden diferenciar quimioarquitectónicamente en el CA1; la subcapa superficial que es positiva para calbindina y la subcapa calbindina negativa que se ubica más profundamente en la capa piramidal (Somogyi, 2010).

Existen varios tipos de células no piramidales en el *stratum oriens*, el *stratum radiatum* y el *stratum lacunosum-moleculare* del CA. La gran mayoría de estas interneuronas son inmunorreactivas para marcadores de GABA. Estas interneuronas GABAérgicas, se diferencian en al menos 8 subclases caracterizadas por diferentes marcadores como parvalbúmina, calretinina, calbindina, NPY, somatostatina, colecistocinina, VIP y NOS (Jinno & Kosaka, 2006).

En CA3, la mayoría de las neuronas GABAérgicas son positivas para calbindina o NPY. Lo mismo sucede en el CA1, con una proporción adicional de neuronas positivas para parvalbúmina y somatostatina. Todas estas interneuronas químicamente definidas muestran diferencias en sus densidades a lo largo del eje septo-temporal (Jinno & Kosaka, 2006). Existe una clara correlación entre las clases definidas químicamente y las clases de interneuronas definidas electrofisiológicamente (Jinno & Kosaka, 2006), aunque una serie de revisiones recientes han contribuido sustancialmente a nuestra comprensión de cómo se relacionan las dos (Klausberger & Somogyi, 2008).

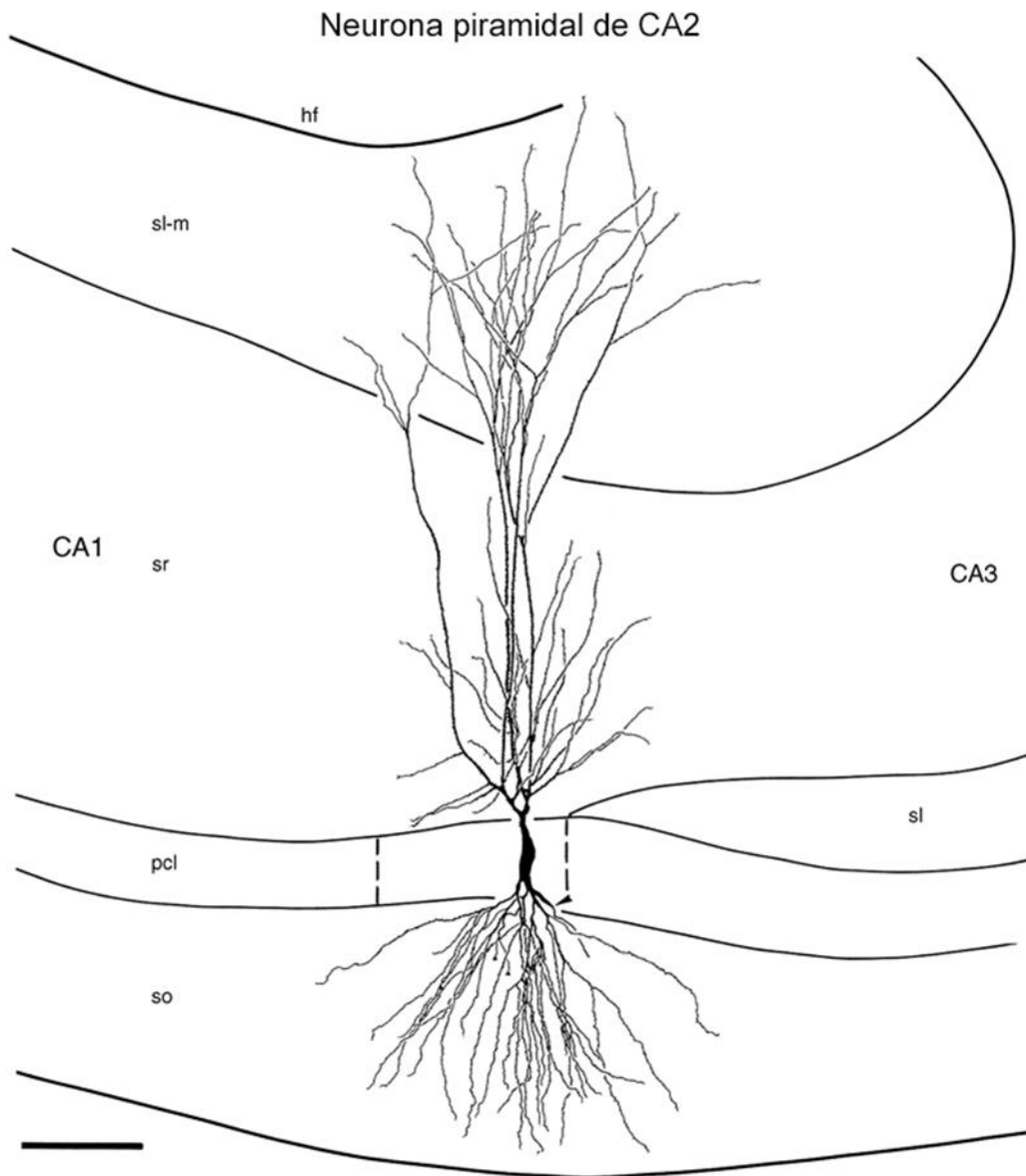


Figura 16. Dibujo en cámara lucida de una neurona piramidal de CA2. Aunque el tamaño y las características generales de esta neurona son similares a las neuronas de CA3, no hay excrescencias torneadas en las dendritas proximales apicales. El axón de esta neurona está indicado por una punta de flecha. CA1, región de CA1; CA3, región de CA3; Hf, fisura hipocampal; pcl, capa de células piramidales; sl, stratum lucidum; sl-m, stratum lacunosum-moleculare; so, stratum oriens; sr, stratum radiatum. Bar = 100 μ m. Modificado de Andersen et al. (2009).

Neurona piramidal de CA1

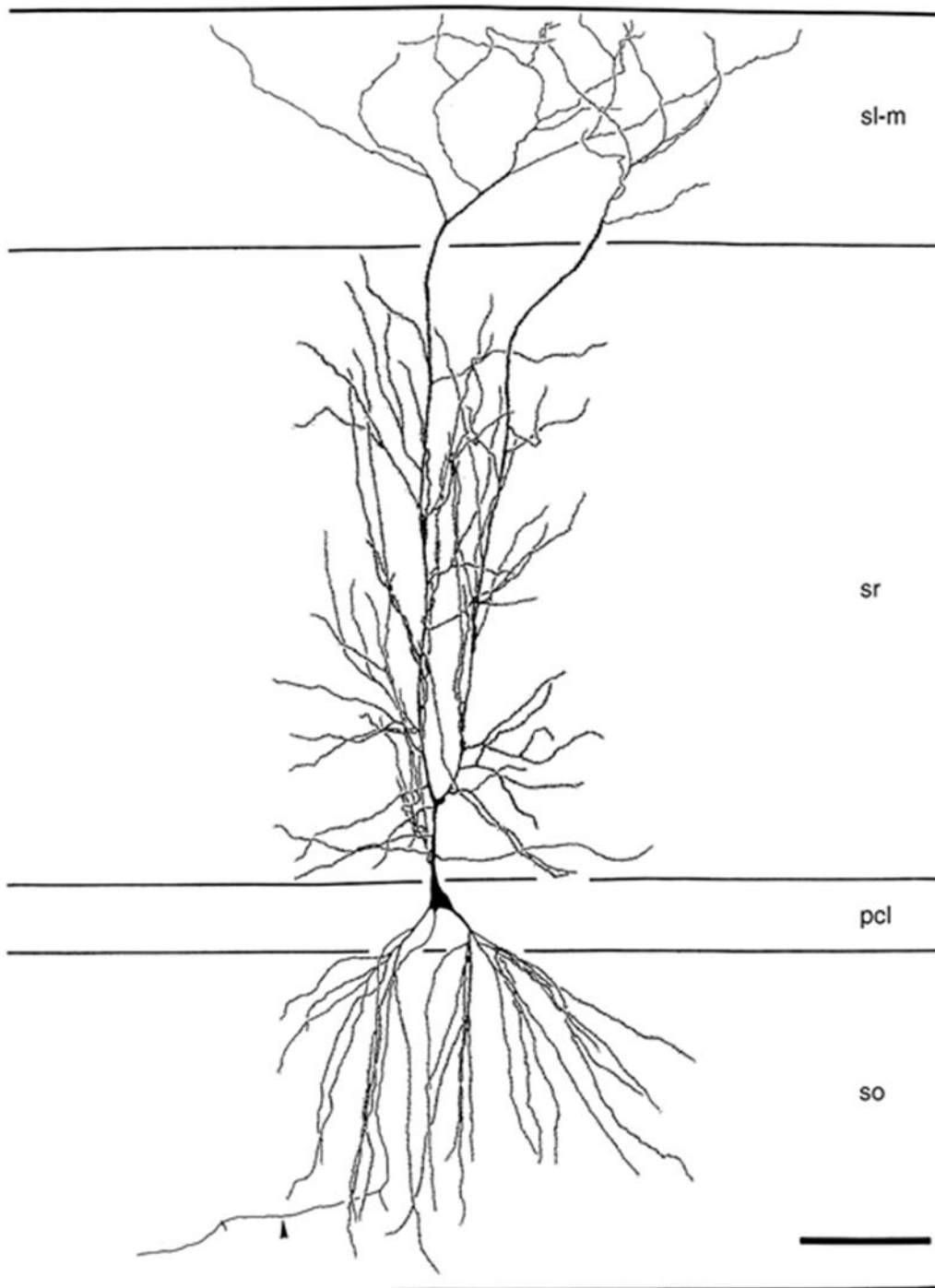


Figura 17. Dibujo en cámara lucida de una neurona piramidal de CA1 de la porción media del campo. Las ramas laterales se originan de las dendritas primarias en toda la extensión del stratum radiatum. Obsérvese las trayectorias curvas e irregulares de las ramas dendríticas en el stratum lacunosum-moleculare. El axón de esta neurona está indicado por una punta de flecha. CA1, región de CA1; CA3, Región de CA3; Hf, fisura hipocampal; pcl, capa de células piramidales; sl, stratum lucidum; sl-m, stratum lacunosum-moleculare; so, stratum oriens; sr, stratum radiatum. Bar = 100 μ m. Modificado de Andersen et al. (2009).

4.2. Conectividad

Las distintas capas que se observan en el hipocampo, no solo están caracterizadas por el tipo de células que las conforman sino, principalmente por las conexiones que allí arriban. Es esta variedad de conexiones las que explican el papel de procesador multimodal que tiene el hipocampo. La principal entrada al hipocampo es un circuito prominente y topológicamente dispuesto entre las cortezas parahipocámpales y el hipocampo; esta vía que conecta a la corteza entorrinal (CE) y que entra en el hipocampo se conoce como la vía perforante. De acuerdo con la visión estándar, sólo las proyecciones de la capa II de la CE se extienden a toda la extensión transversal del GD y del CA3. Pero realmente, las capas III, V y VI de la CE (Figura 18), también contribuyen a esta proyección, aunque en menor medida (van Strien, Cappaert, & Witter, 2009).

Específicamente, la CE lateral proyecta al tercio externo de la capa molecular del GD, y la CE medial proyecta al tercio medio de esta capa. Un patrón similar de convergencia se observa en el CA3, donde la proyección de la CE lateral termina en la parte superficial del stratum lacunosum-moleculare y la proyección de la CE medial termina en la parte profunda de esta capa (Sporns & Tononi, 2007). Además de esta convergencia, también se puede observar una divergencia de las proyecciones de la CE con el GD y el CA3, ya que las neuronas de la capa II proyectan tanto al GD como al CA3 (Steward, 1976; Tamamaki & Nojyo, 1993).

Aunque la vía perforante es la entrada de información al hipocampo más reconocida, la CE también presenta eferencias hacia el CA1 y el subículo, sin embargo, esta conexión es diferente. El origen de la proyección de la CE al stratum lacunosum-moleculare del CA1 y a la capa molecular del subículo, se encuentra en la capa III, aunque también, otras capas (II, V y VI) contribuyen en menor medida a esta proyección (Cappaert et al., 2015; van Strien et al., 2009).

La conectividad dentro del hipocampo tiene como primer paso una proyección unidireccional desde el GD hacia el CA3 conocida como las fibras musgosas. Como siguiente paso se encuentran las colaterales de Schaffer, que se originan en el CA3 y proyectan al CA1. Una mirada detallada a estas conexiones muestra una topología interesante a lo largo del eje transversal. La parte distal del CA3 proyecta al CA1 proximal y, a la inversa, la parte proximal del CA3 proyecta al CA1 distal. La topografía de las proyecciones que surgen de las porciones medias en el eje próximo-distal del

CA3 se encuentran entre estos dos patrones de proyección (Ishizuka, Weber, & Amaral, 1990; Laurberg, 1979; Laurberg & Sørensen, 1981; van Strien et al., 2009).

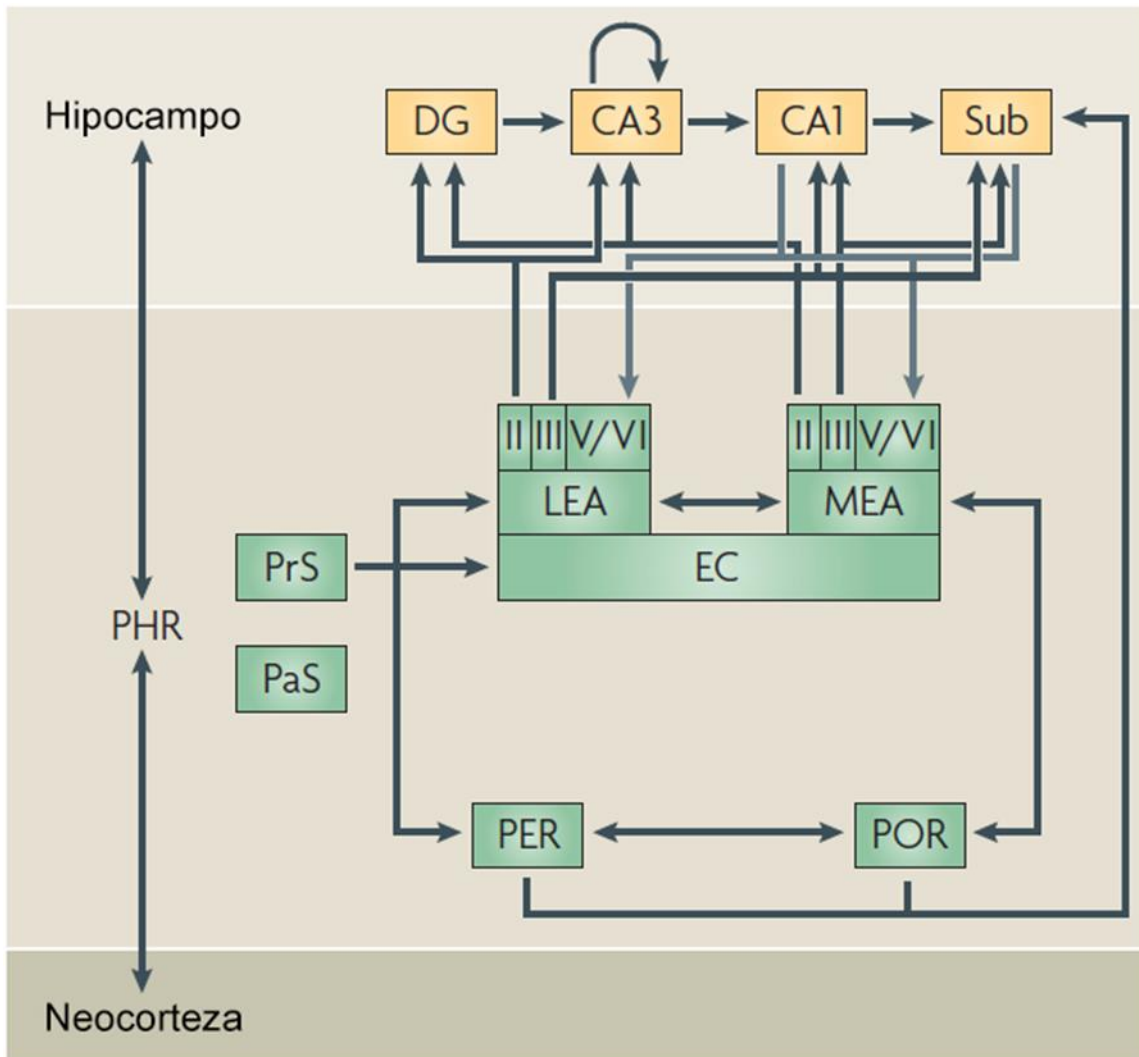


Figura 18. Esquema de los circuitos parahipocampal-hipocampo, las proyecciones neocorticales están dirigidas a la región parahipocampal (PHR), que a su vez proporciona la principal fuente de información para el hipocampo. En la PHR, se observan dos corrientes de proyección paralelas: la corteza perirrinal (PER) proyecta a la corteza entorrinal lateral (LEA) y la corteza postrrinal (POR) proyecta a la corteza entorrinal medial (MEA). La corteza entorrinal (CE) retoma las conexiones de la PER y la POR. Además, la CE recibe información del presubiculum (PrS). La CE es la fuente de la vía perforante, que se proyecta a todas las subregiones de la formación del hipocampo. La capa II de la entorrinal proyecta al giro dentado (GD) y CA3, mientras que la capa III proyecta a CA1 y el subículo (Sub). La vía polisináptica, una versión extendida de la vía tradicional trisináptica, describe una ruta unidireccional que conecta todas las subregiones del hipocampo secuencialmente. En resumen, las células granulares del GD dan lugar a la vía de las fibras musgosas, que apunta hacia el CA3. Las colaterales de Schaffer del CA3 proyectan hacia el CA1 y, por último, el CA1 proyecta hacia el Sub. La salida del hipocampo surge en el CA1 y el Sub y se dirige a la PHR, en particular a las capas profundas de la CE. Los números romanos indican la capas corticales (van Strien et al., 2009).

El último paso es la proyección del CA1 al subículo. La parte proximal de la capa de células piramidales del CA1 proyecta hacia el subículo distal, mientras que el CA1 distal lo hace hacia la parte proximal del subículo (Amaral, Dolorfo, & Alvarez-Royo, 1991; Naber, Lopes da Silva, & Witter, 2001; Swanson, Sawchenko, & Cowan, 1981; Tamamaki & Nojyo, 1990; Van Groen & Wyss, 1990).

Las principales proyecciones de salida del hipocampo son las conexiones que tienen el CA1 y el subículo con la CE, estas conexiones terminan principalmente en las capas profundas de la CE. Sin embargo, varios autores han reportado proyecciones directas del CA1 y el subículo a las capas superficiales tanto de la CE lateral como de la CE medial (Cenquizca & Swanson, 2007; Swanson, Wyss, & Cowan, 1978).

4.3. Participación del hipocampo en el aprendizaje y la memoria

Los primeros indicios sobre la participación del hipocampo en el aprendizaje y la memoria, provienen de estudios con pacientes que presentaban amnesia luego de diferentes situaciones que repercutían en un daño cerebral. El más famoso de estos casos es el del paciente H. M. que sufría de epilepsia severa y cuyas convulsiones eran resistentes a los tratamientos antiepilépticos. Después de una cirugía bilateral (en la que se removió gran parte del lóbulo temporal incluyendo dos terceras partes del hipocampo y del giro hipocampal), sus convulsiones se redujeron, sin embargo, el paciente presentó una profunda amnesia global que persistió hasta su muerte (Scoville & Milner, 1957). El déficit de memoria de H.M. se observó como una incapacidad para recordar material o episodios experimentados después de la operación (amnesia anterógrada); de igual forma, también incluyó una incapacidad para recordar información experimentada durante cierto período de tiempo antes de la cirugía (amnesia retrógrada) (Andersen et al., 2009). Otros estudios también realizados en humanos demostraron que eventos isquémicos que resultan en un daño permanente y generalizado del CA1, producen un fuerte deterioro de la memoria (Zola-Morgan, Squire, & Amaral, 1986); así como el deterioro inducido por el alcoholismo y la deficiencia dietaria de tiamina comúnmente denominada psicosis de Wernicke-Korsakoff (Andersen et al., 2009).

Estos efectos amnésicos observados en pacientes estimularon los esfuerzos para diseñar modelos animales que también presentaran amnesia. Los primeros

estudios fueron realizados en primates y examinaron los efectos de varias lesiones del lóbulo temporal en tareas conductuales, como la alternancia tardía y la respuesta tardía (Correll & Scoville, 1967; Orbach, Milner, & Rasmussen, 1960). Por otro lado, también se analizó el desempeño conductual de ratas con lesiones hipocampales en la adquisición, retención y extinción de la información espacial versus no espacial, el aprendizaje contextual, la memoria de reconocimiento, el aprendizaje de discriminación concurrente y el aprendizaje representacional complejo (discriminación condicional y aprendizaje de patrones negativos) (Jarrard, 1993).

Dos teorías han dominado la investigación sobre la función del hipocampo durante los últimos años. La primera, es que está involucrado en la formación de recuerdos de hechos cotidianos y de eventos que pueden ser conscientemente recordados, lo cual es denominado como memoria declarativa (Squire, 1992; Squire, Stark, & Clark, 2004). La segunda surge de las observaciones realizadas durante el registro de la actividad eléctrica neuronal en roedores, y propone que el hipocampo está implicado en la memoria espacial y, más específicamente, en la formación de mapas cognitivos y su uso en la navegación a través del espacio (Burgess, Maguire, & O'Keefe, 2002; O'Keefe & Nadel, 1978). Sin embargo, una tercer teoría ha cobrado interés recientemente; la denominada teoría de la memoria episódica, propone que el hipocampo participa en el procesamiento y almacenamiento de un evento único o de una secuencia temporal de eventos que comprenden colectivamente un episodio (Andersen et al., 2009).

4.3.1. Teoría de la memoria declarativa

Según la primera teoría la principal función del hipocampo es la formación de la memoria, de la cual, esta estructura posee un rol selectivo en la mediación de la memoria de hechos y eventos, llamada “memoria declarativa.” Este es el tipo de memoria que en seres humanos puede ser recordada conscientemente. Aunque el hipocampo es parte esencial de este tipo de memoria, es solo una parte de un mayor número de estructuras que comprenden el “sistema de memoria del lóbulo temporal medial.” Aunque los componentes de este sistema pueden tener funciones distintas, todos ellos operan colectivamente para mediar en la formación y almacenamiento inicial de memorias declarativas. Por último, el papel del hipocampo en este tipo memoria es por tiempo limitado; la información almacenada se reorganiza

gradualmente a medida que pasa el tiempo después del aprendizaje. El hipocampo contribuye a un proceso de consolidación a nivel de sistemas dependiente del tiempo, de tal forma que, una vez completado, las trazas de memoria a largo plazo se almacenan en la corteza y la actividad neuronal en el hipocampo ya no es necesaria y no está involucrada durante la evocación (Andersen et al., 2009; Squire, 1992; Squire et al., 2004).

4.3.2. Teoría del mapa cognitivo

Por otro lado, la segunda teoría denominada “teoría del mapa cognitivo”, tiene sus inicios en el descubrimiento de las células de lugar del hipocampo. Estas células son neuronas que se caracterizan por presentar patrones de disparo que generalmente aumentan de un nivel bajo a otro más alto, cuando el animal en libre movimiento, se mueve a través de una región particular del espacio (O'Keefe & Dostrovsky, 1971). Posteriormente esta teoría se ve afianzada por el descubrimiento de otra categoría de células sintonizadas espacialmente, las cuales son denominadas células de dirección de la cabeza, estas son neuronas que incrementan su tasa de disparo cuando la cabeza de la rata apunta a una dirección particular en un entorno familiar; independientemente de la ubicación del animal en dicho entorno (Taube, 1998; Taube & Schwartzkroin, 1987).

Esta teoría está basada en el concepto de representación espacial, por lo que plantea que el cerebro de los vertebrados posee un sistema neuronal llamado el sistema local, el cual organiza la codificación y la representación de los estímulos percibidos con respecto a un marco espacial alocéntrico o también denominado mapa cognitivo; así, las ubicaciones espaciales de los puntos de referencia se almacenan en este mapa durante la exploración. Este sistema local, que se encuentra ubicado en el hipocampo, es utilizado para la navegación espacial (O'Keefe & Nadel, 1978). Los diferentes componentes anatómicos del hipocampo y demás estructuras relacionadas están implicados en la mediación de diferentes aspectos del procesamiento de la información espacial, por medio de la participación de distintas clases de neuronas que responden al lugar, a la dirección, a la vista y al movimiento del animal en el espacio (Andersen et al., 2009; O'Keefe & Dostrovsky, 1971; Taube, 1998).

Según la teoría del mapa cognitivo, el mapeo espacial evolucionó como uno de los múltiples sistemas de memoria del cerebro de los vertebrados, con sus propias

leyes de aprendizaje características de este sistema. Otros tipos de aprendizaje y memoria incluyen mecanismos asociativos más simples y ciertas tareas geométricas que pueden ser adquiridas usando estrategias de "taxón". Estos otros sistemas obedecen leyes de aprendizaje que son diferentes de las del sistema local (Andersen et al., 2009; Nadel, 1991; O'Keefe & Nadel, 1979).

A diferencia de la limitación temporal del hipocampo en la teoría de la memoria declarativa la versión original del mapa cognitivo dice que los mapas espaciales son almacenados exclusivamente en el hipocampo, en el que se lleva a cabo tanto la codificación inicial como el almacenamiento a largo plazo. Aunque la información almacenada en esta estructura interactúa con la información almacenada en otros circuitos, con el propósito de guiar el comportamiento de navegación (Andersen et al., 2009; Nadel & Moscovitch, 1997; O'Keefe & Nadel, 1978).

Aunque el mapa cognitivo es puramente espacial en los animales, su funcionamiento es aplicable al almacenamiento y la evocación de memorias episódicas y lingüísticas en seres humanos, gracias a la lateralización existente en nuestros cerebros; de esta forma el hipocampo derecho mantiene una función primordialmente espacial, mientras que el hipocampo izquierdo incorpora un sentido temporal y de entidades lingüísticas, por lo que juntos proporcionan la base para mediar la memoria episódica (Andersen et al., 2009; O'Keefe & Nadel, 1978; Squire, 2004).

4.3.3. Teoría de la memoria episódica

Existe una tercera y nueva teoría sobre el funcionamiento hipocampal en el que hay un interés creciente, esta dice que el hipocampo participa en ciertos aspectos de la memoria episódica (en los seres humanos) y en una memoria llamada "de tipo episódico" (en animales) (Andersen et al., 2009; O'Keefe & Nadel, 1978; Squire, 2004). La memoria episódica, que fue introducida por primera vez por Tulving (1972) y posteriormente fue elaborada de varias maneras (Schacter & Tulving, 1994; Tulving, 1983, 2005), este tipo de memoria se refiere al procesamiento y almacenamiento de un evento único o a una secuencia temporal de eventos que comprenden colectivamente un episodio. Como se definió originalmente, el contenido de la memoria episódica es una representación mental de "que" sucedió durante un evento, así como, "dónde" sucedió y "cuándo" ocurrió (Tulving, 1972, 1983). De esta forma,

recordar lo que hicimos en vacaciones, adónde fuimos y con quién estuvimos, sería un ejemplo de memoria episódica. Esto contrasta con la memoria semántica (conocimiento factico o de hechos), la cual no está vinculada a ningún contexto temporo-espacial (Andersen et al., 2009).

El hipocampo forma parte de una red de estructuras cerebrales que median la codificación y recuperación automática de los eventos y los contextos en los que ocurren (memoria tipo episódica). Distintas estructuras cerebrales, incluyendo el lóbulo prefrontal, participan en aspectos diferentes y más voluntarios, de este tipo de memoria. Esto significa que las "relaciones espacio-temporales" de la definición de Tulving no pueden ser deliberadamente seleccionadas o ignoradas. La automaticidad implica que los seres humanos normalmente no pueden "apagar el sistema" y decidir voluntariamente a qué eventos prestan atención o a qué características del contexto en el que se encuentran, son codificadas (Martin, Wiggs, & Weisberg, 1997; Morris & Frey, 1997).

Otra característica de la teoría de la memoria episódica es que las regiones del hipocampo (por ejemplo, CA1, CA3, GD) están implicadas diferencialmente en componentes dissociables de la memoria de tipo episódico, tales como la separación y el completamiento de patrones (Andersen et al., 2009).

Por último, es necesario decir que la memoria episódica y la memoria tipo episódica se distinguen en que sólo la primera requiere de una conciencia "autonoética"; es decir, de la capacidad humana de ubicarse mentalmente en el pasado, en el futuro, o en situaciones imaginarias). En la actualidad, esto no puede ser estudiado neurobiológicamente, además de que la conciencia también puede ser un atributo de la memoria tipo episódica en animales, pero no necesariamente esta debe ser autonoética (Andersen et al., 2009; Tulving, 1983).

5. GENES DE EXPRESIÓN INMEDIATA TEMPRANA

Son muchos los genes que podrían estar involucrados en la consolidación de la memoria, pero entre estos destacan los genes de expresión inmediata temprana (IEG, por sus siglas en inglés Immediately early gene). Estos genes tienen como

principal característica que se expresan independientemente de la síntesis de nuevas proteínas por lo cual al ser activadas las células neuronales bajo la administración de inhibidores de síntesis de proteínas (por ejemplo anisomicina o cicloheximida) son los únicos en transcribirse; al mismo tiempo estos genes presentan una expresión en un tiempo muy corto, tanto en su transcripción como en su traducción, lo cual los convierte en una herramienta muy efectiva para el análisis de la activación neuronal (Okuno, 2011; Ramírez-Amaya et al., 2005; Worley et al., 1990).

Los IEG's se pueden diferenciar en dos tipos: los factores de transcripción como c-Fos, c-jun, Zif268 y Egr-3, de estos c-Fos es el más conocido puesto que ha sido ampliamente utilizado en el estudio de la activación de diferentes estructuras cerebrales, dado que se expresa en respuesta a la actividad neuronal indicando en que zonas se induce la actividad transcripcional en el cerebro (Kovacs, 1998; Senba & Ueyama, 1997); por otro lado también existen IEG que codifican para proteínas efectoras como Arc, Narp, Homer, Cox-2 y Rheb, que participan activamente en los cambios plásticos que sufre la neurona después del aprendizaje.

Entre estos IEG efectores se encuentra Arc (por sus siglas en inglés Activity-Regulated Cytoskeletal-Associated Protein), también llamado Arg3.1 un gen descubierto en paralelo en 1995 por Link et al. y Lyford et al. Dicho IEG tiene la particularidad de ser fuertemente activado por la actividad neuronal; su ARNm se distribuye rápidamente a las dendritas que han sido activadas y ahí se localiza en regiones discretas que han recibido estimulación sináptica directa, iniciando luego su traducción (Link et al., 1995; Lyford et al., 1995; Steward, Wallace, Lyford, & Worley, 1998). Otra característica importante de este gen es que da origen a una proteína de alta homología con la proteína del citoesqueleto α -espectrina y coprecipita con F-actina (principal componente de los microfilamentos) lo cual indica que posiblemente participe en procesos donde se produzcan modificaciones estructurales de la neurona; además de que su localización en estas dendritas es dependiente de la activación del receptor NMDA (Steward & Worley, 2001).

6. ARC COMO INDICADOR DE ACTIVIDAD

La participación de Arc en la consolidación de la memoria ha sido demostrada al administrar directamente en el hipocampo secuencias de oligodesoxinucleótidos antisentido (ODN) para inhibir su expresión. Este procedimiento induce un deterioro en la potenciación a largo plazo y en el aprendizaje espacial (Guzowski et al., 2000; Guzowski, Setlow, Wagner, & McGaugh, 2001). De la misma forma, la administración de estos ODN antisentido demostró que la actividad de Arc es necesaria en la amígdala lateral para la consolidación de la memoria del condicionamiento al miedo pavloviano (Ploski et al., 2008). Lo cual demuestra la importancia de este IEG efector en la consolidación de diferentes tipos de memoria adjudicadas a diferentes estructuras.

La expresión de Arc es altamente dinámica y es inducida por la actividad sináptica con patrones robustos, los cuales incluyen estímulos naturales, convulsiones, LTP y procesos relacionados con la memoria (Guzowski, 2002; Guzowski et al., 2000; Guzowski et al., 2001; Lyford et al., 1995; Ramírez-Amaya et al., 2005). Se ha demostrado también que ante distintos estímulos estresantes la expresión de Arc en el hipocampo esta principalmente influida por el contenido espacial de la tarea y no por el tipo de estímulo, vinculando a Arc exclusivamente a la activación neuronal provocada por el procesamiento de información (Ons, Marti, & Armario, 2004). Por último, la proporción de células que expresan la proteína Arc en el hipocampo y la corteza de ratas adultas después de la exploración espacial, es la misma que las células que expresan el ARNm de este gen ante dicha experiencia conductual (Ramírez-Amaya et al., 2005).

Arc es selectivamente inducido en células positivas para el marcador de la proteína nuclear específica de neuronas NeuronN (NeuN) y no en células positivas para la proteína glial fibrilar acida (GFAP, por sus siglas en inglés glial fibrillary acidic protein) demostrando ser un gen que se expresa de forma exclusiva en neuronas de ratas que realizaron la conducta de exploración. Además, la administración de choques masivos electroconvulsivos (MECS, por sus siglas en inglés maximal electroconvulsive shock), aumenta significativamente la expresión de Arc únicamente en neuronas (Figura 19) (Vazdarjanova et al., 2006). Sin embargo, también hay reportes publicados mostrando la expresión glial de Arc (Rodríguez et al., 2008).

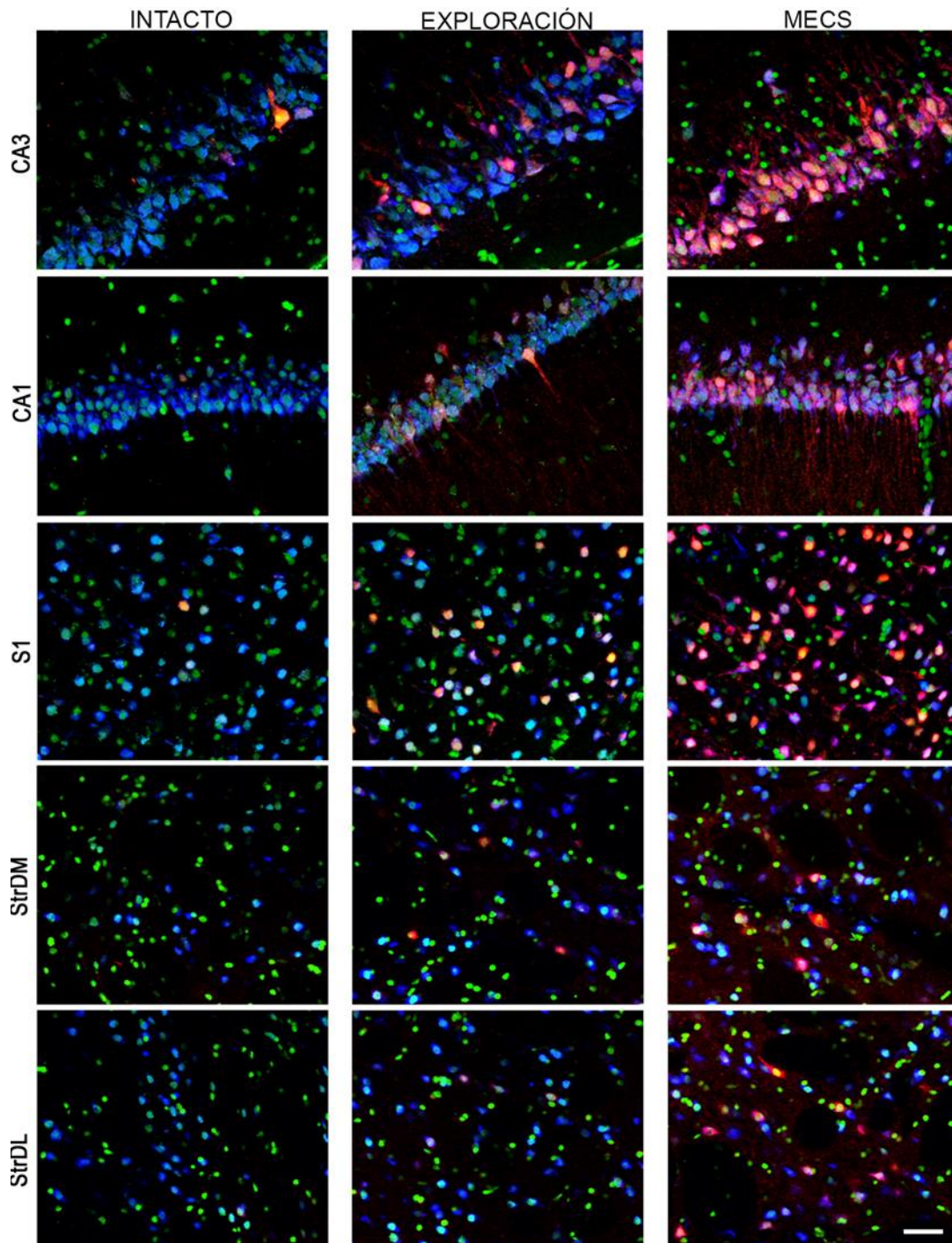


Figura 19. Imágenes representativas de células doblemente marcadas para las proteínas Arc (en rojo) y NeuronN (en azul). Los núcleos celulares contrateñidos con SYTOX green están en color verde, que al colocalizar con rojo y azul, aparecen de color blanco-amarillo. Nótese que cada célula con la tinción de color rojo también tiene manchas azules (y aparece como de color magenta), lo que indica que Arc se expresa únicamente en neuronas. MECS, choques masivos electroconvulsivos; CA1 y CA3, regiones del hipocampo; S1, corteza somatosensorial primaria; StrDL, estriado dorsolateral; StrDM, estriado dorsomedial. Barra de escala = 50 μ m para todos los paneles. Modificado de Vazdarjanova et al. (2006).

7. EL ESTRÉS EN EL APRENDIZAJE Y LA MEMORIA

Una característica común entre los trabajos que estudian el entrenamiento intenso, es la alta carga emotiva a la que son expuestos los animales durante el sobrerreforzamiento; esto seguramente involucra la activación de respuestas a estrés las cuales han sido ampliamente vinculadas como moduladoras del aprendizaje y la memoria, sin embargo, dichas respuestas presentan una curiosa dualidad, por un lado, breves períodos de estrés pueden potenciar la formación de memoria. Por el contrario, estresores más severos o prolongados pueden tener efectos perjudiciales sobre la cognición (McEwen & Sapolsky, 1995).

En roedores una de las principales hormonas de respuesta al estrés es la corticosterona (cortisol en humanos) y varios estudios han demostrado que al administrar corticosterona (CORT), tanto sistémica como directamente en estructuras vinculadas a procesos cognitivos (como el hipocampo, la amígdala, el estriado y la corteza prefrontal) los animales presentan facilitación de la memoria (Cottrell & Nakajima, 1977; McReynolds, Holloway-Erickson, Parmar, & McIntyre, 2014; Medina et al., 2007; Roozendaal & McGaugh, 1997); por otro lado otras investigaciones demuestran que la administración de esta misma hormona, así como sus agonistas, producen efectos amnésicos (Conrad, Lupien, & McEwen, 1999; Diamond, Bennett, Fleshner, & Rose, 1992; Diamond, Fleshner, Ingersoll, & Rose, 1996).

Al parecer esta dualidad obedece a un patrón particular, denominado de U invertida o de campana. Según este patrón, bajas dosis de CORT, no presentan efecto alguno en los animales, sin embargo, la administración de dosis un poco más altas denominadas “moderadas” induce un efecto de facilitación de la memoria, identificable en la conducta. Por último cuando se administran dosis aún más altas de hormona, el efecto facilitador desaparece llegando incluso a presentar un desempeño inferior al grupo control, es decir amnesia (Baldi & Bucherelli, 2005; Conrad et al., 1999; Diamond et al., 1992; Medina et al., 2007; Sandi, Loscertales, & Guaza, 1997).

Esto nos demuestra que en cuanto a la consolidación los efectos de los glucocorticoides son dependientes de varios factores como la concentración administrada (dosis), el estrés inducido por una situación aversiva, las respuestas conductuales del sujeto y la liberación de la hormona al torrente sanguíneo (Cordero, Merino, & Sandi, 1998; McGaugh & Roozendaal, 2002).

Son numerosos los intentos por entender como la liberación de CORT puede

tener estos efectos tan variados en las diferentes etapas del aprendizaje y la memoria. Una teoría interesante propone que esta variabilidad depende del tiempo en el cual ocurre su liberación. Teniendo en cuenta esto se ha propuesto que la CORT, por medio de acciones rápidas no genómicas, ejerce un papel modulador del aprendizaje haciendo que el sistema entre en un estado de “formación de la memoria” facilitando así, la consolidación de la información con contenido emocional. Posteriormente a través de los efectos genómicos de la CORT se produce un estado de “almacenamiento de la información” protegiendo a la consolidación de procesos cognitivos competitivos reduciendo así la interferencia de la entrada de información no relacionada. Por tanto si intentamos evocar información bajo una situación de estrés es decir cuando estamos en modo almacenamiento, nuestro cerebro intentará evitarlo para proteger la información que estemos consolidando en ese momento (Schwabe et al., 2012).

Otra explicación para los efectos duales de la CORT es el efecto dosis dependiente, esta teoría está basada en las diferencias de afinidad presentadas por los dos tipos de receptores a CORT. Por un lado se encuentra el receptor glucocorticoides (GR), cuyo único ligando es la CORT, por otro lado está el receptor a mineralocorticoides (MR), cuyo ligando principal es la aldosterona pero que también presenta una alta afinidad por la CORT (10 veces mayor que la del GR) por lo cual los MR en condiciones basales presentan una ocupación aproximada del 80% mientras que en las mismas condiciones los GR solo están ocupados un 10%; esto significa que la ocupación de los GR solo ocurre cuando los niveles de CORT aumentan considerablemente como por ejemplo durante el pico del ciclo circadiano que antecede el periodo de actividad o bajo condiciones de estrés (Reul & de Kloet, 1985); lo que podría significar que cuando se liberan distintas concentraciones de CORT se estarían activando diferentes vías de señalización mediadas por sus receptores.

Según lo anterior los efectos de CORT son dependientes de la etapa de procesamiento en la cual son liberados, presentando efectos diversos en la adquisición, la consolidación o la evocación de la información; de igual forma estos efectos dependen tanto de la liberación endógena como de la dosis administrada, produciendo efectos facilitadores o deletéreos. En general los efectos de la CORT dependen del momento, cantidad y condición en que estos activan a sus receptores, por tanto, es indispensable conocer las dinámicas de estos últimos.

JUSTIFICACIÓN

Numerosos reportes indican que la consolidación de la información generada por aprendizajes motivados por un reforzador o un castigo puede ser bloqueada por medio de la administración de fármacos que interfieren con la actividad neuronal o por lesiones que dañan las estructuras cerebrales relacionadas con el procesamiento de esta información. Sin embargo, si el reforzador o el castigo se incrementan en magnitud el bloqueo de la consolidación es decir la amnesia que normalmente es observada, ya no se produce.

Este efecto protector ha sido explicado por medio de una teoría que contempla un cambio en la conectividad funcional, de esta forma, la información adquirida bajo condiciones estándar viaja de forma serial a través de las estructuras cerebrales involucradas en la consolidación de la memoria. Sin embargo, en condiciones de entrenamiento incrementado la misma información es procesada en paralelo e incluso sería capaz de reclutar otras estructuras además de las originales (Prado-Alcalá et al., 2006).

El efecto protector del entrenamiento intenso se ha estudiado analizando varias estructuras cerebrales encargadas del procesamiento de la información, tales como el hipocampo (Quiroz et al., 2003), la amígdala (Salado-Castillo et al., 2011), la sustancia nigra (Cobos-Zapíaín et al., 1996; Salado-Castillo et al., 2011) y el caudado-putamen (Díaz del Guante et al., 1990; Giordano & Prado-Alcalá, 1986). En todos y cada uno de los estudios realizados, las estructuras parecen dejar de ser necesarias para la consolidación de la memoria, cuando los animales son sometidos a un entrenamiento intenso.

Una posibilidad es que este efecto se deba al reclutamiento de distintos circuitos neuronales como respuesta a las condiciones de sobrerreforzamiento del entrenamiento intenso. Activándose una cantidad diferente de neuronas en una estructura cerebral específica o bien en diferentes regiones del SNC, en comparación al número de neuronas activadas en diferentes regiones, bajo condiciones moderadas de aprendizaje.

Para confirmar esto, determinamos la localización de la actividad neuronal mediante la identificación de la proteína relacionada con plasticidad neuronal Arc, de esta forma, observamos y medimos cuales regiones estriatales e hipocampales presentan un aumento en la expresión de dicha proteína indicando un aumento en el

procesamiento de información que deriva en cambios plásticos. Además, en dichas regiones, se realizó un conteo celular para determinar la cantidad de neuronas que respondieron a la conducta durante el entrenamiento.

III. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿El aprendizaje incrementado inducido por el entrenamiento intenso en la tarea de evitación inhibitoria, producirá cambios en la cantidad de neuronas activadas en las diferentes regiones del estriado y del hipocampo?

IV. OBJETIVO GENERAL

Mapear la activación neuronal del estriado y el hipocampo de ratas entrenadas con diferentes intensidades de choque eléctrico en la tarea de evitación inhibitoria.

V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la intensidad del aprendizaje provocado por el entrenamiento de la tarea de evitación inhibitoria, utilizando diferentes intensidades de choque eléctrico.
2. Determinar la expresión de la proteína Arc en el estriado y el hipocampo provocada por la adquisición de una tarea de evitación inhibitoria en ratas entrenadas con diferentes intensidades de choque eléctrico.
3. Determinar la concentración de corticosterona circulante inducida por la adquisición de una tarea de evitación inhibitoria en ratas entrenadas con diferentes intensidades de choque eléctrico.

VI. HIPÓTESIS

1. El entrenamiento en la tarea de evitación inhibitoria inducirá la expresión de Arc en diferentes regiones del estriado dependiendo de la intensidad del choque eléctrico utilizado.
2. El entrenamiento en la tarea de evitación inhibitoria inducirá la expresión de Arc en diferentes regiones del hipocampo dependiendo de la intensidad del choque eléctrico utilizado.
3. La estimulación aversiva, inducirá un incremento en los niveles de corticosterona circulante, dependiendo de la intensidad del estímulo.

VII. MÉTODOS GENERALES

Esta sección describe los procedimientos comunes para los diferentes experimentos realizados en este estudio. Los métodos específicos utilizados en cada experimento serán descritos en el apartado del experimento correspondiente.

El protocolo experimental realizado en este estudio fue aprobado por el Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología, UNAM. Los procedimientos experimentales se realizaron acorde a la NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (2001), especificaciones para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio y a las normas estipuladas en la "Guide for the care and use of laboratory animals del NIH (National Research Council, 2011)

1. Sujetos

Se utilizaron 122 ratas machos de la cepa Wistar, obtenidos del bioterio del Instituto de Neurobiología de la UNAM, con un peso entre 250 y 350 g al momento de realizar el entrenamiento. Las ratas ingresaron al bioterio del laboratorio una semana antes de ser sometidas al entrenamiento con el objetivo de que se adaptaran a las condiciones ambientales, todas permanecieron en cajas-habitación individuales, con agua y alimento *ad libitum* y se mantuvieron en el bioterio del laboratorio con un ciclo de luz-oscuridad de 12-12 horas iniciando el periodo de luz a las 7:00 h y con una temperatura de 21°C aproximadamente.

2. Manipulación

Durante la semana de adaptación al bioterio, cada rata fue manipulada durante cinco minutos al día por tres días. El proceso de manipulación consistió en tocar y sostener al animal gentilmente con ambas manos con el propósito de que se acostumbrara a la presencia del experimentador. Todas las ratas fueron manipuladas y acarreadas desde el bioterio hasta el cuarto de manipulación, incluyendo a un grupo control de manipulación que nunca conoció la tarea de evitación inhibitoria ni el cuarto de entrenamiento (Intacto). Todos los procedimientos experimentales fueron realizados entre las 9:00 h y las 13:00 h.

3. Aparatos

El entrenamiento (aprendizaje) y la prueba de retención (memoria) se realizaron en una caja de condicionamiento constituida por dos compartimentos separados por una puerta deslizante tipo guillotina (Figura 20). El compartimento de seguridad (30x30x30 cm) con las paredes y el techo hechos de acrílico transparente de color rojo, mientras el suelo está compuesto por barras de aluminio de 6 mm de diámetro separadas entre sí por 9 mm. Este compartimento siempre estuvo iluminado por un foco de 10 watts, localizado en el centro del techo. El otro compartimento denominado de castigo, está conformado por un techo de acrílico transparente color rojo, mientras las paredes y el suelo están formados por dos placas de acero inoxidable en forma de canal con 20 cm de ancho en la parte más alta y 8 cm en la parte más baja, en la mitad del piso las placas están separadas por una ranura de 1.5 cm. Esta configuración permite que los animales hagan contacto todo el tiempo con ambas placas y puedan recibir un choque eléctrico. El compartimento de castigo se mantuvo oscuro y cuando fue necesario, fue electrificado por medio de un estimulador de pulsos cuadrados (Grass Instruments Co., modelo S48) conectado en serie con una unidad de corriente constante (Grass Instruments Co., modelo CCU-1). La liberación del choque eléctrico y la contabilización del tiempo que le tomo animales cruzar de un compartimento a otro, fueron realizados por medio de un equipo automatizado. Ambos compartimentos fueron limpiados con una solución de alcohol al 10%, antes y después de cada ensayo. La cámara de condicionamiento está ubicada en un cuarto sonoamortiguado, con baja iluminación, provista de un enmascarador de ruido (BRS/LVE, modelo AU-902).

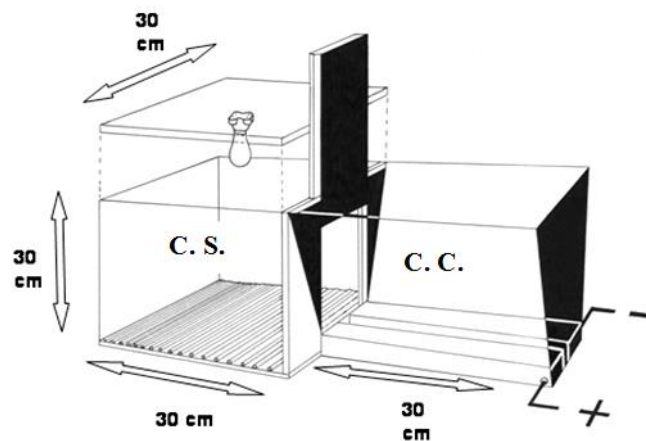


Figura 20. Caja de condicionamiento de evitación inhibitoria. Compartimiento de seguridad (C.S.), compartimiento de castigo (C.C.).

4. Análisis estadístico

4.1. Datos conductuales

Debido a que las pruebas de retención de la tarea de evitación inhibitoria fueron terminadas arbitrariamente a los 600 segundos, se utilizó estadística no paramétrica para el análisis de los resultados conductuales. Los datos obtenidos durante el entrenamiento (latencias de entrada y de escape) y la prueba (latencia de retención) fueron analizados mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis; en caso de encontrarse diferencias significativas se utilizó la prueba de U de Mann-Whitney para comparar pares de grupos. Para el caso de la extinción se utilizó la prueba de Friedman para analizar la retención a través de los 6 días de pruebas para cada grupo, en caso de encontrarse diferencias significativas, se realizó una prueba de rangos con signo de Wilcoxon para hacer comparaciones entre pares de sesiones por cada grupo. Para realizar comparaciones entre grupos en cada sesión de extinción, se aplicaron las pruebas de Kruskal-Wallis y en caso de encontrarse diferencias significativas se utilizó la prueba de U de Mann-Whitney.

4.2. Datos histológicos

Los datos obtenidos del porcentaje de área de señal, el porcentaje de células que expresan Arc y la concentración de corticosterona en sangre, fueron analizados utilizando la prueba paramétrica de análisis de varianzas (ANOVA) de una vía para cada región de cada estructura; en caso de encontrarse diferencias significativas se realizó la prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples para determinar las diferencias significativas entre pares de grupos.

VIII. EXPERIMENTO 1: El entrenamiento de la tarea de evitación inhibitoria con choques eléctricos de alta intensidad produce un aprendizaje incrementado

Debido a que uno de los objetivos de este estudio fue evaluar los posibles cambios en la expresión de la proteína Arc, después del entrenamiento con una intensidad baja, moderada y alta de choque eléctrico, fue importante demostrar que el entrenamiento con un choque eléctrico alto produce un aprendizaje más fuerte que el producido por los entrenamientos con choques bajos o moderados. Para esto se realizaron mediciones de la resistencia a la extinción, dado que una mayor resistencia a la extinción es más fuerte cuando el aprendizaje es también más fuerte.

1. Entrenamiento y pruebas de extinción

En el primer y único día de entrenamiento (sesión de adquisición), cada rata se introdujo en el compartimento de seguridad; 10 s después se abrió la puerta deslizante que divide los dos compartimentos y se midió el tiempo que tardó en cruzar la rata al compartimento de castigo (latencia de adquisición). Una vez que la rata cruzó con las cuatro patas al compartimento de castigo, se cerró la puerta y se administró un choque eléctrico (un tren 50 ms de pulsos cuadrados a 10 Hz, con intensidades de 0.5, 1.0, o 2.0 mA para cada grupo), 5 segundos después se abrió de nuevo la puerta permitiéndole al sujeto escapar; el choque se mantuvo hasta que la rata escapó al compartimento de seguridad, midiéndose el tiempo transcurrido entre la apertura de la puerta y el cruce de la rata con sus cuatro patas (latencia de escape). En este momento, se cerró la puerta y 30 s después se retornó al animal a su jaula individual

dando por terminada la sesión (Figura 21A). Además de los tres grupos anteriormente mencionados se estudió un grupo de 0.0 mA, el cual fue entrenado en la tarea de evitación inhibitoria, excepto que no se le administró ningún choque eléctrico, una vez que las ratas cruzaron al compartimento de castigo, la puerta se volvió a abrir después de 5 s, y se calculó la latencia de escape.

La extinción de la tarea de evitación inhibitoria, se midió durante 6 días consecutivos, empezando 48 horas después del entrenamiento. Para medir la extinción se siguió el mismo procedimiento que fue realizado durante la sesión de adquisición, pero sin administrar el choque eléctrico, el tiempo que demoró la rata en cruzar de nuevo al compartimento de castigo fue registrado como la latencia de retención; si al cabo de 600 segundos la rata no cruzó al compartimento oscuro, se asignó este valor a la latencia de retención y se dio por terminada la tarea (Figura 21B).

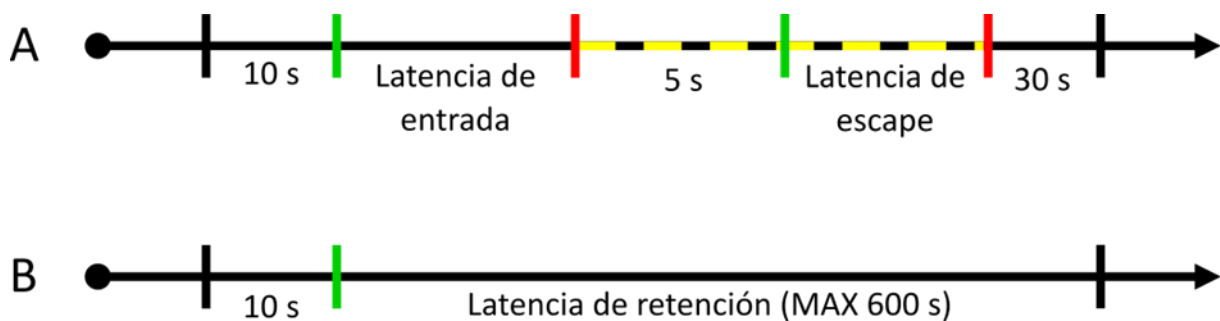


Figura 21. Diagrama de los pasos seguidos para el entrenamiento y prueba de la tarea de evitación inhibitoria. A. Las líneas verticales verdes indican la apertura de la compuerta que separa a ambos compartimentos, las líneas rojas indican el cierre de la misma y la línea horizontal amarilla con negro indica el momento en que se administró el choque eléctrico durante el entrenamiento. B. La prueba de la tarea se realizó 48 horas después del entrenamiento, si los animales no cruzaron al compartimento de castigo a los 600 segundos se tomó este valor como latencia de retención y se dio por terminada la tarea.

2. Resultados

El análisis de los datos obtenidos durante el entrenamiento en la tarea de evitación inhibitoria mostró que no existieron diferencias significativas entre los grupos en la latencia de entrada (Kruskal-Wallis, $H(3) = 5.06$; $p = 0.167$). Por otro lado al

analizar los datos de la latencia de escape se observaron diferencias significativas (Kruskal-Wallis, $H(3) = 13.90$; $p = 0.003$), la prueba post hoc de U de Mann-Whitney demostró que el grupo de 0.0 mA tuvo latencias de escape significativamente más altas que la de los demás grupos ($p = 0.0051$, $p = 0.0027$, $p = 0.0027$ para 0.5, 1.0 y 2.0 mA respectivamente), mientras que las latencias de escape de los grupos que si recibieron choque eléctrico no presentaron diferencias significativas entre ellos (Figura 22).

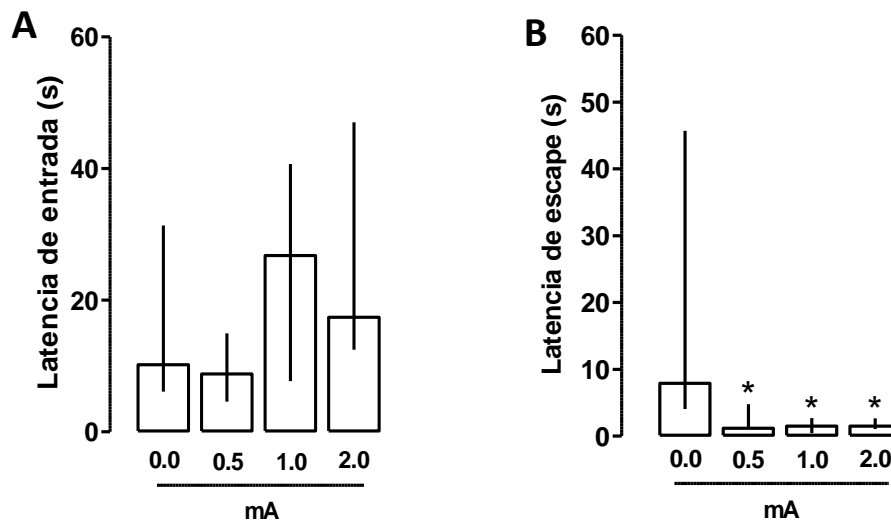


Figura 22. Medianas con rangos intercuartiles de la latencia de entrada y de escape durante el entrenamiento de la tarea de evitación inhibitoria. (A) No hubo diferencias significativas en la latencia de entrada. (B) Se observó una reducción significativa en las latencias de escape de los grupos 0.5, 1.0 y 2.0 mA con respecto al grupo 0.0 mA (* $p < 0.05$). Grupos: **0.0 mA**, entrenado sin choque eléctrico; **0.5 mA**, entrenado con intensidad baja de choque eléctrico; **1.0 mA**, entrenado con intensidad moderada de choque eléctrico; **2.0 mA**, entrenado con intensidad alta de choque eléctrico.

Con respecto al análisis de la extinción, la prueba de Friedman reveló diferencias significativas a lo largo de las sesiones de extinción en los grupos 0.5 mA ($X^2(5) = 26.36$, $p < 0.001$); 1.0 mA ($X^2(5) = 37.42$, $p < 0.001$); y 2.0 mA ($X^2(5) = 29.89$, $p < 0.001$) mientras que no se encontraron diferencias en el grupo de 0.0 mA ($X^2(5) = 6.38$, $p = 0.23$). La prueba de los rangos con signo de Wilcoxon demostró que el grupo de 0.5 mA tuvo una reducción significativa en la latencia de retención en el tercer día de extinción comparado con el primer día de extinción ($Z = 36$, $p < 0.01$) y continuó bajo durante las sesiones restantes ($Z = 36$, $p < 0.01$ para el cuarto, quinto y sexto día de extinción). El grupo de 1.0 mA tuvo una disminución significativa en la latencia de retención en el segundo día de extinción en comparación con el primer día

($Z = 26, p < 0.05$). Esta reducción fue más evidente en el tercer día de extinción y se mantuvo baja hasta el sexto día ($Z = 55, p < 0.005$ desde el tercero hasta el sexto día de extinción). El grupo de 2.0 mA tuvo la mediana de latencia de retención más alta (600 s) durante las tres primeras sesiones de extinción; En los días cuarto, quinto y sexto, se observó una reducción significativa en las latencias de retención ($Z = 21, p < 0.05$ para el cuarto y quinto día, $Z = 36, p < 0.01$ para el sexto día) (Figura 23).

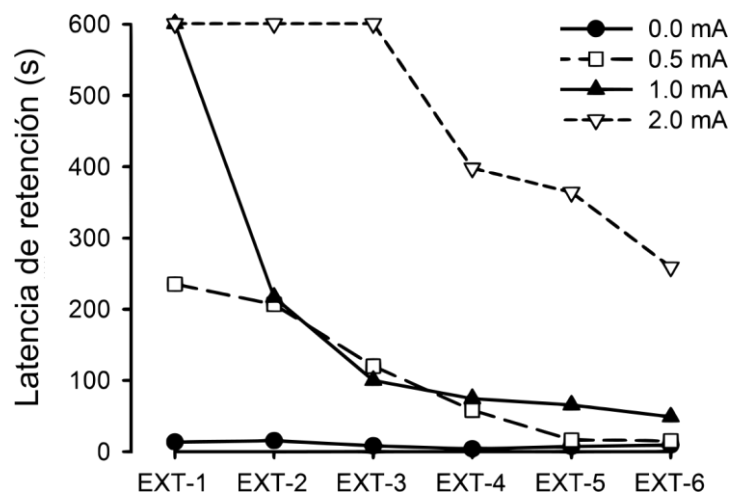


Figura 23. Medianas de las latencias de retención para cada sesión de extinción (EXT-1 a EXT-6). En cada sesión de extinción las latencias de retención del grupo de 2.0 mA difirieron significativamente de las latencias de los demás grupos (valores de p entre 0.001 y 0.0001), excepto en EXT-1 donde no difirió del grupo de 1.0 mA. Estos resultados indican claramente que el grupo de 2.0 mA tuvo la mayor resistencia a la extinción, lo cual es indicativo de un aprendizaje incrementado. Grupos: **0.0 mA**, entrenado sin choque eléctrico; **0.5 mA**, entrenado con intensidad baja de choque eléctrico; **1.0 mA**, entrenado con intensidad moderada de choque eléctrico; **2.0 mA**, entrenado con intensidad alta de choque eléctrico.

IX. EXPERIMENTO 2: El entrenamiento intenso en la tarea de evitación inhibitoria, incrementa la expresión de Arc en las regiones ventrales del estriado y el giro dentado del hipocampo

Con el fin de estudiar los efectos del entrenamiento moderado e intenso sobre la activación neuronal del estriado y el hipocampo, se formaron 6 grupos de 4 ratas cada uno, los cuales fueron entrenados con intensidades de choque eléctrico de 0.0, 0.5, 1.0 o 2.0 mA al término de la sesión de entrenamiento, se permitió que cada rata

permaneciera 45 min en su caja habitación con el fin de permitir que la proteína Arc alcanzara su pico máximo de expresión, pasado este tiempo la rata se sacrificó por decapitación. Al igual que en el experimento anterior, se adicionó un grupo de 0.0 mA esta vez, para observar la activación neuronal inducida por la exploración de la caja de evitación inhibitoria. También estudiamos otro grupo con el propósito de diseccionar la actividad neuronal inducida por el choque eléctrico, este grupo recibió la intensidad más alta de choque (2.0 mA), pero no fue entrenado en la tarea de evitación (grupo de solo choque; SCh); Las ratas de este grupo se colocaron directamente en el compartimento de choque y se suministró un choque eléctrico de 2.0 mA (la duración del choque fue de 6.5 s, la cual fue calculada a partir de la mediana de la duración del choque eléctrico recibido por el grupo entrenado con 2.0 mA). Inmediatamente después del choque, la rata fue colocada de nuevo en su caja-habitación. Por último, con el fin de determinar la expresión basal de la proteína Arc, también se estudió un grupo control intacto que nunca experimentó la tarea de evitación inhibitoria ni el cuarto de entrenamiento (grupo Int). Estas mismas ratas fueron usadas para medir la concentración sérica de CORT (ver Experimento 3).

1. Obtención y procesamiento de tejido

Cuarenta y cinco minutos después de la manipulación conductual, las ratas fueron sacrificadas por decapitación, inmediatamente después el cerebro fue rápidamente extraído y congelado, sumergiéndolo en un recipiente con isopentano enfriado a -30°C aproximadamente, por medio de una solución de hielo seco y etanol al 96 %; posteriormente los cerebros fueron almacenados en un congelador a -70°C .

Para su criosección los cerebros fueron cortados con la ayuda de una matriz de sección para tejido (2.7 x 2.5 cm de área interior) (Electron Microscope Sciences®); se utilizó como referencia el límite entre la corteza y el cerebelo para tomar secciones que incluyeran el hipocampo y el estriado (Figura 24A), de esta forma se garantizó que todas las secciones de cada uno de los animales presentaran una altura semejante de corte.

Posteriormente, los tejidos fueron distribuidos en bloques de hemiserebros izquierdos (las comparaciones de la expresión íter-hemisféricas no mostraron

resultados estadísticamente significativos en trabajos anteriores); distribuyéndolos de manera aleatoria, de tal forma que hubiera al menos un cerebro de cada grupo en cada bloque como medida estereológica. Por último, los tejidos fueron cubiertos con “Tissue tek OCT®” y se congelaron rápidamente con hielo seco para generar un bloque sólido (el resto de los tejidos fueron almacenados a -70°C). Los cortes coronales de cada uno de los tres bloques resultantes, fueron cortados a -20°C con un grosor de $20\ \mu\text{m}$ usando un criostato CM1850 Leica (Figura 24B), los cortes coronales de cada bloque fueron dispuestos en laminillas portaobjetos previamente silanizadas y se mantuvieron en cajas selladas a -70°C hasta el procedimiento de inmunotinción. (Figura 24C).

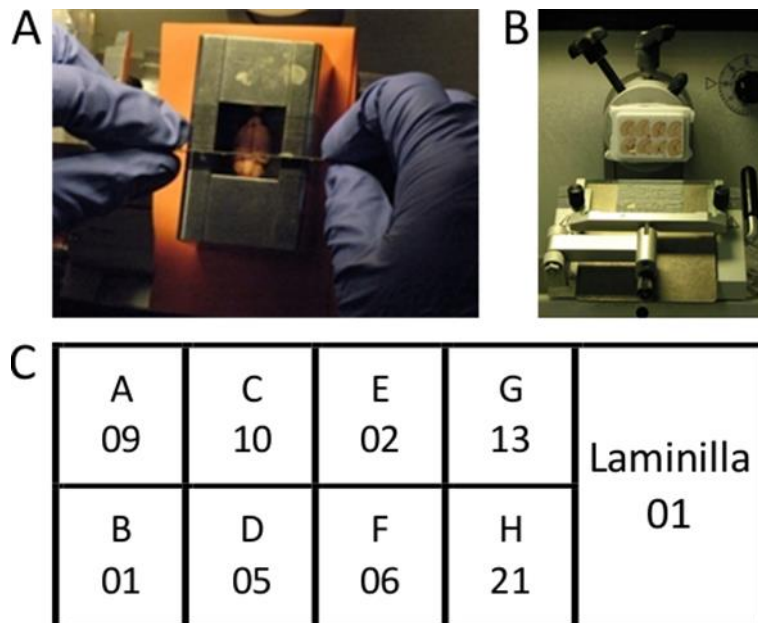


Figura 24. Fotografías ilustrativas de los procesos de corte y construcción de bloques, de los cerebros seleccionados para la inmunotinción. (A) Corte de los cerebros entre la corteza y el cerebelo para garantizar su equidistancia durante la criosección. (B) Criosección de los bloques embebidos en OCT®. (C) Diagrama que ejemplifica la distribución aleatoria de los cerebros en la laminilla.

2. Histología

Seis laminillas de cada bloque fueron seleccionadas para el estriado (Bregma 0.24 a 1.20 mm) y el hipocampo dorsal (Bregma -2.92 a -3.96 mm) de acuerdo al atlas de coordenadas estereotáxicas del cerebro de rata (Paxinos & Watson, 2007). Los

tejidos se fijaron en una solución al 2% de paraformaldehído a 7.4 pH, durante 5 min y se lavaron en 2xSSC, (30 mM cloruro de sodio, 30 mM citrato de sodio, pH 7.0), seguido de acetona/metanol (1:1) a 4°C, durante 5 min. Posteriormente se lavaron en 2xSSC + 0.05% de Tween 20 y se eliminó la autofluorescencia con 2xSSC + 1% H₂O₂ durante 15 min. Tras el bloqueo con el kit de amplificación de señal de tiramida (TSA) buffer de bloqueo (Perkin Elmer Life Sciences, Emeryville, CA, EUA.). Las laminillas fueron incubadas 48 h a 4°C en anticuerpo policlonal de conejo anti-Arc (1:800) provisto por el laboratorio del Dr. Hiroyuki Okuno. Se colocaron posteriormente en incubación con el anticuerpo secundario anti-conejo biotinilado (1:500) (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA.) durante 2 horas a temperatura ambiente, seguido por el sistema de amplificación avidina-biotina (Vector Laboratories) por 45 min. La tinción fue visualizada usando el sistema de fluorescencia cianina3 (Cy3) + TSA (Perkin Elmer Life Sciences); los núcleos fueron contrateñidos con SYTOX green (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA.). Como control estereológico se comprobó que ninguna tinción fuera detectable en ausencia de los anticuerpos primarios o secundarios.

3. Análisis de imágenes

Se obtuvieron imágenes de un solo plano óptico que comprendieron las 20 μm de grosor del tejido usando un objetivo apocromático de 10X/0.45 y un set de filtros con un paso de banda de excitación de 546/12 nm y de emisión de 575-640 nm, para la detección de CY3 y otro set de filtros con un paso de banda de excitación de 450-490 nm y de emisión de 515-565 nm, para la detección de SYTOX® Green.

Con la ayuda del software de imágenes para Mosaico, MosaiX del sistema Apotome (Zeiss® Standort Gotinga - Vertrieb Deutschland) se realizó la unión de las imágenes capturadas para formar un mosaico que abarcara todo el tejido como se muestra en la Figura 25. Los parámetros de imagen (brillo, contraste etc.) se ajustaron con el fin de eliminar el ruido de fondo y observar únicamente la señal de las neuronas activadas; los parámetros para la adquisición de las imágenes fueron establecidos con respecto a la señal observada en los animales intactos y posteriormente se mantuvieron los mismos valores para los parámetros de adquisición utilizados en el

resto de los tejidos para cada laminilla, esto como medida estereológica con el fin de controlar la variación en la señal producida por el proceso de inmunotinción.

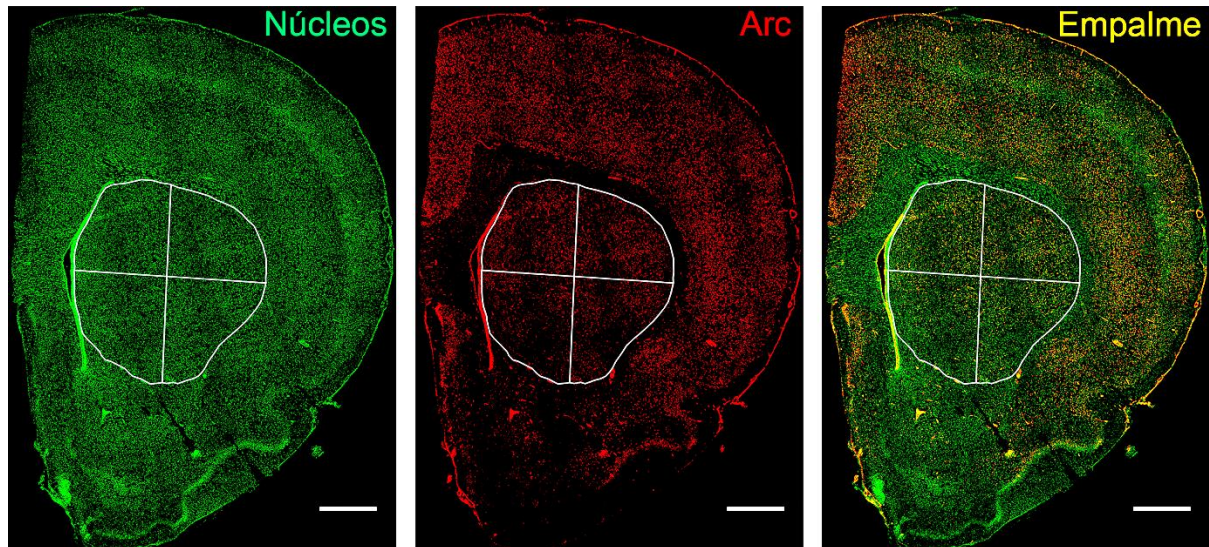


Figura 25. Imágenes representativas de los mosaicos obtenidos. En la imagen de la izquierda se observa la contratinción de núcleos para la cual se utilizó SYTOX green (verde). En la imagen de la mitad se observa la señal de Arc para la cual se realizó una inmunotinción y se reveló con CY3 (rojo). Por último, en la imagen de la derecha se observa el empalme de ambas señales; estas imágenes fueron obtenidas a partir de un corte cerebral de una rata entrenada con 2.0 mA. Barra de escala = 500 μ m.

El análisis de la expresión de Arc se realizó utilizando el programa ImageJ (Schneider, Rasband, & Eliceiri, 2012), en el cual, usando como guía el atlas de coordenadas estereotáxicas del cerebro de rata de Paxinos y Watson (2007), se delimitaron en el estriado y el hipocampo las regiones de interés (ROI por sus siglas en inglés Region of Interest), dichas regiones correspondieron a las áreas dorsolateral, dorsomedial, ventrolateral y ventromedial para el estriado y a las áreas de CA1, CA2, CA3 y giro dentado (GD) para el hipocampo.

Una vez que los ROI's fueron señalados, se estableció un umbral de detección, definido como el valor de escala de grises, al menos dos veces mayor que el ruido de fondo. Dicho umbral fue establecido con respecto a la señal observada en la imagen del animal intacto correspondiente a cada laminilla y utilizado como límite de detección para el resto de las imágenes de la misma laminilla. Por último, se midió el área de la

señal de Arc que supero el umbral de detección (expresado en μm^2). Con el propósito de minimizar las variaciones producidas por el proceso de inmunotinción (tales como encogimiento y/o estiramiento del tejido) se dividió el valor de área de señal de Arc por el área total de cada ROI (también expresado en μm^2), para así obtener la proporción del área de señal.

Posteriormente, en las regiones estriatales donde se encontraron diferencias significativas en la proporción del área de señal de Arc, se realizó un conteo celular. Para esto, se realizó la captura de tres imágenes en profundidad (Z-stacks) (objetivo de 40X, con un grosor óptico de $0.7 \mu\text{m}$ por plano óptico y un total de 26 ± 2 planos ópticos aproximadamente para cada Z-stack), sobre los mismos tejidos utilizados en el análisis anterior. Los conteos celulares fueron realizados como se reporta en otros estudios (Vazdarjanova, McNaughton, Barnes, Worley, & Guzowski, 2002). Basándose en la contratinción de núcleos se clasificaron las células en neuronas y glías, aquellas células con tinción nuclear pequeña, intensa y uniforme fueron consideradas como glías y excluidas del análisis (Vazdarjanova et al., 2006), mientras que sólo los núcleos con apariencia neuronal (más grandes y con tinción menos intensa y uniforme), que se hallaban ubicados en el 60% medial de cada stack fueron contabilizados (esta medida estereológica fue utilizada para minimizar los errores de muestreo atribuibles a las células incompletas ubicadas en el 20% superior y el 20% inferior de cada stack). Para el análisis de la proteína Arc, las células segmentadas fueron clasificadas como positivas o negativas. Para que una neurona fuera considerada como positiva debía presentar una tinción perinuclear o citoplasmática que rodeara al menos el 60% del núcleo; además esta señal debería ser visible en al menos tres planos ópticos junto con el núcleo de la célula. Se prestó especial atención para garantizar que la tinción pertenecía a la célula de interés y no a una dendrita de una célula diferente.

4. Resultados histológicos del estriado

4.1. Análisis de área de señal

Como se puede observar en la Figura 26, el análisis de las mediciones del área de señal de Arc obtenidos a partir de las imágenes en mosaico, no mostraron

diferencias significativas en las regiones dorsomedial y dorsolateral del estriado (ANOVA, $F_{(5,18)} = 1.69$, $p = 0.19$ y $F_{(5,18)} = 2.15$, $p = 0.11$, respectivamente).

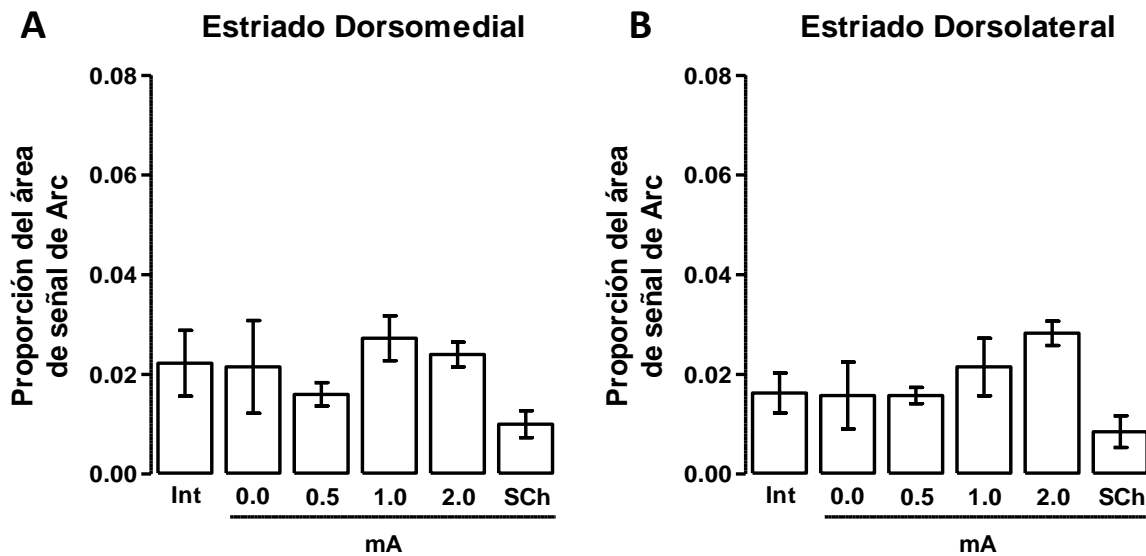


Figura 26. Efecto de la intensidad del entrenamiento de evitación inhibitoria sobre la proporción del área de señal de Arc en las regiones dorsales del estriado. Se muestran los promedios y error estándar de cada grupo. (A) No se encontraron diferencias significativas en el estriado dorsomedial o en el estriado dorsolateral (B). Grupos: **Int**, sin tratamiento; **0.0 mA**, entrenado sin choque eléctrico; **0.5 mA**, entrenado con intensidad baja de choque eléctrico; **1.0 mA**, entrenado con intensidad moderada de choque eléctrico; **2.0 mA**, entrenado con intensidad alta de choque eléctrico; **SCh**, recibió un choque eléctrico de 2.0 mA, pero sin entrenamiento (control choque).

En contraste con las regiones dorsales, el análisis de las regiones ventrales arrojó diferencias significativas (ANOVA, $F_{(5,18)} = 3.9$, $p < 0.05$ para el estriado ventromedial y $F_{(5,18)} = 3.76$, $p < 0.05$ para el estriado ventrolateral), por lo que se realizó una prueba post hoc de Bonferroni. Para las comparaciones entre grupos de la región ventromedial se observó un incremento significativo del grupo 2.0 mA en comparación con el grupo SCh ($p < 0.05$); no hubo diferencias significativas cuando se realizaron comparaciones entre el resto de los grupos (Figura 27A). Con respecto a las comparaciones entre grupos de la región ventrolateral se observó un incremento significativo en el grupo 2.0 mA en comparación con los grupos 0.0 mA y SCh ($p < 0.05$ y $p < 0.01$ respectivamente), no hubo diferencias significativas cuando se realizaron comparaciones entre el resto de los grupos (Figura 27B).

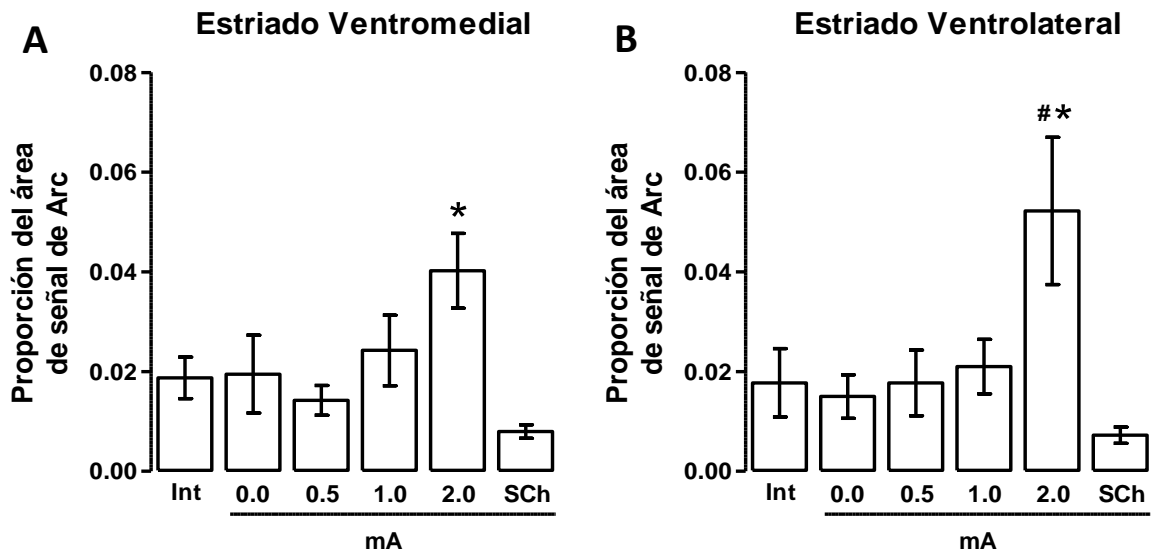


Figura 27. Efecto de la intensidad del entrenamiento de evitación inhibitoria sobre el área de señal de Arc en las regiones ventrales del estriado. Se muestran los promedios y error estándar de la proporción de cada grupo. (A) Región ventrolateral del estriado. (B) Región ventromedial del estriado. * $p < 0.05$ en comparación con el grupo SCh y # $p < 0.05$ con el grupo de 0.0 mA ($n = 4$ por grupo). Grupos: **Int**, sin tratamiento; **0.0 mA**, entrenado sin choque eléctrico; **0.5 mA**, entrenado con intensidad baja de choque eléctrico; **1.0 mA**, entrenado con intensidad moderada de choque eléctrico; **2.0 mA**, entrenado con intensidad alta de choque eléctrico; **SCh**, recibió un choque eléctrico de 2.0 mA, pero sin entrenamiento (control choque).

4.2. Conteo celular de las regiones ventrales del estriado

Con respecto a los conteos celulares, la ANOVA de una vía mostró diferencias significativas en la proporción de neuronas que expresan Arc de la región ventromedial del estriado ($F_{(5,18)} = 11.76$, $p < 0.0001$), la prueba post hoc de Bonferroni reveló un incremento en el grupo de 2.0 mA en comparación con los grupos Int, 0.0, 0.5 mA y SCh ($p < 0.001$, $p < 0.005$, $p < 0.005$ y $p < 0.001$, respectivamente). El grupo de 1.0 mA también mostró un incremento en comparación con los grupos Int y SCh ($p < 0.01$ y $p < 0.005$, respectivamente), sin mostrar diferencias significativas con los demás grupos. Es importante resaltar la falta de diferencias significativas con los grupos de 0.0 y 0.5 mA, lo que indica que el aumento en el número de neuronas que expresan Arc en el estriado ventromedial del grupo 1.0 mA no está por encima de la proporción inducida por la exploración de la caja de evitación inhibitoria o por el entrenamiento con baja intensidad de choque eléctrico. No se observaron diferencias significativas entre los grupos Int, 0.0, 0.5 mA y SCh, ni entre los grupos 1.0 y 2.0 mA (Figura 28A).

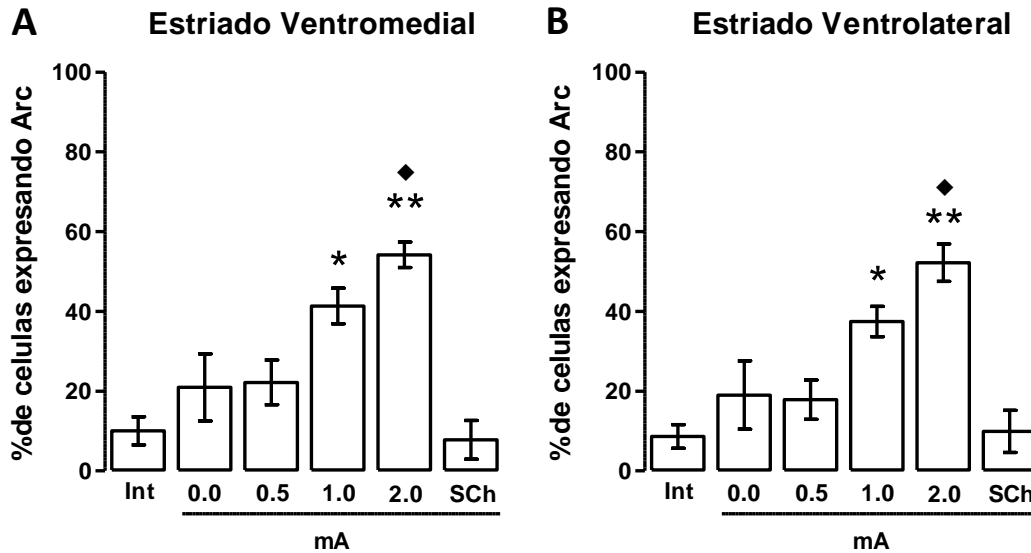


Figura 28. Efectos de la intensidad del entrenamiento de evitación inhibitoria sobre el conteo celular en el estriado ventromedial y ventrolateral. Se muestra el porcentaje promedio y error estándar de las células Arc positivas en el estriado ventromedial (A) y el ventrolateral (B). * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$ aumento significativo comparado con los grupos Int y SCh; ♦ $p < 0.01$ aumento significativo comparado con los grupos 0.0 y 0.5 mA ($n = 4$ por grupo). Grupos: **Int**, sin tratamiento; **0.0 mA**, entrenado sin choque eléctrico; **0.5 mA**, entrenado con intensidad baja de choque eléctrico; **1.0 mA**, entrenado con intensidad moderada de choque eléctrico; **2.0 mA**, entrenado con intensidad alta de choque eléctrico; **SCh**, recibió un choque eléctrico de 2.0 mA, pero sin entrenamiento (control choque).

De forma similar, el estriado ventrolateral mostró diferencias significativas en la proporción de neuronas que expresan Arc entre los grupos (ANOVA, $F_{(5,18)} = 10.33$, $p < 0.0001$); La prueba post hoc de Bonferroni también mostró un aumento significativo en el grupo 2.0 mA en comparación con los grupos Int, 0.0, 0.5 mA y SCh ($p < 0.001$, $p < 0.005$, $p < 0.004$, $p < 0.001$, respectivamente). El grupo de 1.0 mA también mostró un incremento en comparación con los grupos Int y SCh ($p < 0.05$ en ambas comparaciones), No se observaron diferencias significativas entre los grupos Int, 0.0, 0.5 mA y SCh, ni entre los grupos 1.0 y 2.0 mA (Figura 28B).

5. Resultados histológicos del hipocampo

5.1. Análisis de área de señal

Al analizar la proporción del área de señal de Arc en el hipocampo utilizando una prueba de ANOVA de una vía, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en CA1 ($F_{(5,18)} = 0.9923$, $p = 0.4514$), CA2 ($F_{(5,18)} = 1.847$, $p = 0.1572$) y CA3 ($F_{(5,18)} = 0.8486$, $p = 0.5344$); sin embargo, en CA1 y CA2 se puede observar una

tendencia al aumento de la expresión de Arc conforme se aumenta la intensidad del choque eléctrico utilizado en el entrenamiento (Figuras 29A, 29B y 29C).

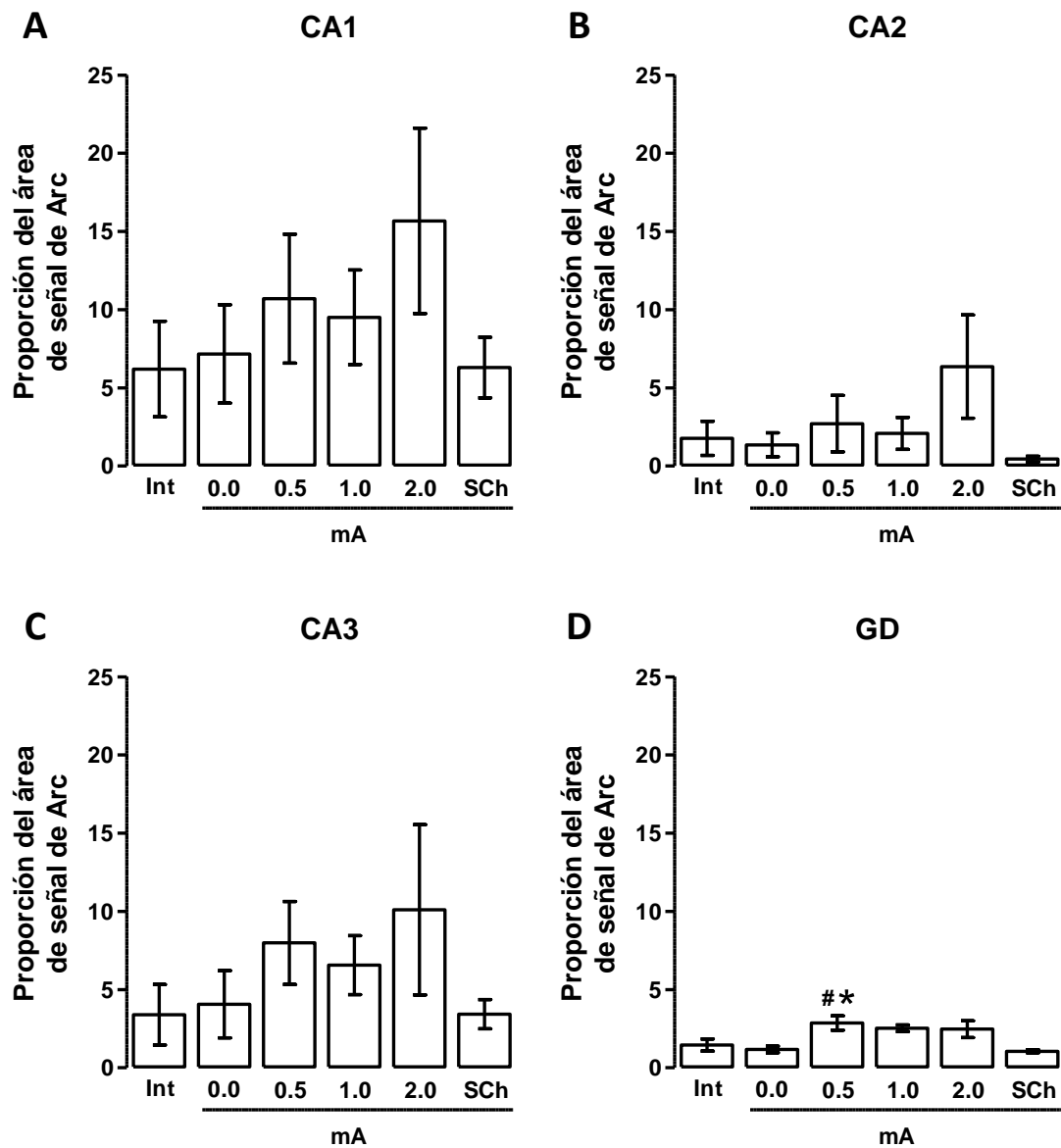


Figura 29. Efecto de la intensidad del entrenamiento de evitación inhibitoria sobre el área de señal de Arc en las diferentes regiones del hipocampo. Se muestra el promedio y error estándar de cada grupo. No se encontraron diferencias significativas en (A) CA1 (B) CA2 y (C) CA3. (D) En el GD se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar el grupo 0.5 mA con el grupo 0.0 mA ($^{\#}p < 0.05$) y con SCh ($^*p < 0.05$) ($n = 4$ por grupo). Grupos: **Int**, sin tratamiento; **0.0 mA**, entrenado sin choque eléctrico; **0.5 mA**, entrenado con intensidad baja de choque eléctrico; **1.0 mA**, entrenado con intensidad moderada de choque eléctrico; **2.0 mA**, entrenado con intensidad alta de choque eléctrico; **SCh**, recibió un choque eléctrico de 2.0 mA, pero sin entrenamiento (control choque).

A diferencia de las subestructuras hipocampales anteriormente mencionadas, el GD mostro diferencias significativas en esta medición (ANOVA, $F_{(5,17)} = 4.483$, $p =$

0.0087), la prueba post hoc de Bonferroni mostró un aumento en la proporción del área de señal de Arc, en el grupo de 0.5 mA en comparación con los grupos 0.0 mA y SCh ($p = 0.048$ y $p = 0.028$ respectivamente) (Figura 29D).

5.2. Conteo celular del giro dentado

Con respecto a los conteos celulares en el giro dentado (Figura 30); el ANOVA de una vía mostró diferencias significativas ($F_{(5,18)} = 0.9923$, $p < 0.001$) posteriormente una prueba post hoc de Bonferroni permitió observar un aumento estadísticamente significativo del porcentaje de células que expresan Arc en el grupo de 0.5 mA en comparación con los grupos Int, 0.0 mA y SCh ($p = 0.003$, $p = 0.004$ y $p = 0.003$ respectivamente). Además, también se observó un aumento en el grupo 1.0 mA con respecto a los grupos Int y SCh ($p = 0.043$ y $p = 0.036$ respectivamente).

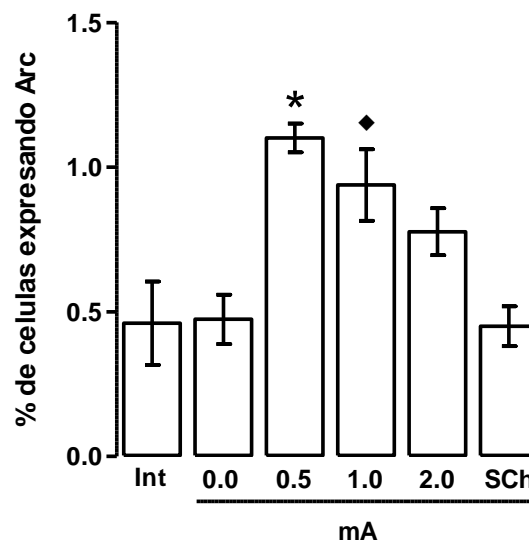


Figura 30. Efectos de la intensidad del entrenamiento de evitación inhibitoria sobre el conteo celular en el GD. Se muestra el porcentaje promedio y error estándar de las células Arc positivas. Se observa un incremento significativo en el grupo 0.5 mA en comparación con los grupos Int, 0.0 mA y SCh ($*p < 0.005$). También se observó un incremento significativo en el grupo 1.0 mA en comparación con los grupos Int y SCh ($♦p < 0.05$). Grupos: **Int**, sin tratamiento; **0.0 mA**, entrenado sin choque eléctrico; **0.5 mA**, entrenado con intensidad baja de choque eléctrico; **1.0 mA**, entrenado con intensidad moderada de choque eléctrico; **2.0 mA**, entrenado con intensidad alta de choque eléctrico; **SCh**, recibió un choque eléctrico de 2.0 mA, pero sin entrenamiento (control choque).

X. EXPERIMENTO 3: El incremento de la concentración de corticosterona en sangre está relacionado con la intensidad del choque eléctrico y no con la intensidad del entrenamiento en la tarea de evitación inhibitoria

Como índice de la intensidad del entrenamiento, se estudió si la concentración de CORT en sangre estaba relacionada con la intensidad de los choques eléctricos usados durante el entrenamiento. de Kloet, Vreugdenhil, Oitzl y Joëls (1998), reportaron que la liberación de CORT normalmente alcanza los niveles máximos dentro de los 15 min después de la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA). Por esta razón, grupos independientes de ratas ($n = 4$ por grupo) fueron entrenados en la tarea de evitación inhibitoria, con las mismas intensidades (0.0, 0.5, 1.0 y 2.0 mA) y las condiciones control (grupos Int y SCh) descritos en los experimentos anteriores. Posteriormente las ratas fueron sacrificadas 15 min después del entrenamiento, con el objetivo de obtener la sangre para la medición de CORT. Al mismo tiempo evaluamos la concentración sérica de CORT en los animales que fueron sacrificados para el análisis de la expresión de Arc 45 min después de la tarea de evitación inhibitoria (Experimento 2).

1. Medición de CORT por radioinmunoensayo

La concentración de CORT en suero sanguíneo se determinó mediante la técnica de radioinmunoensayo (RIA por su abreviatura del inglés Radioimmunoassay), utilizando el anticuerpo policlonal anti-CORT de oveja (AB1297, Merck-Millipore) a una dilución de 1:9000. Las muestras de suero fueron extraídas a partir de la sangre de las ratas y posteriormente se diluyeron a 1:500 en tampón de fosfato 0.01 M a pH 7.5, con NaCl 0.15 M y gelatina al 0.1 % y se calentaron a 98 °C durante 10 min. La curva estándar fue de: 5-4.000 pg de CORT/ml (CORT, número de catálogo 46148, Sigma-Aldrich) (Vetranal analytical standard), las muestras fueron analizadas por duplicado.

2. Resultados

La prueba de ANOVA de una vía, para las mediciones de concentración de CORT en suero a los 15 minutos mostró diferencias significativas entre los grupos (F_{5} ,

$_{13}) = 10.55, p < 0.0005$). La prueba post hoc de Bonferroni mostró una concentración significativamente más alta de CORT en el grupo de 2.0 mA comparado con los grupos Int y 0.5 mA ($p < 0.05$ para ambas comparaciones), además, el grupo SCh presentó una mayor cantidad de CORT que los grupos Int, 0.0 y 0.5 mA ($p < 0.001, 0.001$ y 0.005 , respectivamente) (Figura 31A). El análisis de la concentración de CORT a los 45 min después del entrenamiento, no reveló diferencias significativas entre los grupos (ANOVA $F_{(5,18)} = 1.48, p = 0.24$) (Figura 31B). El choque eléctrico alto, aumentó la concentración de CORT en suero a los 15 min, la cual se normalizó 45 minutos después del entrenamiento. Por lo tanto, la concentración de CORT aumentó en respuesta a la mayor intensidad de choque eléctrico, independientemente de si las ratas fueron entrenadas o no.

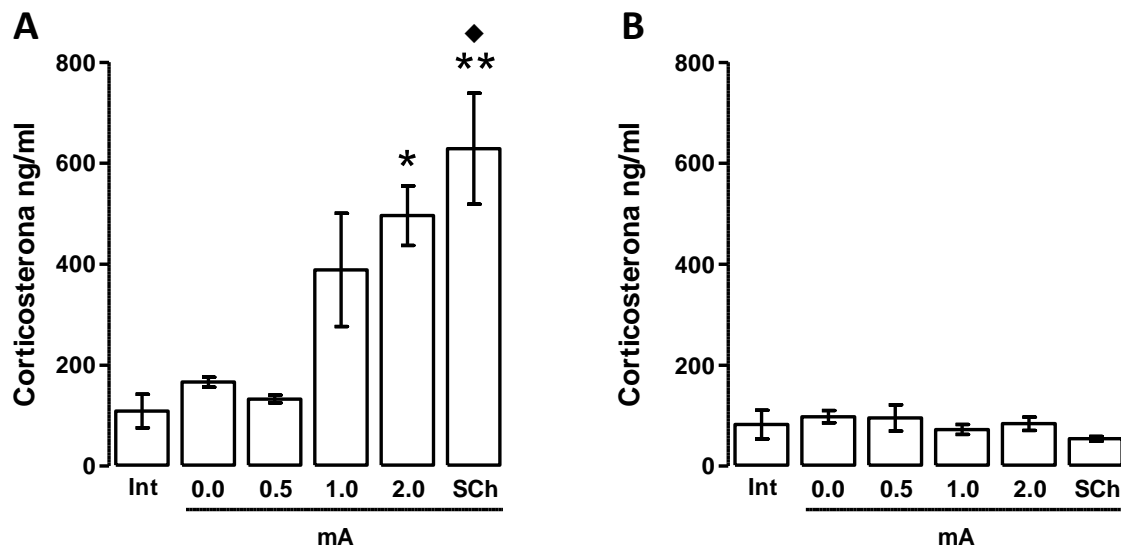


Figura 31. La concentración de CORT en sangre se relaciona con la intensidad del choque eléctrico. Promedio y error estándar de la concentración de CORT en suero. **(A).** Mediciones realizadas a los 15 min después del entrenamiento, se observa un aumento en comparación con los grupos Int y 0.5 mA ($*p < 0.05, **p < 0.005$) y en comparación con el grupo de 0.0 mA ($♦p < 0.01$). **(B).** No se encontraron diferencias significativas a los 45 minutos después del entrenamiento. Grupos: **Int**, sin tratamiento; **0.0 mA**, entrenado sin choque eléctrico; **0.5 mA**, entrenado con intensidad baja de choque eléctrico; **1.0 mA**, entrenado con intensidad moderada de choque eléctrico; **2.0 mA**, entrenado con intensidad alta de choque eléctrico; **SCh**, recibió un choque eléctrico de 2.0 mA, pero sin entrenamiento (control choque).

XI. DISCUSIÓN

Los principales resultados del presente estudio son: 1) como se esperaba, el entrenamiento con una alta intensidad de choque eléctrico produjo una mayor resistencia a la extinción que el entrenamiento con intensidades de choque eléctrico moderadas o bajas; 2) el grupo entrenado con la intensidad alta de choque eléctrico tuvo una mayor área de expresión de Arc en el estriado ventral que los grupos de choque eléctrico moderado y bajo, mientras que ninguno de los tratamientos produjo cambios en la expresión de Arc en el estriado dorsal; 3) el entrenamiento con intensidades de choque eléctrico moderadas y altas aumentó el número de neuronas que expresan la proteína Arc en el estriado ventral; 4) el grupo entrenado con la intensidad baja de choque eléctrico tuvo una mayor área de expresión de Arc en el GD que los demás grupos, mientras que ninguno de los tratamientos produjo ningún cambio significativo en la expresión de Arc en las demás regiones del hipocampo; 5) el entrenamiento con intensidades de choque eléctrico bajas y moderadas aumentó el número de neuronas que expresan la proteína de Arc en el GD.

El entrenamiento intenso en la tarea de evitación inhibitoria, con un choque eléctrico de 2.0 mA, produjo una traza de memoria altamente resistente a la extinción (Figura 23), en contraste con el grupo entrenado con 1.0 mA, el cual mostró una latencia de retención alta en la primera sesión de prueba, similar al grupo de entrenamiento intenso, pero mostró una rápida extinción, no siendo diferente de los animales entrenados con el choque eléctrico bajo y llegando a niveles similares al grupo 0.0 mA. Estos resultados confirman observaciones previas, donde el entrenamiento con un choque eléctrico de relativamente alta intensidad, también indujo una mayor resistencia a la extinción del aprendizaje de evitación inhibitoria (Bello-Medina et al., 2016; Garín-Aguilar et al., 2012; Prado-Alcalá et al., 1994; Prado-Alcalá et al., 2012).

Con respecto al análisis del área de señal de Arc, se observó que, ninguna de las intensidades de choque eléctrico utilizadas durante el entrenamiento, indujo efectos estadísticamente significativos en la expresión de Arc en las regiones dorsolateral y dorsomedial del estriado. Esto indica que, al momento de realizar la medición, dichas regiones no sufren cambios plásticos, independientemente de las intensidades utilizadas durante el entrenamiento de la tarea de evitación inhibitoria,

los cuales son comúnmente asociados al procesamiento de la información.

A diferencia de las regiones dorsales del estriado, en las regiones ventromedial y ventrolateral se observó un aumento significativo en la expresión de Arc, únicamente en el grupo sometido al entrenamiento intenso. Lo que pudiera deberse a que más neuronas estriatales están procesando los estímulos involucrados en la asociación aprendida, lo que se demuestra por el aumento de aproximadamente el 40% en el número de células que expresan la proteína Arc, observado en estas mismas regiones, tanto en los grupos de 1.0 mA como de 2.0 mA.

Aunque existe una discrepancia entre el análisis de la proporción del área de señal de Arc y el análisis de conteo celular, esto podría explicarse por una mayor distribución de la proteína Arc en el soma y las dendritas de las neuronas estriatales del grupo entrenado con 2.0 mA. Estudios anteriores han demostrado que la administración de clenbuterol o CORT en la amígdala inmediatamente después del entrenamiento de evitación inhibitoria, aumenta la concentración de la proteína de Arc en el hipocampo, y las cortezas prefrontal y del cíngulo. Estos tratamientos también mejoraron el desempeño de la evitación inhibitoria en una prueba de retención 48 h después del entrenamiento (McIntyre et al., 2005; McReynolds et al., 2010; McReynolds et al., 2014). Sin embargo, los métodos utilizados en el presente estudio no nos permitieron probar adecuadamente esta posibilidad, debido a que no se midió cuantitativamente la expresión de la proteína Arc, además de que los procedimientos histológicos utilizados no permitieron una preservación óptima de la estructura dendrítica.

La especificidad de los efectos del entrenamiento intenso sobre la expresión de la proteína de Arc, fue verificada por los resultados obtenidos en el grupo Int, el cual fue manipulado intencionalmente como todos los demás grupos con el fin de disecar exclusivamente la expresión de Arc debida al procesamiento de la información concerniente al entrenamiento. Como se esperaba, la cantidad de células que expresaron la proteína Arc en el grupo Int, no difirió de los grupos que sólo se expusieron a la caja de evitación inhibitoria o al choque eléctrico únicamente.

Cabe señalar, que se ha demostrado en estudios anteriores que la exploración espacial induce la expresión de la proteína Arc en aproximadamente el 20% de las neuronas estriatales (Vazdarjanova et al., 2006); de igual forma en este estudio también observamos que aproximadamente el 20% de las neuronas del estriado

ventral expresan Arc después de que las ratas exploraron la caja de evitación inhibitoria (grupo de 0.0 mA), sugiriendo que la exploración, puede explicar la baja cantidad de neuronas que expresan Arc en estas condiciones. Es importante notar que el grupo entrenado con baja intensidad no mostró un incremento en las células que expresan Arc en ninguna de las regiones del estriado. Esto podría indicar que se debe alcanzar un cierto umbral en la intensidad de la estimulación aversiva para poder inducir un incremento significativo de Arc en esta estructura.

Con respecto al análisis del área de señal de Arc en el hipocampo, se observó que ninguna de las intensidades de choque eléctrico utilizadas durante el entrenamiento, indujo algún efecto significativo en la expresión de Arc en las regiones de CA1, CA2 y CA3. Esto indica que, al igual que las regiones dorsales del estriado, al momento de realizar la medición, las diferentes intensidades utilizadas durante el entrenamiento de la tarea de evitación inhibitoria, no inducen cambios plásticos que comúnmente son asociados al procesamiento de la información.

Por otra parte, el GD presentó un aumento en la proporción del área de señal de Arc únicamente en el grupo entrenado con la intensidad más baja de choque eléctrico. Esto indica que probablemente las neuronas granulares del GD están involucradas en el procesamiento de la información de la tarea bajo una estimulación aversiva leve, pero cuando la intensidad del choque eléctrico aumenta; la participación del GD disminuye al grado de no ser diferente de las ratas que únicamente exploraron la caja de evitación inhibitoria.

De igual forma que en los resultados encontrados en el análisis del estriado, el GD muestra una discrepancia entre el análisis de la proporción del área de señal de Arc y el análisis de conteo celular. En este caso, se observó un incremento en el número de células Arc positivas tanto en el grupo de 0.5 mA, como en el grupo de 1.0 mA, sin embargo, a diferencia del primer grupo, el incremento encontrado en el último, fue menos significativo y no fue diferente del grupo 0.0 mA. Esta diferencia también podría explicarse, por una mayor distribución de la proteína Arc en el soma y las dendritas de las neuronas granulares del GD en el grupo entrenado con 0.5 mA.

Una posible explicación a estos resultados, radica en la capacidad del GD de generar nuevas neuronas en el animal adulto (Ehninger & Kempermann, 2008). Además se ha demostrado que estas nuevas neuronas presentan una mayor probabilidad de respuesta en comparación con neuronas generadas previamente en

la misma estructura (Schmidt-Hieber, Jonas, & Bischofberger, 2004). Sin embargo las células granulares del giro dentado en general, poseen una alta concentración de receptores a glucocorticoides, los cuales están presentes tanto en el soma como en las dendritas de las neuronas granulares (Morimoto, Morita, Ozawa, Yokoyama, & Kawata, 1996). Por lo tanto, es posible que la activación de estos receptores juegue un papel muy importante en la probabilidad de activación de las neuronas granulares. De esta forma cuando la experiencia es ligeramente aversiva, el hipocampo participa modulando el procesamiento de la información, sin embargo, cuando la experiencia es muy aversiva las neuronas granulares se hacen silentes, disminuyendo así la probabilidad de ser reclutadas y de sufrir cambios plásticos.

Este efecto en la activación neuronal del GD puede ser producido por los efectos nocivos que presenta la corticosterona en la neurogénesis. Varios estudios sugieren que la exposición aguda a una situación estresante disminuye la proliferación celular en el GD (Schoenfeld & Gould, 2013). La exposición aguda a un miembro dominante de la misma especie (derrota social), reduce la proliferación celular en el GD en ratones, musarañas y titíes (Gould, McEwen, Tanapat, Galea, & Fuchs, 1997; Gould, Tanapat, McEwen, Flugge, & Fuchs, 1998; Lagace et al., 2010). Del mismo modo, la exposición aguda a la trimetiltiazolina (TMT), un olor natural de los zorros (depredadores de los roedores), disminuye la proliferación celular en el GD de ratas (Hill, Kambo, Sun, Gorzalka, & Galea, 2006; Kambo & Galea, 2006; Mirescu, Peters, & Gould, 2004; Tanapat, Hastings, Rydel, Galea, & Gould, 2001). Más importante aún, el entrenamiento con estímulos eléctricos disminuye la proliferación celular en estos mismos animales (Malberg & Duman, 2003).

Además de los efectos observados en la proliferación celular, también se ha observado una disminución en la tasa de diferenciación neuronal en ratas luego de someterlas a una presentación aguda del olor a un depredador TMT (Tanapat et al., 2001) y una disminución de la supervivencia de las nuevas células granulares vinculada a la experiencia de derrota social aguda y de exposición aguda al olor de depredadores TMT (Tanapat et al., 2001; Thomas, Hotsenpiller, & Peterson, 2007).

Por otro lado, el aumento moderado del porcentaje de células expresando Arc en el grupo de 1.0 mA, podría indicar que, a pesar de la reducción en la expresión de esta proteína Arc en el GD, si existe un reclutamiento de neuronas, las cuales podrían no presentar cambios drásticos en la estructura y/o funcionalidad de esta región, pero

de igual forma participar en procesamiento de información vinculado al aprendizaje de la tarea de evitación inhibitoria.

De forma interesante, las mediciones de CORT en suero sanguíneo mostraron un incremento en los animales entrenados con el choque eléctrico alto; Sin embargo, este aumento también fue hallado en el grupo que recibió el choque eléctrico alto, pero no fue entrenado (SCh). Este resultado indica que la liberación de CORT obedece principalmente a la administración del estímulo aversivo y no al entrenamiento de la tarea de evitación inhibitoria.

Un hecho muy importante es que el aumento en la expresión de la proteína Arc en el estriado ventral no fue inducido en el grupo SCh, lo que indica que la expresión de Arc en el estriado ventral no está relacionada con la estimulación aversiva per se, como si lo es la liberación de CORT, sino que está relacionada con los procesos asociativos complejos, derivados de la interacción entre el contexto, el choque eléctrico alto y el desempeño motor implicado en la adquisición de la tarea.

En conjunto estos hallazgos demuestran que, en comparación con el entrenamiento bajo y moderado, el entrenamiento intenso induce una mayor expresión de la proteína Arc en un mayor número de neuronas del estriado ventral y probablemente, una mayor cantidad de Arc en estas neuronas. El papel de Arc en la plasticidad sináptica a largo plazo está bien documentado (Bramham, Worley, Moore, & Guzowski, 2008; Nonaka et al., 2014; Steward & Worley, 2002). El aumento de la expresión de la proteína de Arc producida por el entrenamiento intenso podría estar implicado en la generación de modificaciones sinápticas robustas, como las observadas en la densidad y morfología de las espinas dendríticas estriatales después de un entrenamiento intenso en la tarea de evitación inhibitoria (Bello-Medina et al., 2016). Estas modificaciones sinápticas están probablemente involucradas en los mecanismos que subyacen a la inducción de una mayor resistencia a la extinción observada en los animales sometidos a entrenamientos intensos. Por esta razón, se considera que la evaluación de la expresión de Arc nos brinda pistas razonables acerca de los mecanismos neuronales implicados en el aprendizaje incrementado.

Las dos medidas utilizadas para analizar la expresión de la proteína Arc, indicaron consistentemente que las regiones ventrales del estriado eran las únicas regiones estriatales donde esta expresión se incrementó después de un entrenamiento intenso. Esto puede explicarse por sus características anatómicas y

funcionales. Estas regiones estriatales se comunican con diferentes regiones corticales y límbicas (Berendse, Galis-de Graaf, & Groenewegen, 1992; McGeorge & Faull, 1989; Ramanathan, Hanley, Deniau, & Bolam, 2002; Voorn et al., 2004). Es importante destacar que la región estriatal ventrolateral se comunica con la corteza insular (Lasiter, Deems, & Glanzman, 1985), que está involucrada en asociaciones motivadas aversivamente (Bermudez-Rattoni, 2014), y se ha propuesto que el estriado ventrolateral participa en la integración de los atributos afectivos de los estímulos asociados (Lelos, Harrison, & Dunnett, 2011). Por otro lado, estas mismas mediciones, también indican un posible papel inhibitorio de las altas concentraciones de corticosterona en el GD.

Una inhibición de la actividad hipocampal y un incremento de la actividad estriatal inducido por experiencias estresantes, coincide con estudios previos en los cuales se ha demostrado que el estrés agudo modula los sistemas múltiples de memoria a favor del aprendizaje de estímulo-respuesta (dependiente del estriado), a expensas del aprendizaje espacial (dependiente del hipocampo) (Schwabe, Dalm, Schachinger, & Oitzl, 2008).

En dichos estudios, el entrenamiento en un laberinto en cruz de doble solución luego de una pre-exposición aguda a experiencias emotivas (antes del entrenamiento o la evocación de la tarea), tales como la restricción del movimiento o choques eléctricos inescapables (Kim, Lee, Han, & Packard, 2001), la exposición al olor de un depredador (Packard, 2009), o la inyección periférica de drogas ansiogénicas (Packard & Wingard, 2004), induce una predisposición en las ratas hacia el uso de la memoria de hábitos.

Además, se ha demostrado que la administración de fármacos ansiogénicos directamente en la BLA es suficiente para inducir la misma predisposición hacia la memoria de hábitos en ratas (Packard & Wingard, 2004). Inclusive en una tarea de laberinto en cruz de una sola solución, que requiere el uso tanto de aprendizajes cognitivo como de hábitos, la administración directa de drogas ansiogénicas en la BLA induce un efecto perjudicial sobre la memoria dependiente del hipocampo, lo cual a su vez, produce una facilitación del aprendizaje de hábitos; esto debido a la eliminación de la interferencia competitiva entre los sistemas de memoria cognitivo y de hábitos (Wingard & Packard, 2008).

En conclusión, el entrenamiento intenso induce un incremento tanto en la resistencia a la extinción como en la expresión de la proteína Arc y en el número de células activas en las regiones ventrales del estriado. Por otro lado, un efecto inverso fue observado en el GD, donde este tipo de entrenamiento indujo una disminución de la expresión de la proteína Arc y del número de células activas en comparación con el entrenamiento bajo. Estos resultados sugieren que, durante una experiencia de aprendizaje incrementado, existe una disminución en la actividad del giro dentado, así como un incremento en la actividad de las regiones ventrales del estriado lo que podría estar vinculado a un proceso de eliminación de la interferencia competitiva entre los sistemas de memoria cognitivo y de hábitos. Esto explicaría porque el aprendizaje incrementado presenta un aumento en la resistencia a la extinción. Puesto que es sabido que los aprendizajes de tipo procedimental o de hábitos son mucho más difíciles de extinguir que los cognitivos.

XII. PERSPECTIVAS

Como perspectivas, proponemos realizar la medición de la concentración de la proteína Arc en fracciones de sinaptoneurosomas, en ratas entrenadas con diferentes intensidades de choque eléctrico, con el fin de demostrar que el incremento observado en el área de señal de Arc y no en el conteo celular, obedece a la acumulación de la proteína en las dendritas.

Además, también proponemos realizar un análisis de la expresión de Arc en las diferentes regiones de la amígdala, así como una determinación de los tipos celulares que están expresando la proteína, en cada una de las estructuras analizadas.

Por otro lado, también se propone realizar la medición de la fosforilación del receptor a glucocorticoides en la serina 211, el cual es un indicador de la activación del receptor por la unión a ligando, así como de su actividad como factor de transcripción (trabajo en curso).

Por último, se propone realizar un análisis de la actividad electrofisiológica de las diferentes regiones de cada una de las estructuras antes mencionadas, durante el entrenamiento en la tarea de evitación inhibitoria utilizando diferentes intensidades de choque eléctrico.

XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguado-Aguilar, L. (2001). Aprendizaje y memoria. *Revista de Neurología*, 32(4), 373-381.
- Albin, R. L., Young, A. B., & Penney, J. B. (1989). The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends in Neurosciences*, 12(10), 366-375. doi: 10.1016/0166-2236(89)90074-X
- Amaral, D. G. (1978). A golgi study of cell types in the hilar region of the hippocampus in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 182(5), 851-914. doi: 10.1002/cne.901820508
- Amaral, D. G., Dolorfo, C., & Alvarez-Royo, P. (1991). Organization of CA1 projections to the subiculum: A PHA-L analysis in the rat. *Hippocampus*, 1(4), 415-435. doi: 10.1002/hipo.450010410
- Amaral, D. G., Ishizuka, N., & Claiborne, B. (1990). Neurons, numbers and the hippocampal network. *Progress in Brain Research*, 83, 1-11. doi: 10.1016/S0079-6123(08)61237-6
- Amaral, D. G., Scharfman, H. E., & Lavenex, P. (2007). The dentate gyrus: Fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Progress in Brain Research*, 163, 3-22. doi: 10.1016/S0079-6123(07)63001-5
- Ambrogio-Lorenzini, C. G., Baldi, E., Bucherelli, C., Sacchetti, B., & Tassoni, G. (1999). Neural topography and chronology of memory consolidation: A review of functional inactivation findings. *Neurobiology of Learning and Memory*, 71(1), 1-18. doi: 10.1006/nlme.1998.3865
- Andersen, P., Morris, R., Amaral, D., Bliss, T., & O'Keefe, J. (2009). *The hippocampus book*. Oxford University Press.
- Anderson, J. R. (2000). *Learning and memory: An integrated approach*. Wiley.
- Baddeley, A. D., & Hitch, G. (1974). Working Memory. En G. H. Bower (Ed.), *Psychology of Learning and motivation* (pp. 47-89): Academic Press.
- Bailey, C. H., Kandel, E. R., & Harris, K. M. (2015). Structural components of synaptic plasticity and memory consolidation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(7), a021758. doi: 10.1101/cshperspect.a021758
- Baldi, E., & Bucherelli, C. (2005). The inverted "U-shaped" dose-effect relationships in learning and memory: Modulation of arousal and consolidation. *Nonlinearity in*

- Biology, Toxicology, Medicine*, 3(1), 9-21. doi: 10.2201/nonlin.003.01.002
- Bammer, G. (1982). Pharmacological investigations of neurotransmitter involvement in passive avoidance responding: A review and some new results. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 6(3), 247-296. doi: 10.1016/0149-7634(82)90041-0
- Bayer, S., Yackel, J., & Puri, P. (1982). Neurons in the rat dentate gyrus granular layer substantially increase during juvenile and adult life. *Science*, 216(4548), 890-892. doi: 10.1126/science.7079742
- Bayer, S. A. (1982). Changes in the total number of dentate granule cells in juvenile and adult rats: A correlated volumetric and 3H-thymidine autoradiographic study. *Experimental Brain Research*, 46(3), 315-323. doi: 10.1007/bf00238626
- Bello-Medina, P. C., Flores, G., Quirarte, G. L., McGaugh, J. L., & Prado Alcalá, R. A. (2016). Mushroom spine dynamics in medium spiny neurons of dorsal striatum associated with memory of moderate and intense training. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(42), E6516-E6525. doi: 10.1073/pnas.1613680113
- Bennett, B. D., & Bolam, J. P. (1993). Two populations of calbindin D28k-immunoreactive neurones in the striatum of the rat. *Brain Research*, 610(2), 305-310. doi: 10.1016/0006-8993(93)91414-N
- Berendse, H. W., Galis-de Graaf, Y., & Groenewegen, H. J. (1992). Topographical organization and relationship with ventral striatal compartments of prefrontal corticostriatal projections in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 316(3), 314-347. doi: 10.1002/cne.903160305
- Bermudez-Rattoni, F. (2014). The forgotten insular cortex: Its role on recognition memory formation. *Neurobiology of Learning and Memory*, 109, 207-216. doi: 10.1016/j.nlm.2014.01.001
- Bliss, T. V., & Collingridge, G. L. (1993). A synaptic model of memory: Long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 361(6407), 31-39. doi: 10.1038/361031a0
- Bliss, T. V., & Lomo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of Physiology*, 232(2), 331-356. doi: 10.1113/jphysiol.1973.sp010273

- Boss, B. D., Peterson, G. M., & Maxwell Cowan, W. (1985). On the number of neurons in the dentate gyrus of the rat. *Brain Research*, 338(1), 144-150. doi: 10.1016/0006-8993(85)90257-4
- Bramham, C. R., Worley, P. F., Moore, M. J., & Guzowski, J. F. (2008). The immediate early gene Arc/Arg3.1: Regulation, mechanisms, and function. *The Journal of Neuroscience*, 28(46), 11760-11767. doi: 10.1523/jneurosci.3864-08.2008
- Bureš, J. A. N., Burešová, O., & Huston, J. P. (1976). *Techniques and basic experiments for the study of brain and behavior*. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier/North-Holland Inc.
- Burgess, N., Maguire, E. A., & O'Keefe, J. (2002). The human hippocampus and spatial and episodic memory. *Neuron*, 35(4), 625-641. doi: 10.1016/S0896-6273(02)00830-9
- Butters, N., Salmon, D., & Heindel, W. C. (1994). Specificity of the memory deficits associated with basal ganglia dysfunction. *Revue Neurologique*, 150(8-9), 580-587.
- Cappaert, N. L. M., Van Strien, N. M., & Witter, M. P. (2015). Hippocampal formation. En G. Paxinos (Ed.), *The rat nervous system* (pp. 511-573). San Diego: Academic Press.
- Cenquizca, L. A., & Swanson, L. W. (2007). Spatial organization of direct hippocampal field ca1 axonal projections to the rest of the cerebral cortex. *Brain Research Reviews*, 56(1), 1-26. doi: 10.1016/j.brainresrev.2007.05.002
- Claiborne, B. J., Amaral, D. G., & Cowan, W. M. (1990). Quantitative, three-dimensional analysis of granule cell dendrites in the rat dentate gyrus. *The Journal of Comparative Neurology*, 302(2), 206-219. doi: 10.1002/cne.903020203
- Cobos-Zapíaín, G. G., Salado-Castillo, R., Sánchez-Alavez, M., Quirarte, G. L., Roldán-Roldán, G., Díaz del Guante, M. A., & Prado-Alcalá, R. A. (1996). High level of footshock during inhibitory avoidance training prevents amnesia induced by intranigral injection of GABA antagonists. *Neurobiology of Learning and Memory*, 65(3), 202-206. doi: 10.1006/nlme.1996.0024
- Colombo, P. J., Davis, H. P., & Volpe, B. T. (1989). Allocentric spatial and tactile memory impairments in rats with dorsal caudate lesions are affected by preoperative behavioral training. *Behavioral Neuroscience*, 103(6), 1242-1250.

doi: 10.1037/0735-7044.103.6.1242

- Colwill, R. M., & Rescorla, R. A. (1988). The role of response-reinforcer associations increases throughout extended instrumental training. *Animal Learning & Behavior*, *16*(1), 105-111. doi: 10.3758/bf03209051
- Conrad, C. D., Lupien, S. J., & McEwen, B. S. (1999). Support for a bimodal role for Type II adrenal steroid receptors in spatial memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, *72*(1), 39-46. doi: 10.1006/nlme.1998.3898
- Cordero, M. I., Merino, J. J., & Sandi, C. (1998). Correlational relationship between shock intensity and corticosterone secretion on the establishment and subsequent expression of contextual fear conditioning. *Behavioral Neuroscience*, *112*(4), 885-891. doi: 10.1037/0735-7044.112.4.885
- Correll, R. E., & Scoville, W. B. (1967). Significance of delay in the performance of monkeys with medial temporal lobe resections. *Experimental Brain Research*, *4*(1), 85-96. doi: 10.1007/bf00235220
- Cottrell, G. A., & Nakajima, S. (1977). Effect of corticosteroids in the hippocampus on passive avoidance behavior in the rat. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, *7*(3), 277-280. doi: 10.1016/0091-3057(77)90146-0
- Cowan, R. L., Wilson, C. J., Emson, P. C., & Heizmann, C. W. (1990). Parvalbumin-containing gabaergic interneurons in the rat neostriatum. *The Journal of Comparative Neurology*, *302*(2), 197-205. doi: 10.1002/cne.903020202
- Chesselet, M. F., & Graybiel, A. M. (1986). Striatal neurons expressing somatostatin-like immunoreactivity: Evidence for a peptidergic interneuronal system in the cat. *Neuroscience*, *17*(3), 547-571. doi: 10.1016/0306-4522(86)90030-8
- de Kloet, E. R., Vreugdenhil, E., Oitzl, M. S., & Joëls, M. (1998). Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocrine Reviews*, *19*(3), 269-301. doi: 10.1210/edrv.19.3.0331
- DeFelipe, J. (2015). The dendritic spine story: An intriguing process of discovery. *Frontiers in Neuroanatomy*, *9*(14). doi: 10.3389/fnana.2015.00014
- Deniau, J. M., & Chevalier, G. (1985). Disinhibition as a basic process in the expression of striatal functions. II. The striato-nigral influence on thalamocortical cells of the ventromedial thalamic nucleus. *Brain Research*, *334*(2), 227-233. doi: 10.1016/0006-8993(85)90214-8
- Desmond, N. L., & Levy, W. B. (1982). A quantitative anatomical study of the granule

- cell dendritic fields of the rat dentate gyrus using a novel probabilistic method. *The Journal of Comparative Neurology*, 212(2), 131-145. doi: 10.1002/cne.902120204
- Deus, J., Pujol, J., & Espert, R. (1996). Memoria y ganglios basales: Una revisión teórica. *Psicología Conductual*, 4(1), 337-361.
- Devan, B. D., McDonald, R. J., & White, N. M. (1999). Effects of medial and lateral caudate-putamen lesions on place- and cue-guided behaviors in the water maze: Relation to thigmotaxis. *Behavioural Brain Research*, 100(1-2), 5-14. doi: 10.1016/S0166-4328(98)00107-7
- Devan, B. D., & White, N. M. (1999). Parallel information processing in the dorsal striatum: Relation to hippocampal function. *The Journal of Neuroscience*, 19(7), 2789-2798.
- Diamond, D. M., Bennett, M. C., Fleshner, M., & Rose, G. M. (1992). Inverted-U relationship between the level of peripheral corticosterone and the magnitude of hippocampal primed burst potentiation. *Hippocampus*, 2(4), 421-430. doi: 10.1002/hipo.450020409
- Diamond, D. M., Fleshner, M., Ingersoll, N., & Rose, G. (1996). Psychological stress impairs spatial working memory: Relevance to electrophysiological studies of hippocampal function. *Behavioral Neuroscience*, 110(4), 661-672. doi: 10.1037/0735-7044.110.4.661
- Díaz-Trujillo, A., Contreras, J., Medina, A. C., Silveyra-Leon, G. A., Antaramian, A., Quirarte, G. L., & Prado-Alcalá, R. A. (2009). Enhanced inhibitory avoidance learning prevents the long-term memory-impairing effects of cycloheximide, a protein synthesis inhibitor. *Neurobiology of Learning and Memory*, 91(3), 310-314. doi: 10.1016/j.nlm.2008.10.006
- Díaz del Guante, M. A., Rivas-Arancibia, S., Quirarte, G., & Prado-Alcalá, R. A. (1990). Over-reinforcement protects against memory deficits induced by muscarinic blockade of the striatum. *Boletín de Estudios Médicos y Biológicos*, 38(3-4), 49-53.
- Divac, I., Rosvold, H. E., & Szwarcbart, M. K. (1967). Behavioral effects of selective ablation of the caudate nucleus. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 63., 183-190. doi: 10.1037/h0024348
- Dudai, Y. (1989). *The neurobiology of memory: Concepts, findings, trends* New York,

NY, US: Oxford University Press.

- Dudman, J. T., & Gerfen, C. R. (2015). The basal ganglia. En G. Paxinos (Ed.), *The rat nervous system* (pp. 391-440). San Diego: Academic Press.
- Durán-Arévalo, M., Cruz-Morales, S. E., & Prado-Alcalá, R. A. (1990). Is acetylcholine involved in memory consolidation of over-reinforced learning? *Brain Research Bulletin*, 24(6), 725-727. doi: 10.1016/0361-9230(90)90129-N
- Ehninger, D., & Kempermann, G. (2008). Neurogenesis in the adult hippocampus. *Cell and Tissue Research*, 331(1), 243-250. doi: 10.1007/s00441-007-0478-3
- Evans, A. E., Kelly, C. M., Precious, S. V., & Rosser, A. E. (2012). Molecular regulation of striatal development: A review. *Anatomy Research International*, 2012, 1-14. doi: 10.1155/2012/106529
- Fernandez-Ruiz, J., Wang, J., Aigner, T. G., & Mishkin, M. (2001). Visual habit formation in monkeys with neurotoxic lesions of the ventrocaudal neostriatum. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(7), 4196-4201. doi: 10.1073/pnas.061022098
- Fonnum, F., Storm-Mathisen, J., & Divac, I. (1981). Biochemical evidence for glutamate as neurotransmitter in corticostriatal and corticothalamic fibres in rat brain. *Neuroscience*, 6(5), 863-873. doi: 10.1016/0306-4522(81)90168-8
- Freund, T. F., & Buzsáki, G. (1996). Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus*, 6(4), 347-470. doi: 10.1002/(SICI)1098-1063(1996)6:4<347::AID-HIPO1>3.0.CO;2-I
- Frotscher, M., Seress, L., Schwerdtfeger, W. K., & Buhl, E. (1991). The mossy cells of the fascia dentata: A comparative study of their fine structure and synaptic connections in rodents and primates. *The Journal of Comparative Neurology*, 312(1), 145-163. doi: 10.1002/cne.903120111
- Gaarskjaer, F. B. (1978). Organization of the mossy fiber system of the rat studied in extended hippocampi. I. Terminal area related to number of granule and pyramidal cells. *The Journal of Comparative Neurology*, 178(1), 49-71. doi: 10.1002/cne.901780104
- Garín-Aguilar, M. E., Díaz-Cintra, S., Quirarte, G. L., Aguilar-Vázquez, A., Medina, A. C., & Prado-Alcalá, R. A. (2012). Extinction procedure induces pruning of dendritic spines in CA1 hippocampal field depending on strength of training in rats. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 6, 12. doi:

10.3389/fnbeh.2012.00012

- Garín-Aguilar, M. E., Medina, A. C., Quirarte, G. L., McGaugh, J. L., & Prado-Alcalá, R. A. (2014). Intense aversive training protects memory from the amnesic effects of hippocampal inactivation. *Hippocampus*, *24*(1), 102-112. doi: 10.1002/hipo.22210
- Giordano, M., & Prado-Alcalá, R. A. (1986). Retrograde amnesia induced by post-trial injection of atropine into the caudate-putamen Protective effect of the negative reinforcer. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, *24*(4), 905-909. doi: 10.1016/0091-3057(86)90435-1
- Gold, P. E. (2003). Acetylcholine: Cognitive and brain functions. *Neurobiology of Learning and Memory*, *80*(3), 177. doi: 10.1016/j.nlm.2003.07.002
- Gonzalez-Franco, D. A., Bello-Medina, P. C., Serafín, N., Prado-Alcalá, R. A., & Quirarte, G. L. (en preparación). Intense inhibitory avoidance training prevents amnesic effects of anisomycin administration into the striatum.
- Gould, E., McEwen, B. S., Tanapat, P., Galea, L. A. M., & Fuchs, E. (1997). Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *The Journal of Neuroscience*, *17*(7), 2492-2498.
- Gould, E., Tanapat, P., McEwen, B. S., Flugge, G., & Fuchs, E. (1998). Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(6), 3168-3171. doi: 10.1073/pnas.95.6.3168
- Graybiel, A. M. (1998). The basal ganglia and chunking of action repertoires. *Neurobiology of Learning and Memory*, *70*(1), 119-136. doi: 10.1006/nlme.1998.3843
- Green, R. H., Beatty, W. W., & Schwartzbaum, J. S. (1967). Comparative effects of septo-hippocampal and caudate lesions on avoidance behavior in rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, *64*(3), 444-452. doi: 10.1037/h0025195
- Gulyás, A. I., Miettinen, R., Jacobowitz, D. M., & Freund, T. F. (1992). Calretinin is present in non-pyramidal cells of the rat hippocampus—I. A new type of neuron specifically associated with the mossy fibre system. *Neuroscience*, *48*(1), 1-27. doi: 10.1016/0306-4522(92)90334-X

- Guzowski, J. F. (2002). Insights into immediate-early gene function in hippocampal memory consolidation using antisense oligonucleotide and fluorescent imaging approaches. *Hippocampus*, 12(1), 86-104. doi: 10.1002/hipo.10010
- Guzowski, J. F., Lyford, G. L., Stevenson, G. D., Houston, F. P., McGaugh, J. L., Worley, P. F., & 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. *The Journal of Neuroscience*, 20(11), 3993-4001.
- Guzowski, J. F., Setlow, B., Wagner, E. K., & McGaugh, J. L. (2001). Experience-dependent gene expression in the rat hippocampus after spatial learning: A comparison of the immediate-early genes Arc, c-fos, and zif268. *The Journal of Neuroscience*, 21(14), 5089-5098. doi: 21/14/5089 [pii]
- Han, Z.-S., Buhl, E. H., Lörinczi, Z., & Somogyi, P. (1993). A high degree of spatial selectivity in the axonal and dendritic domains of physiologically identified local-circuit neurons in the dentate gyms of the rat hippocampus. *European Journal of Neuroscience*, 5(5), 395-410. doi: 10.1111/j.1460-9568.1993.tb00507.x
- Hazlett, J. C., & Farkas, N. (1978). Short axon molecular layer neurons in the opossum fascia dentata: A Golgi study. *Brain Research*, 143(2), 355-360. doi: 10.1016/0006-8993(78)90575-9
- Hebb, D. O. (1949). *The organization of behavior: A neuropsychological theory* New York: John Wiley & Sons Inc.
- Heindel, W. C., Butters, N., & Salmon, D. P. (1988). Impaired learning of a motor skill in patients with Huntington's disease. *Behavioral Neuroscience*, 102(1), 141-147. doi: 10.1037/0735-7044.102.1.141
- Hilgard, E. R., & Bower, G. H. (1987). *Teorías del aprendizaje* (10^{ma} ed.) México: Trillas.
- Hill, M. N., Kambo, J. S., Sun, J. C., Gorzalka, B. B., & Galea, L. A. M. (2006). Endocannabinoids modulate stress-induced suppression of hippocampal cell proliferation and activation of defensive behaviours. *European Journal of Neuroscience*, 24(7), 1845-1849. doi: 10.1111/j.1460-9568.2006.05061.x
- Hyman, S. E. (2005). Addiction: A disease of learning and memory. *American Journal of Psychiatry*, 162(8), 1414-1422. doi: 10.1176/appi.ajp.162.8.1414
- Ishizuka, N., Cowan, W. M., & Amaral, D. G. (1995). A quantitative analysis of the

- dendritic organization of pyramidal cells in the rat hippocampus. *The Journal of Comparative Neurology*, 362(1), 17-45. doi: 10.1002/cne.903620103
- Ishizuka, N., Weber, J., & Amaral, D. G. (1990). Organization of intrahippocampal projections originating from CA3 pyramidal cells in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 295(4), 580-623. doi: 10.1002/cne.902950407
- Ito, M., & Doya, K. (2015). Distinct neural representation in the dorsolateral, dorsomedial, and ventral parts of the striatum during fixed- and free-choice tasks. *The Journal of Neuroscience*, 35(8), 3499-3514. doi: 10.1523/jneurosci.1962-14.2015
- Izquierdo, I., & Medina, J. H. (1993). Role of the amygdala, hippocampus and entorhinal cortex in memory consolidation and expression. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 26(6), 573-589.
- Jarrard, L. E. (1993). On the role of the hippocampus in learning and memory in the rat. *Behavioral and Neural Biology*, 60(1), 9-26. doi: 10.1016/0163-1047(93)90664-4
- Jinno, S., & Kosaka, T. (2006). Cellular architecture of the mouse hippocampus: A quantitative aspect of chemically defined GABAergic neurons with stereology. *Neuroscience Research*, 56(3), 229-245. doi: 10.1016/j.neures.2006.07.007
- Joel, D., & Weiner, I. (2000). The connections of the dopaminergic system with the striatum in rats and primates: An analysis with respect to the functional and compartmental organization of the striatum. *Neuroscience*, 96(3), 451-474. doi: 10.1016/S0306-4522(99)00575-8
- Jog, M. S., Kubota, Y., Connolly, C. I., Hillegaart, V., & Graybiel, A. M. (1999). Building neural representations of habits. *Science*, 286(5445), 1745-1749. doi: 10.1126/science.286.5445.1745
- Jones, M. W., & McHugh, T. J. (2011). Updating hippocampal representations: CA2 joins the circuit. *Trends in Neurosciences*, 34(10), 526-535. doi: 10.1016/j.tins.2011.07.007
- Kambo, J. S., & Galea, L. A. M. (2006). Activational levels of androgens influence risk assessment behaviour but do not influence stress-induced suppression in hippocampal cell proliferation in adult male rats. *Behavioural Brain Research*, 175(2), 263-270. doi: 10.1016/j.bbr.2006.08.032
- Kawagoe, R., Takikawa, Y., & Hikosaka, O. (1998). Expectation of reward modulates

- cognitive signals in the basal ganglia. *Nature Neuroscience*, 1(5), 411-416. doi: 10.1038/1625
- Kawaguchi, Y., Wilson, C. J., Augood, S. J., & Emson, P. C. (1995). Striatal interneurons: Chemical, physiological and morphological characterization. *Trends in Neurosciences*, 18(12), 527-535. doi: 10.1016/0166-2236(95)98374-8
- Kemp, J. M., & Powell, T. P. S. (1971). The structure of the caudate nucleus of the cat: Light and electron microscopy. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 262(845), 383-401. doi: 10.1098/rstb.1971.0102
- Kempermann, G., Song, H., & Gage, F. H. (2015). Neurogenesis in the adult hippocampus. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(9), a018812. doi: 10.1101/cshperspect.a018812
- Kesner, R. P., Bolland, B. L., & Dakis, M. (1993). Memory for spatial locations, motor responses, and objects: Triple dissociation among the hippocampus, caudate nucleus, and extrastriate visual cortex. *Experimental Brain Research*, 93(3), 462-470. doi: 10.1007/bf00229361
- Kim, J. J., Lee, H. J. J., Han, J. S., & Packard, M. G. (2001). Amygdala is critical for stress-induced modulation of hippocampal long-term potentiation and learning. *The Journal of Neuroscience*, 21(14), 5222-5228.
- Kimura, M. (1995). Role of basal ganglia in behavioral learning. *Neuroscience Research*, 22(4), 353-358. doi: 10.1016/0168-0102(95)00914-F
- Kimura, M., & Graybiel, A. M. (1995). *Functions of cortico-basal ganglia loop USA*: Springer.
- Kirkby, R. J., & Kimble, D. P. (1968). Avoidance and escape behavior following striatal lesions in the rat. *Experimental Neurology*, 20(2), 215-227. doi: 10.1016/0014-4886(68)90095-2
- Kirkby, R. J., Polgar, S., & Coyle, I. R. (1981). Caudate nucleus lesions impair the ability of rats to learn a simple straight-alley task. *Perceptual and Motor Skills*, 52(2), 499-502. doi: 10.2466/pms.1981.52.2.499
- Klausberger, T. (2009). GABAergic interneurons targeting dendrites of pyramidal cells in the CA1 area of the hippocampus. *European Journal of Neuroscience*, 30(6), 947-957. doi: 10.1111/j.1460-9568.2009.06913.x

- Klausberger, T., & Somogyi, P. (2008). Neuronal diversity and temporal dynamics: The unity of hippocampal circuit operations. *Science*, *321*(5885), 53-57. doi: 10.1126/science.1149381
- Knowlton, B. J., Mangels, J. A., & Squire, L. R. (1996). A neostriatal habit learning system in humans. *Science*, *273*(5280), 1399-1402. doi: 10.1126/science.273.5280.1399
- Kosaka, T. (1983). Axon initial segments of the granule cell in the rat dentate gyrus: Synaptic contacts on bundles of axon initial segments. *Brain Research*, *274*(1), 129-134. doi: 10.1016/0006-8993(83)90527-9
- Kosaka, T., Hama, K., & Nagatsu, I. (1987). Tyrosine hydroxylase-immunoreactive intrinsic neurons in the rat cerebral cortex. *Experimental Brain Research*, *68*(2), 393-405. doi: 10.1007/bf00248804
- Kosaka, T., Hama, K., & Wu, J.-Y. (1984). GABAergic synaptic boutons in the granule cell layer of rat dentate gyrus. *Brain Research*, *293*(2), 353-359. doi: 10.1016/0006-8993(84)91242-3
- Kovacs, K. J. (1998). c-Fos as a transcription factor: A stressful (re)view from a functional map. *Neurochemistry International*, *33*(4), 287-297. doi: 10.1016/S0197-0186(98)00023-0
- Kreitzer, A. C. (2009). Physiology and pharmacology of striatal neurons. *Annual Review of Neuroscience*, *32*, 127-147. doi: 10.1146/annurev.neuro.051508.135422.
- Kreitzer, A. C., & Malenka, R. C. (2008). Striatal plasticity and basal ganglia circuit function. *Neuron*, *60*(4), 543-554. doi: 10.1016/j.neuron.2008.11.005.
- Lagace, D. C., Donovan, M. H., DeCarolis, N. A., Farnbauch, L. A., Malhotra, S., Berton, O., . . . Eisch, A. J. (2010). Adult hippocampal neurogenesis is functionally important for stress-induced social avoidance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(9), 4436-4441. doi: 10.1073/pnas.0910072107
- Lamprecht, R., & LeDoux, J. (2004). Structural plasticity and memory. *Nature Reviews Neuroscience*, *5*(1), 45-54. doi: 10.1038/nrn1301
- Lasiter, P. S., Deems, D. A., & Glanzman, D. L. (1985). Thalamocortical relations in taste aversion learning: I. Involvement of gustatory thalamocortical projections in taste aversion learning. *Behavioral Neuroscience*, *99*(3), 454-476. doi:

10.1037/0735-7044.99.3.454

- Laurberg, S. (1979). Commissural and intrinsic connections of the rat hippocampus. *The Journal of Comparative Neurology*, *184*(4), 685-708. doi: 10.1002/cne.901840405
- Laurberg, S., & Sørensen, K. E. (1981). Associational and commissural collaterals of neurons in the hippocampal formation (Hilus fasciae dentatae and subfield CA3). *Brain Research*, *212*(2), 287-300. doi: 10.1016/0006-8993(81)90463-7
- Lauwereyns, J., Takikawa, Y., Kawagoe, R., Kobayashi, S., Koizumi, M., Coe, B., . . . Hikosaka, O. (2002a). Feature-based anticipation of cues that predict reward in monkey caudate nucleus. *Neuron*, *33*(3), 463-473. doi: 10.1016/S0896-6273(02)00571-8
- Lauwereyns, J., Watanabe, K., Coe, B., & Hikosaka, O. (2002b). A neural correlate of response bias in monkey caudate nucleus. *Nature*, *418*(6896), 413-417. doi: 10.1038/nature00892
- Lelos, M. J., Harrison, D. J., & Dunnett, S. B. (2011). Impaired sensitivity to Pavlovian stimulus–outcome learning after excitotoxic lesion of the ventrolateral neostriatum. *Behavioural Brain Research*, *225*(2), 522-528. doi: 10.1016/j.bbr.2011.08.017
- Link, W., Konietzko, U., Kauselmann, G., Krug, M., Schwanke, B., Frey, U., & Kuhl, D. (1995). Somatodendritic expression of an immediate early gene is regulated by synaptic activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *92*(12), 5734-5738. doi: 10.1073/pnas.92.12.5734
- Lorente de Nò, R. (1934). Studies on the structure of the cerebral cortex II. Continuation of the study of the ammonic system. *Journal für Psychologie und Neurologie*, *46*, 113-177.
- Lozano, Y. R., Serafín, N., Prado-Alcalá, R. A., Roozendaal, B., & Quirarte, G. L. (2013). Glucocorticoids in the dorsomedial striatum modulate the consolidation of spatial but not procedural memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, *101*, 55-64. doi: 10.1016/j.nlm.2013.01.001
- Lyford, G. L., Yamagata, K., Kaufmann, W. E., Barnes, C. A., Sanders, L. K., Copeland, N. G., . . . 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*(2), 433-445. doi: 10.1016/0896-6273(95)90299-6

- Lynch, M. A. (2004). Long-term potentiation and memory. *Physiological Reviews*, 84(1), 87-136. doi: 10.1152/physrev.00014.2003
- Malberg, J. E., & Duman, R. S. (2003). Cell proliferation in adult hippocampus is decreased by inescapable stress: Reversal by fluoxetine treatment. *Neuropsychopharmacology*, 28(9), 1562-1571.
- Martin, A., Wiggs, C. L., & Weisberg, J. (1997). Modulation of human medial temporal lobe activity by form, meaning, and experience. *Hippocampus*, 7(6), 587-593. doi: 10.1002/(SICI)1098-1063(1997)7:6<587::AID-HIPO1>3.0.CO;2-C
- Martínez, A., Lübke, J., Del Río, J. A., Soriano, E., & Frotscher, M. (1996). Regional variability and postsynaptic targets of chandelier cells in the hippocampal formation of the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 376(1), 28-44. doi: 10.1002/(SICI)1096-9861(19961202)376:1<28::AID-CNE2>3.0.CO;2-Q
- Martone, M., Butters, N., Payne, M., Becker, J. T., & Sax, D. S. (1984). Dissociations between skill learning and verbal recognition in amnesia and dementia. *Archives of Neurology*, 41(9), 965-970. doi: 10.1001/archneur.1984.04050200071020
- McDonald, R. J., & White, N. M. (1993). A triple dissociation of memory systems: Hippocampus, amygdala, and dorsal striatum. *Behavioral Neuroscience*, 107(1), 3-22.
- McEwen, B. S., & Sapolsky, R. M. (1995). Stress and cognitive function. *Current Opinion in Neurobiology*, 5(2), 205-216. doi: 10.1016/0959-4388(95)80028-X
- McGaugh, J. L. (2013). Making lasting memories: Remembering the significant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110 Suppl 2, 10402-10407. doi: 10.1073/pnas.1301209110
- McGaugh, J. L., & Roozendaal, B. (2002). Role of adrenal stress hormones in forming lasting memories in the brain. *Current Opinion in Neurobiology*, 12(2), 205-210. doi: 10.1016/S0959-4388(02)00306-9
- McGeorge, A. J., & Faull, R. L. (1989). The organization of the projection from the cerebral cortex to the striatum in the rat. *Neuroscience*, 29(3), 503-537. doi: 10.1016/0306-4522(89)90128-0
- McIntyre, C. K., Miyashita, T., Setlow, B., Marjon, K. D., Steward, O., Guzowski, J. F., & McGaugh, J. L. (2005). Memory-influencing intra-basolateral amygdala drug infusions modulate expression of Arc protein in the hippocampus. *Proceedings*

- of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(30), 10718-10723. doi: 10.1073/pnas.0504436102
- McReynolds, J. R., Donowho, K., Abdi, A., McGaugh, J. L., Roozendaal, B., & McIntyre, C. K. (2010). Memory-enhancing corticosterone treatment increases amygdala norepinephrine and Arc protein expression in hippocampal synaptic fractions. *Neurobiology of Learning and Memory*, 93(3), 312-321. doi: 10.1016/j.nlm.2009.11.005
- McReynolds, J. R., Holloway-Erickson, C. M., Parmar, T. U., & McIntyre, C. K. (2014). Corticosterone-induced enhancement of memory and synaptic Arc protein in the medial prefrontal cortex. *Neurobiology of Learning and Memory*, 112, 148-157. doi: 10.1016/j.nlm.2014.02.007
- Medina, A. C., Charles, J. R., Espinoza-González, V., Sánchez-Resendis, O., Prado-Alcalá, R. A., Roozendaal, B., & Quirarte, G. L. (2007). Glucocorticoid administration into the dorsal striatum facilitates memory consolidation of inhibitory avoidance training but not of the context or footshock components. *Learning & Memory* 14(10), 673-677. doi: 10.1101/lm.654407
- Mengual, E., de las Heras, S., Erro, E., Lanciego, J. L., & Gimenez-Amaya, J. M. (1999). Thalamic interaction between the input and the output systems of the basal ganglia. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 16(3), 187-200. doi: 10.1016/S0891-0618(99)00010-1
- Miller, R. (1981). *Meaning and purpose in the intact brain: A philosophical, psychological, and biological account of conscious processes* New York: Oxford University Press.
- Mirescu, C., Peters, J. D., & Gould, E. (2004). Early life experience alters response of adult neurogenesis to stress. *Nature Neuroscience* 7(8), 841-846. doi: 10.1038/nn1290
- Mizumori, S. J., Cooper, B. G., Leutgeb, S., & Pratt, W. E. (2000). A neural systems analysis of adaptive navigation. *Molecular Neurobiology*, 21(1-2), 57-82. doi: 10.1385/MN:21:1-2:057
- Mizumori, S. J., Puryear, C. B., & Martig, A. K. (2009). Basal ganglia contributions to adaptive navigation. *Behavioural Brain Research*, 199(1), 32-42. doi: 10.1016/j.bbr.2008.11.014
- Mizumori, S. J., Yeshenko, O., Gill, K. M., & Davis, D. M. (2004). Parallel processing

- across neural systems: Implications for a multiple memory system hypothesis. *Neurobiology of Learning and Memory*, 82(3), 278-298. doi: 10.1016/j.nlm.2004.07.007
- Morgado, I. (2005). Psicobiología del aprendizaje y la memoria: Fundamentos y avances recientes. *Revista de Neurología*, 40(5), 289-297.
- Morimoto, M., Morita, N., Ozawa, H., Yokoyama, K., & Kawata, M. (1996). Distribution of glucocorticoid receptor immunoreactivity and mRNA in the rat brain: An immunohistochemical and in situ hybridization study. *Neuroscience Research*, 26(3), 235-269. doi: 10.1016/S0168-0102(96)01105-4
- Morris, R. (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 11(1), 47-60. doi: 10.1016/0165-0270(84)90007-4
- Morris, R. G. M., & Frey, U. (1997). Hippocampal synaptic plasticity: Role in spatial learning or the automatic recording of attended experience? *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 352(1360), 1489-1503. doi: 10.1098/rstb.1997.0136
- Naber, P. A., Lopes da Silva, F. H., & Witter, M. P. (2001). Reciprocal connections between the entorhinal cortex and hippocampal fields CA1 and the subiculum are in register with the projections from CA1 to the subiculum. *Hippocampus*, 11(2), 99-104. doi: 10.1002/hipo.1028
- Nadel, L. (1991). The hippocampus and space revisited. *Hippocampus*, 1(3), 221-229. doi: 10.1002/hipo.450010302
- Nadel, L., & Moscovitch, M. (1997). Memory consolidation, retrograde amnesia and the hippocampal complex. *Current Opinion in Neurobiology*, 7(2), 217-227. doi: 10.1016/S0959-4388(97)80010-4
- National Research Council. (2011). *Guide for the care and use of laboratory animals* (8th ed.) Washington, DC: The National Academy of Sciences.
- Neill, D. B., & Grossman, S. P. (1970). Behavioral effects of lesions or cholinergic blockade of the dorsal and ventral caudate of rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 71(2), 311-317. doi: 10.1037/h0029110
- Nonaka, M., Fujii, H., Kim, R., Kawashima, T., Okuno, H., & Bito, H. (2014). Untangling the two-way signalling route from synapses to the nucleus, and from the nucleus back to the synapses. *Philosophical Transactions of the Royal Society B:*

- Biological Sciences*, 369(1633). doi: 10.1098/rstb.2013.0150
- NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. (2001). Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, Resume, 65. México: SENASICA.
- O'Keefe, J., & Dostrovsky, J. (1971). The hippocampus as a spatial map: Preliminary evidence from unit activity in the freely moving rat. *Brain Research*, 34, 171-175. doi: 10.1016/0006-8993(71)90358-1
- O'Keefe, J., & Nadel, L. (1978). *The hippocampus as a cognitive map* Oxford: Clarendon Press.
- O'Keefe, J., & Nadel, L. (1979). Précis of O'Keefe & Nadel's *The hippocampus as a cognitive map*. *Behavioral and Brain Sciences*, 2(4), 487-494. doi: 10.1017/S0140525X00063949
- Okuno, H. (2011). Regulation and function of immediate-early genes in the brain: Beyond neuronal activity markers. *Neuroscience Research*, 69(3), 175-186. doi: 10.1016/j.neures.2010.12.007
- Olton, D. S., Becker, J. T., & Handelmann, G. E. (1979). Hippocampus, space, and memory. *Behavioral and Brain Sciences*, 2(3), 313-365. doi: 10.1017/S0140525X00062713
- Olton, D. S., & Samuelson, R. J. (1976). Remembrance of places passed: Spatial memory in rats. *Journal of Experimental Psychology-Animal Behavior Processes*, 2, 97-116. doi: 10.1037/0097-7403.2.2.97
- Ons, S., Marti, O., & Armario, A. (2004). Stress-induced activation of the immediate early gene Arc (activity-regulated cytoskeleton-associated protein) is restricted to telencephalic areas in the rat brain: Relationship to c-fos mRNA. *Journal of Neurochemistry*, 89(5), 1111-1118. doi: 10.1111/j.1471-4159.2004.02396.x
- Orbach, J. J., Milner, B. B., & Rasmussen, T. T. (1960). Learning and retention in monkeys after amygdala-hippocampus resection. *Archives of Neurology*, 3(3), 230-251. doi: 10.1001/archneur.1960.00450030008002
- Packard, M. G. (2009). Anxiety, cognition, and habit: A multiple memory systems perspective. *Brain Research*, 1293, 121-128. doi: 10.1016/j.brainres.2009.03.029
- Packard, M. G., Hirsh, R., & White, N. M. (1989). Differential effects of fornix and caudate nucleus lesions on two radial maze tasks: Evidence for multiple

- memory systems. *The Journal of Neuroscience*, 9(5), 1465-1472.
- Packard, M. G., & Knowlton, B. J. (2002). Learning and memory functions of the basal ganglia. *Annual Review of Neuroscience*, 25, 563-593. doi: 10.1146/annurev.neuro.25.112701.142937
- Packard, M. G., & McGaugh, J. L. (1992). Double dissociation of fornix and caudate nucleus lesions on acquisition of two water maze tasks: Further evidence for multiple memory systems. *Behavioral Neuroscience*, 106(3), 439-446. doi: 10.1037/0735-7044.106.3.439
- Packard, M. G., & Teather, L. A. (1997). Double dissociation of hippocampal and dorsal-striatal memory systems by posttraining intracerebral injections of 2-amino-5-phosphonopentanoic acid. *Behavioral Neuroscience*, 111(3), 543-551. doi: 10.1037/0735-7044.111.3.543
- Packard, M. G., & Teather, L. A. (1998). Amygdala modulation of multiple memory systems: Hippocampus and caudate-putamen. *Neurobiology of Learning and Memory*, 69(2), 163-203. doi: 10.1006/nlme.1997.3815
- Packard, M. G., & Wingard, J. C. (2004). Amygdala and "emotional" modulation of the relative use of multiple memory systems. *Neurobiology of Learning and Memory*, 82(3), 243-252. doi: 10.1016/j.nlm.2004.06.008
- Papp, E., Leinekugel, X., Henze, D. A., Lee, J., & Buzsáki, G. (2001). The apical shaft of CA1 pyramidal cells is under GABAergic interneuronal control. *Neuroscience*, 102(4), 715-721. doi: 10.1016/S0306-4522(00)00584-4
- Parsons, R. G., & Ressler, K. J. (2013). Implications of memory modulation for post-traumatic stress and fear disorders. *Nature Neuroscience*, 16(2), 146-153. doi: 10.1038/nn.3296
- Pasupathy, A., & Miller, E. K. (2005). Different time courses of learning-related activity in the prefrontal cortex and striatum. *Nature*, 433(7028), 873-876. doi: 10.1038/nature03287
- Paxinos, G., & Watson, C. (2007). *The rat brain in stereotaxic coordinates* (6th ed.) Burlington, MA: Academic Press.
- Pérez-Ruíz, C., & Prado-Alcalá, R. A. (1989). Retrograde amnesia induced by lidocaine injection into the striatum: Protective effect of the negative reinforcer. *Brain Research Bulletin*, 22(4), 599-603. doi: 10.1016/0361-9230(89)90076-2
- Piskorowski, R. A., & Chevaleyre, V. (2012). Synaptic integration by different dendritic

- compartments of hippocampal CA1 and CA2 pyramidal neurons. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69(1), 75-88. doi: 10.1007/s00018-011-0769-4
- Pitman, R. K., Rasmusson, A. M., Koenen, K. C., Shin, L. M., Orr, S. P., Gilbertson, M. W., . . . Liberzon, I. (2012). Biological studies of post-traumatic stress disorder. *Nature Reviews. Neuroscience*, 13(11), 769-787. doi: 10.1038/nrn3339
- Ploski, J. E., Pierre, V. J., Smucny, J., Park, K., Monsey, M. S., Overeem, K. A., & Schafe, G. E. (2008). The activity-regulated cytoskeletal-associated protein (Arc/Arg3.1) is required for memory consolidation of pavlovian fear conditioning in the lateral amygdala. *J Neurosci*, 28(47), 12383-12395. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1662-08.2008
- Poldrack, R. A., & Packard, M. G. (2003). Competition among multiple memory systems: Converging evidence from animal and human brain studies. *Neuropsychologia*, 41(3), 245-251. doi: 10.1016/S0028-3932(02)00157-4
- Prado-Alcalá, R. A. (1995). Serial and parallel processing during memory consolidation. En J. L. McGaugh, F. Bermúdez-Rattoni & R. A. Prado-Alcalá (Eds.), *Plasticity in the central nervous system: Learning and memory* (pp. 57-65). New Jersey: Lawrence Erlbaum Associates.
- Prado-Alcalá, R. A., Cobos-Zapíaín, G., Salado-Castillo, R., Quiroz Molina, C. R., Garín-Aguilar, M. E., Díaz, A., . . . Quirarte, G. (2006). El aprendizaje incrementado protege a la memoria contra tratamientos amnésicos. *Revista Mexicana de Análisis de la Conducta*, 32, 203-218. doi: 10.5514/rmac.v32.i2.23275
- Prado-Alcalá, R. A., & Cobos-Zapíaín, G. G. (1977). Learning deficits induced by cholinergic blockade of the caudate nucleus as a function of experience. *Brain Research*, 138(1), 190-196. doi: 10.1016/0006-8993(77)90797-1
- Prado-Alcalá, R. A., & Cobos-Zapíaín, G. G. (1979). Interference with caudate nucleus activity by potassium chloride. Evidence for a 'moving' engram. *Brain Research*, 172(3), 577-583. doi: 10.1016/0006-8993(79)90592-4
- Prado-Alcalá, R. A., Fernandez-Samblancat, M., & Solodkin-Herrera, M. (1985). Injections of atropine into the caudate nucleus impair the acquisition and the maintenance of passive avoidance. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 22(2), 243-247. doi: 10.1016/0091-3057(85)90385-5
- Prado-Alcalá, R. A., Haiek, M., Rivas, S., Roldán-Roldán, G., & Quirarte, G. L. (1994).

- Reversal of extinction by scopolamine. *Physiology & Behavior*, 56(1), 27-30.
doi: 10.1016/0031-9384(94)90257-7
- Prado-Alcalá, R. A., Medina, A. C., Serafín, N., & Quirarte, G. L. (2012). Intense emotional experiences and enhanced training prevent memory loss induced by post-training amnesic treatments administered to the striatum, amygdala, hippocampus or substantia nigra. *Reviews in the Neurosciences*, 23(5-6), 501-508. doi: 10.1515/revneuro-2012-0061
- Prado-Alcalá, R. A., Salado-Castillo, R., Quiroz, C., Garín-Aguilar, M. E., Díaz-Trujillo, A., Rivas-Arancibia, S., & Quirarte, G. (2007). Enhanced learning protects brain against effects of amnesic treatments. En F. Bermúdez-Rattoni (Ed.), *Neural plasticity and memory: From genes to brain imaging* (pp. 175-191). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Prensa, L., Parent, A., & Gimenez-Amaya, J. M. (1999). La organización compartimental del estriado humano. *Revista de Neurología*, 28(5), 512-519.
- Quiroz, C., Martínez, I., Quirarte, G. L., Morales, T., Díaz-Cintra, S., & Prado-Alcalá, R. A. (2003). Enhanced inhibitory avoidance learning prevents the memory-impairing effects of post-training hippocampal inactivation. *Experimental Brain Research*, 153(3), 400-402. doi: 10.1007/s00221-003-1704-1
- Ramanathan, S., Hanley, J. J., Deniau, J.-M., & Bolam, J. P. (2002). Synaptic convergence of motor and somatosensory cortical afferents onto gabaergic interneurons in the rat striatum. *The Journal of Neuroscience*, 22(18), 8158-8169.
- Ramírez-Amaya, V., Vazdarjanova, A., Mikhael, D., Rosi, S., Worley, P. F., & Barnes, C. A. (2005). Spatial exploration-induced Arc mRNA and protein expression: Evidence for selective, network-specific reactivation. *The Journal of Neuroscience* 25(7), 1761-1768. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4342-04.2005
- Ramon y Cajal, S. (1909-1911). Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés. Généralités, moëlle, ganglions rachidiens, bulbe et protubérances In A. Maloine (Ed.), Resumen, 1-15.
- Reading, P. J., Dunnett, S. B., & Robbins, T. W. (1991). Dissociable roles of the ventral, medial and lateral striatum on the acquisition and performance of a complex visual stimulus-response habit. *Behavioural Brain Research*, 45(2), 147-161. doi: 10.1016/S0166-4328(05)80080-4

- Reul, J. M., & de Kloet, E. R. (1985). Two receptor systems for corticosterone in rat brain: Microdistribution and differential occupation. *Endocrinology*, *117*(6), 2505-2511. doi: 10.1210/endo-117-6-2505
- Ribak, C. E., & Seress, L. (1983). Five types of basket cell in the hippocampal dentate gyrus: A combined Golgi and electron microscopic study. *Journal of Neurocytology*, *12*(4), 577-597. doi: 10.1007/BF01181525
- Ribak, C. E., Seress, L., & Amaral, D. G. (1985). The development, ultrastructure and synaptic connections of the mossy cells of the dentate gyrus. *Journal of Neurocytology*, *14*(5), 835-857. doi: 10.1007/BF01170832
- Robbins, T. W., Giardini, V., Jones, G. H., Reading, P., & Sahakian, B. J. (1990). Effects of dopamine depletion from the caudate-putamen and nucleus accumbens septi on the acquisition and performance of a conditional discrimination task. *Behavioural Brain Research*, *38*(3), 243-261. doi: 10.1016/0166-4328(90)90179-I
- Roberts, R. C., Gaither, L. A., Peretti, F. J., Lapidus, B., & Chute, D. J. (1996). Synaptic organization of the human striatum: A postmortem ultrastructural study. *The Journal of Comparative Neurology*, *374*(4), 523-534. doi: 10.1002/(SICI)1096-9861(19961028)374:4<523::AID-CNE4>3.0.CO;2-3
- Rodríguez, J. J., Davies, H. A., Errington, M. L., Verkhratsky, A., Bliss, T. V. P., & Stewart, M. G. (2008). ARG3.1/ARC expression in hippocampal dentate gyrus astrocytes: Ultrastructural evidence and co-localization with glial fibrillary acidic protein. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *12*(2), 671-678. doi: 10.1111/j.1582-4934.2007.00105.x
- Roosendaal, B., & McGaugh, J. L. (1997). Glucocorticoid receptor agonist and antagonist administration into the basolateral but not central amygdala modulates memory storage. *Neurobiology of Learning and Memory*, *67*(2), 176-179. doi: 10.1006/nlme.1996.3765
- Rossato, J. I., Zinn, C. G., Furini, C., Bevilaqua, L. R., Medina, J. H., Cammarota, M., & Izquierdo, I. (2006). A link between the hippocampal and the striatal memory systems of the brain. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, *78*(3), 515-523. doi: 10.1590/S0001-37652006000300011
- Salado-Castillo, R., Sánchez-Alavéz, M., Quirarte, G. L., Martínez García, M. I., & Prado-Alcalá, R. A. (2011). Enhanced training protects memory against

- amnesia produced by concurrent inactivation of amygdala and striatum, amygdala and substantia nigra, or striatum and substantia nigra. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 5, 83. doi: 10.3389/fnbeh.2011.00083
- Salinas, J. A., & White, N. M. (1998). Contributions of the hippocampus, amygdala, and dorsal striatum to the response elicited by reward reduction. *Behavioral Neuroscience*, 112(4), 812-826. doi: 10.1037/0735-7044.112.4.812
- Sandi, C., Loscertales, M., & Guaza, C. (1997). Experience-dependent facilitating effect of corticosterone on spatial memory formation in the water maze. *European Journal of Neuroscience*, 9(4), 637-642. doi: 10.1111/j.1460-9568.1997.tb01412.x
- Scorcioni, R., Lazarewicz, M. T., & Ascoli, G. A. (2004). Quantitative morphometry of hippocampal pyramidal cells: Differences between anatomical classes and reconstructing laboratories. *The Journal of Comparative Neurology*, 473(2), 177-193. doi: 10.1002/cne.20067
- Scoville, W. B., & Milner, B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 20(1), 11-21. doi: 10.1136/jnnp.20.1.11
- Schacter, D. L., Addis, D. R., Hassabis, D., Martin, V. C., Spreng, R. N., & Szpunar, K. K. (2012). The future of memory: Remembering, imagining, and the brain. *Neuron*, 76(4), 10.1016/j.neuron.2012.1011.1001. doi: 10.1016/j.neuron.2012.11.001
- Schacter, D. L., & Tulving, E. (1994). *Memory systems 1994*: Bradford Books, U. S.
- Schmidt-Hieber, C., Jonas, P., & Bischofberger, J. (2004). Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. *Nature*, 429(6988), 184-187. doi: 10.1038/nature02553
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671-675. doi: 10.1038/nmeth.2089
- Schoenfeld, T. J., & Gould, E. (2013). Differential effects of stress and glucocorticoids on adult neurogenesis. En C. Belzung & P. Wigmore (Eds.), *Neurogenesis and neural plasticity* (pp. 139-164). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Schwabe, L., Dalm, S., Schachinger, H., & Oitzl, M. S. (2008). Chronic stress modulates the use of spatial and stimulus-response learning strategies in mice

- and man. *Neurobiology of Learning and Memory*, 90(3), 495-503. doi: 10.1016/j.nlm.2008.07.015
- Schwabe, L., Joëls, M., Roozendaal, B., Wolf, O. T., & Oitzl, M. S. (2012). Stress effects on memory: An update and integration. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 36, 1740-1749. doi: 10.1016/j.neurobiorev.2011.07.002
- Senba, E., & Ueyama, T. (1997). Stress-induced expression of immediate early genes in the brain and peripheral organs of the rat. *Neuroscience Research*, 29(3), 183-207. doi: 10.1016/S0168-0102(97)00095-3
- Seress, L., & Pokorny, J. (1981). Structure of the granular layer of the rat dentate gyrus. A light microscopic and Golgi study. *Journal of Anatomy*, 133(Pt 2), 181-195.
- Seress, L., & Ribak, C. E. (1983). GABAergic cells in the dentate gyrus appear to be local circuit and projection neurons. *Experimental Brain Research*, 50(2), 173-182. doi: 10.1007/bf00239181
- Seress, L., & Ribak, C. E. (1984). Direct commissural connections to the basket cells of the hippocampal dentate gyrus: Anatomical evidence for feed-forward inhibition. *Journal of Neurocytology*, 13(2), 215-225. doi: 10.1007/bf01148116
- Seress, L., & Ribak, C. E. (1985). A combined Golgi-electron microscopic study of non-pyramidal neurons in the CA 1 area of the hippocampus. *Journal of Neurocytology*, 14(5), 717-730. doi: 10.1007/BF01170824
- Seress, L., & Ribak, C. E. (1990). Postnatal development of the light and electron microscopic features of basket cells in the hippocampal dentate gyrus of the rat. *Anatomy and Embryology*, 181(6), 547-565. doi: 10.1007/bf00174627
- Sherin, J. E., & Nemeroff, C. B. (2011). Post-traumatic stress disorder: The neurobiological impact of psychological trauma. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 13(3), 263-278.
- Sik, A., Penttonen, M., & Buzsáki, G. (1997). Interneurons in the hippocampal dentate gyrus: An *In Vivo* intracellular study. *European Journal of Neuroscience*, 9(3), 573-588. doi: 10.1111/j.1460-9568.1997.tb01634.x
- Skinner, B. F. (1938). *The behavior of organisms: An experimental analysis* New York: Appleton-Century
- Smith, Y., & Parent, A. (1986). Neuropeptide Y-immunoreactive neurons in the striatum of cat and monkey: Morphological characteristics, intrinsic organization and co-localization with somatostatin. *Brain Research*, 372(2), 241-252. doi:

[http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993\(86\)91131-5](http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993(86)91131-5)

- Solana-Figueroa, R., Salado-Castillo, R., Quirarte, G. L., Galindo, L. E., & Prado-Alcalá, R. A. (2002). Enhanced inhibitory avoidance training protects against the amnesic effect of p-chloroamphetamine. *Life Sciences*, *71*(4), 391-399. doi: 10.1016/S0024-3205(02)01684-3
- Somogyi, P. (2010). Hippocampus: Intrinsic organization. En G. Shepherd & S. Grillner (Eds.), *Handbook of brain microcircuits*. Oxford, UK: Oxford University Press.
- Somogyi, P., Freund, T. F., Hodgson, A. J., Somogyi, J., Beroukas, D., & Chubb, I. W. (1985). Identified axo-axonic cells are immunoreactive for GABA in the hippocampus visual cortex of the cat. *Brain Research*, *332*(1), 143-149. doi: 10.1016/0006-8993(85)90397-X
- Somogyi, P., & Klausberger, T. (2005). Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus. *The Journal of Physiology*, *562*(Pt 1), 9-26. doi: 10.1113/jphysiol.2004.078915
- Soriano, E., & Frotscher, M. (1989). A GABAergic axo-axonic cell in the fascia dentata controls the main excitatory hippocampal pathway. *Brain Research*, *503*(1), 170-174. doi: 10.1016/0006-8993(89)91722-8
- Sporns, O., & Tononi, G. (2007). Structural determinants of functional brain dynamics. En V. K. Jirsa & A. R. McIntosh (Eds.), *Handbook of brain connectivity* (pp. 117-147). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Spruston, N. (2008). Pyramidal neurons: Dendritic structure and synaptic integration. *Nature Reviews Neuroscience*, *9*(3), 206-221. doi: 10.1038/nrn2286
- Squire, L. R. (1992). Memory and the hippocampus: A synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychological Review*, *99*(2), 195-231. doi: 10.1037/0033-295X.99.2.195
- Squire, L. R. (2004). Memory systems of the brain: A brief history and current perspective. *Neurobiology of Learning and Memory*, *82*(3), 171-177. doi: 10.1016/j.nlm.2004.06.005
- Squire, L. R., Stark, C. E. L., & Clark, R. E. (2004). The medial temporal lobe. *Annual Review of Neuroscience*, *27*, 279-306. doi: 10.1146/annurev.neuro.27.070203.144130
- Stanfield, B. B., & Cowan, W. M. (1979). The morphology of the hippocampus and dentate gyrus in normal and reeler mice. *The Journal of Comparative*

- Neurology*, 185(3), 393-422. doi: 10.1002/cne.901850302
- Steward, O. (1976). Topographic organization of the projections from the entorhinal area to the hippocampal formation of the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 167(3), 285-314. doi: 10.1002/cne.901670303
- Steward, O., Wallace, C. S., Lyford, G. L., & Worley, P. F. (1998). Synaptic activation causes the mRNA for the IEG Arc to localize selectively near activated postsynaptic sites on dendrites. *Neuron*, 21(4), 741-751. doi: 10.1016/S0896-6273(00)80591-7
- Steward, O., & Worley, P. (2002). Local synthesis of proteins at synaptic sites on dendrites: Role in synaptic plasticity and memory consolidation? *Neurobiology of Learning and Memory*, 78(3), 508-527. doi: 10.1006/nlme.2002.4102
- Steward, O., & Worley, P. F. (2001). Selective targeting of newly synthesized Arc mRNA to active synapses requires NMDA receptor activation. *Neuron*, 30(1), 227-240. doi: 10.1016/S0896-6273(01)00275-6
- Swanson, L., Sawchenko, P., & Cowan, W. (1981). Evidence for collateral projections by neurons in Ammon's horn, the dentate gyrus, and the subiculum: A multiple retrograde labeling study in the rat. *The Journal of Neuroscience*, 1(5), 548-559.
- Swanson, L. W., Wyss, J. M., & Cowan, W. M. (1978). An autoradiographic study of the organization of intrahippocampal association pathways in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 181(4), 681-715. doi: 10.1002/cne.901810402
- Takeuchi, T., Duszkievicz, A. J., & Morris, R. G. M. (2014). The synaptic plasticity and memory hypothesis: Encoding, storage and persistence. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1633). doi: 10.1098/rstb.2013.0288
- Tamamaki, N., & Nojyo, Y. (1990). Disposition of the slab-like modules formed by axon branches originating from single CA1 pyramidal neurons in the rat hippocampus. *The Journal of Comparative Neurology*, 291(4), 509-519. doi: 10.1002/cne.902910403
- Tamamaki, N., & Nojyo, Y. (1993). Projection of the entorhinal layer II neurons in the rat as revealed by intracellular pressure-injection of neurobiotin. *Hippocampus*, 3(4), 471-480. doi: 10.1002/hipo.450030408
- Tanapat, P., Hastings, N. B., Rydel, T. A., Galea, L. A. M., & Gould, E. (2001).

- Exposure to fox odor inhibits cell proliferation in the hippocampus of adult rats via an adrenal hormone-dependent mechanism. *The Journal of Comparative Neurology*, 437(4), 496-504. doi: 10.1002/cne.1297
- Taube, J. S. (1998). Head direction cells and the neurophysiological basis for a sense of direction. *Progress in Neurobiology*, 55(3), 225-256. doi: 10.1016/S0301-0082(98)00004-5
- Taube, J. S., & Schwartzkroin, P. A. (1987). Intracellular recording from hippocampal CA1 interneurons before and after development of long-term potentiation. *Brain Research*, 419(1), 32-38. doi: 10.1016/0006-8993(87)90565-8
- Teng, E., Stefanacci, L., Squire, L. R., & Zola, S. M. (2000). Contrasting effects on discrimination learning after hippocampal lesions and conjoint hippocampal-caudate lesions in monkeys. *The Journal of Neuroscience*, 20(10), 3853-3863.
- Tepper, J. M., & Bolam, J. P. (2004). Functional diversity and specificity of neostriatal interneurons. *Current Opinion in Neurobiology*, 14(6), 685-692. doi: 10.1016/j.conb.2004.10.003
- Thomas, R. M., Hotsenpiller, G., & Peterson, D. A. (2007). Acute psychosocial stress reduces cell survival in adult hippocampal neurogenesis without altering proliferation. *The Journal of Neuroscience*, 27(11), 2734-2743. doi: 10.1523/jneurosci.3849-06.2007
- Thompson, R. F., & Kim, J. J. (1996). Memory systems in the brain and localization of a memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(24), 13438-13444. doi: 10.1073/pnas.93.24.13438
- Tipps, M. E., Raybuck, J. D., & Lattal, K. M. (2014). Substance abuse, memory, and post-traumatic stress disorder. *Neurobiology of Learning and Memory*, 112, 87-100. doi: 10.1016/j.nlm.2013.12.002
- Torregrossa, M. M., Corlett, P. R., & Taylor, J. R. (2011). Aberrant learning and memory in addiction. *Neurobiology of Learning and Memory*, 96(4), 609-623. doi: 10.1016/j.nlm.2011.02.014
- Tulving, E. (1972). Episodic and semantic memory. En E. Tulving & W. Donaldson (Eds.), *Organization of Memory* (pp. 381-402). New York, NY: Academic Press.
- Tulving, E. (1983). *Elements of episodic memory*: Clarendon Press.
- Tulving, E. (2005). Episodic memory and auto-noesis: Uniquely human? En H. S. Terrace & J. Metcalfe (Eds.), *The missing link in Cognition: Origins of self-*

- reflective consciousness*. New York, NY: Oxford University Press.
- Van Groen, T., & Wyss, J. M. (1990). Extrinsic projections from area CA1 of the rat hippocampus: Olfactory, cortical, subcortical, and bilateral hippocampal formation projections. *The Journal of Comparative Neurology*, *302*(3), 515-528. doi: 10.1002/cne.903020308
- van Strien, N. M., Cappaert, N. L. M., & Witter, M. P. (2009). The anatomy of memory: An interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network. *Nature Reviews Neuroscience*, *10*(4), 272-282. doi: 10.1038/nrn2614
- Vazdarjanova, A., McNaughton, B. L., Barnes, C. A., Worley, P. F., & Guzowski, J. F. (2002). Experience-dependent coincident expression of the effector immediate-early genes *arc* and *Homer 1a* in hippocampal and neocortical neuronal networks. *The Journal of Neuroscience*, *22*(23), 10067-10071.
- Vazdarjanova, A., Ramirez-Amaya, V., Insel, N., Plummer, T. K., Rosi, S., Chowdhury, S., . . . Barnes, C. A. (2006). Spatial exploration induces *ARC*, a plasticity-related immediate-early gene, only in calcium/calmodulin-dependent protein kinase II-positive principal excitatory and inhibitory neurons of the rat forebrain. *The Journal of Comparative Neurology*, *498*(3), 317-329. doi: 10.1002/cne.21003
- Victoria Stirling, R., & Bliss, T. V. P. (1978). Observations on the commissural projection to the dentate gyrus in the reeler mutant mouse. *Brain Research*, *150*(3), 447-465. doi: 10.1016/0006-8993(78)90813-2
- Vincent, S. R., Johansson, O., Hökfelt, T., Skirboll, L., Elde, R. P., Terenius, L., . . . Goldstein, M. (1983). NADPH-diaphorase: A selective histochemical marker for striatal neurons containing both somatostatin- and avian pancreatic polypeptide (APP)-like immunoreactivities. *The Journal of Comparative Neurology*, *217*(3), 252-263. doi: 10.1002/cne.902170303
- Voorn, P., Vanderschuren, L., Groenewegen, H. J., Robbins, T. W., & Pennartz, C. M. A. (2004). Putting a spin on the dorsal-ventral divide of the striatum. *Trends in Neurosciences*, *27*(8), 468-474. doi: 10.1016/j.tins.2004.06.006
- Vuksic, M., Del Turco, D., Bas Orth, C., Burbach, G. J., Feng, G., Müller, C. M., . . . Deller, T. (2008). 3D-reconstruction and functional properties of GFP-positive and GFP-negative granule cells in the fascia dentata of the Thy1-GFP mouse. *Hippocampus*, *18*(4), 364-375. doi: 10.1002/hipo.20398

- Vyklicky, V., Korinek, M., Smejkalova, T., Balik, A., Krausova, B., Kaniakova, M., . . . Vyklicky, L. (2014). Structure, function, and pharmacology of NMDA receptor channels. *Physiological Research*, *63 Suppl 1*, S191-203.
- West, M. J., Coleman, P. D., & Flood, D. G. (1988). Estimating the number of granule cells in the dentate gyrus with the disector. *Brain Research*, *448*(1), 167-172. doi: 10.1016/0006-8993(88)91114-6
- White, N. M. (1989). A functional hypothesis concerning the striatal matrix and patches: Mediation of S-R memory and reward. *Life Sciences*, *45*(21), 1943-1957. doi: 10.1016/0024-3205(89)90569-9
- White, N. M. (1997). Mnemonic functions of the basal ganglia. *Current Opinion in Neurobiology*, *7*(2), 164-169. doi: 10.1016/S0959-4388(97)80004-9
- White, N. M., & McDonald, R. J. (2002). Multiple parallel memory systems in the brain of the rat. *Neurobiology of Learning and Memory*, *77*(2), 125-184. doi: 10.1006/nlme.2001.4008
- Wickens, J. R., Budd, C. S., Hyland, B. I., & Arbuthnott, G. W. (2007). Striatal contributions to reward and decision making: Making sense of regional variations in a reiterated processing matrix. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1104*, 192-212. doi: 10.1196/annals.1390.016
- Wilson, C., Chang, H., & Kitai, S. (1990). Firing patterns and synaptic potentials of identified giant aspiny interneurons in the rat neostriatum. *The Journal of Neuroscience*, *10*(2), 508-519.
- Wingard, J. C., & Packard, M. G. (2008). The amygdala and emotional modulation of competition between cognitive and habit memory. *Behavioural Brain Research*, *193*(1), 126-131. doi: 10.1016/j.bbr.2008.05.002
- Winocur, G., & Eskes, G. (1998). Prefrontal cortex and caudate nucleus in conditional associative learning: Dissociated effects of selective brain lesions in rats. *Behavioral Neuroscience*, *112*(1), 89-101. doi: 10.1037/0735-7044.112.1.89
- Wise, S. P., Murray, E. A., & Gerfen, C. R. (1996). The frontal cortex-basal ganglia system in primates. *Critical Reviews in Neurobiology*, *10*(3-4), 317-356. doi: 10.1615/CritRevNeurobiol.v10.i3-4.30
- Witter, M. (2012). Hippocampus. En C. Watson, G. Paxinos & L. Puelles (Eds.), *The mouse nervous system* (pp. 112-139). San Diego: Academic Press.
- Witter, M. P., Groenewegen, H. J., Lopes da Silva, F. H., & Lohman, A. H. M. (1989).

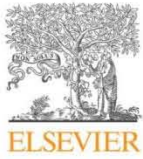
- Functional organization of the extrinsic and intrinsic circuitry of the parahippocampal region. *Progress in Neurobiology*, 33(3), 161-253. doi: 10.1016/0301-0082(89)90009-9
- Worley, P. F., Cole, A. J., Murphy, T. H., Christy, B. A., Nakabeppu, Y., & Baraban, J. M. (1990). Synaptic regulation of immediate-early genes in brain. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 55, 213-223. doi: 10.1101/SQB.1990.055.01.023
- Yeshenko, O., Guazzelli, A., & Mizumori, S. J. Y. (2004). Context-dependent reorganization of spatial and movement representations by simultaneously recorded hippocampal and striatal neurons during performance of allocentric and egocentric tasks. *Behavioral Neuroscience*, 118(4), 751-769. doi: 10.1037/0735-118.4.751
- Yin, H. H., & Knowlton, B. J. (2006). The role of the basal ganglia in habit formation. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(6), 464-476. doi: 10.1038/nrn1919
- Yin, H. H., Knowlton, B. J., & Balleine, B. W. (2005). Blockade of NMDA receptors in the dorsomedial striatum prevents action-outcome learning in instrumental conditioning. *The European Journal of Neuroscience*, 22(2), 505-512. doi: 10.1111/j.1460-9568.2005.04219.x
- Yin, H. H., Ostlund, S. B., Knowlton, B. J., & Balleine, B. W. (2005). The role of the dorsomedial striatum in instrumental conditioning. *The European Journal of Neuroscience*, 22(2), 513-523. doi: 10.1111/j.1460-9568.2005.04218.x
- Zola-Morgan, S., Squire, L., & Amaral, D. (1986). Human amnesia and the medial temporal region: Enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, 6(10), 2950-2967.
- Zola-Morgan, S., & Squire, L. R. (1990). The neuropsychology of memory. Parallel findings in humans and nonhuman primates. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 608, 434-456. doi: 10.1111/j.1749-6632.1990.tb48905.x

XIV. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1..... 5
Figura 2..... 8
Figura 3..... 10
Figura 4..... 11
Figura 5..... 12
Figura 6..... 13
Figura 7..... 14
Figura 8..... 15
Figura 9..... 17
Figura 10..... 18
Figura 11..... 20
Figura 12..... 23
Figura 13..... 29
Figura 14..... 31
Figura 15..... 35
Figura 16..... 38
Figura 17..... 39
Figura 18..... 41
Figura 19..... 49
Figura 20..... 56
Figura 21..... 58
Figura 22..... 59
Figura 23..... 60
Figura 24..... 62
Figura 25..... 64
Figura 26..... 66
Figura 27..... 67
Figura 28..... 68
Figura 29..... 69
Figura 30..... 70
Figura 31..... 72

XV. APENDICE 1: Artículo publicado, derivado de esta tesis

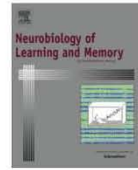
Neurobiology of Learning and Memory 140 (2017) 17–26



Contents lists available at ScienceDirect

Neurobiology of Learning and Memory

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ynlme



Differential Arc protein expression in dorsal and ventral striatum after moderate and intense inhibitory avoidance training



Diego A. González- Franco^a, Víctor Ramírez-Amaya^{b,1}, Patricia Joseph-Bravo^c, Roberto A. Prado-Alcalá^a, Gina L. Quirarte^{a,*}

^aDepartamento de Neurobiología Conductual y Cognitiva, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla, Querétaro, Querétaro 76230, Mexico

^bMaestría en Nutrición Humana y Maestría en Ciencias en Neurometabolismo, Facultad de Ciencias Naturales y Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Querétaro, Mexico

^cDepartamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Morelos, Cuernavaca, Morelos, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 September 2016

Accepted 3 February 2017

Available online 6 February 2017

Keywords:

Striatum

Over-training

Learning and memory

Immediate-early genes

Corticosterone

ABSTRACT

Intense training refers to training mediated by emotionally arousing experiences, such as aversive conditioning motivated by relatively high intensities of foot-shock, which produces a strong memory that is highly resistant to extinction. Intense training protects memory consolidation against the amnesic effects of a wide variety of treatments, administered systemically or directly into brain structures. The mechanisms of this protective effect are unknown. To determine a potential neurobiological correlate of the protective effect of intense training, rats were trained in a one-trial step-through inhibitory avoidance task using different intensities of foot-shock (0.0, 0.5, 1.0, and 2.0 mA). Some rats from each group were sacrificed 45 min after training for immunohistochemical Arc protein detection in dorsal and ventral striatum; other rats were tested for extinction during six consecutive days, starting 48 h after training. The results showed that training with 1.0 and 2.0 mA produced optimal retention scores, which were significantly higher than those of the 0.5 and 0.0 mA groups. Also, a higher resistance to extinction was obtained with 2.0 mA than with the other intensities. A high number of neurons expressed Arc in ventral, but not in dorsal striatum in both the 1.0 and 2.0 mA groups, with a larger area of Arc signal in the latter group. We conclude that an increased Arc expression may be related to enhanced synaptic plasticity in the ventral striatum, suggesting that it may be one of the physiological substrates of enhanced learning.

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Information derived from different learning experiences are not similarly stored and retrieved. Compared with events with a neutral connotation, emotional or aversive events are recalled better due to the release of stress hormones, which interact with endogenous neurotransmitters to facilitate memory consolidation (McGaugh, 2013; Schwabe, Joëls, Roozendaal, Wolf, & Oitzl, 2012). Furthermore, stronger consolidation is produced by enhanced learning. Examples of enhanced learning are post-traumatic stress disorder (PTSD) (Parsons & Ressler, 2013), addiction-motivated learning (Hyman, 2005; Torregrossa, Corlett,

& Taylor, 2011), and learning produced by intense training (Prado-Alcalá, Medina, López, & Quirarte, 2012). The latter refers to learning mediated by a high number of trials or training sessions, or to one-trial aversive conditioning motivated by high intensities of foot-shock (Prado-Alcalá, 1995; Prado-Alcalá et al., 2007, 2012). The present work focused on intense training.

Intense training produces a strong memory of inhibitory avoidance (IA) which is quite resistant to extinction (Bello-Medina, Flores, Quirarte, McGaugh, & Prado Alcalá, 2016; Garín-Aguilar et al., 2012; Prado-Alcalá, Haiek, Rivas, Roldan-Roldan, & Quirarte, 1994), and to a wide variety of amnesic treatments, administered either systemically or directly into brain structures; these include sodium channel blockers (Garín-Aguilar, Medina, Quirarte, McGaugh, & Prado-Alcalá, 2014; Salado-Castillo, Sánchez-Alavéz, Quirarte, Martínez García, & Prado-Alcalá, 2011), protein synthesis inhibitors (Díaz-Trujillo et al., 2009), and neurotransmitter receptor antagonists (Cobos-Zapian et al., 1996; Durán-Arévalo, Cruz-Morales, & Prado-Alcalá, 1990;

* Corresponding author at: Boulevard Juriquilla, 3001, Querétaro 76230, Mexico.

E-mail addresses: alekssandr@gmail.com (D.A. González- Franco), vramirezamaya@immf.uncor.edu (V. Ramírez-Amaya), joseph@ibt.unam.mx (P. Joseph-Bravo), prado@unam.mx (R.A. Prado-Alcalá), ginaqui@unam.mx (G.L. Quirarte).

¹ Current address: Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreira, INIMEC-CONICET-UNC, Av. Friuli 2434, 5016 Córdoba, Argentina.

Solana-Figueroa, Salado-Castillo, Quirarte, Galindo, & Prado-Alcalá, 2002).

The protective effect of intense training has been studied in several brain structures involved in memory consolidation, such as the hippocampus (Quiroz et al., 2003), amygdala (Salado-Castillo et al., 2011), substantia nigra (Cobos-Zapíaín et al., 1996; Salado-Castillo et al., 2011), and striatum (Prado-Alcalá & Cobos-Zapíaín, 1977; Pérez-Ruiz & Prado-Alcalá, 1989). Importantly, the striatum also has been linked to PTSD (Goodman, Leong, & Packard, 2012), and to the reward-reinforcement learning involved in drug addiction (Yager, Garcia, Wunsch, & Ferguson, 2015).

Growing evidence supports a functional heterogeneity of the striatum. This has led to anatomically dissect the striatum into distinct functional regions or compartments. Taking into account the reciprocal and unidirectional connections with the hippocampus, amygdala, and motor cortical areas, the striatum has been divided into dorsolateral, dorsomedial and ventral regions (Voorn, Vanderschuren, Groenewegen, Robbins, & Pennartz, 2004), albeit other groups suggest a functional distinction between the dorsomedial and dorsolateral regions because the former is predominantly involved in spatial/contextual learning, whereas the latter enables the formation of procedural learning (Devan & White, 1999; Lozano, Serafin, Prado-Alcalá, Roozendaal, & Quirarte, 2013; Packard & Knowlton, 2002; White & McDonald, 2002). We have also reported that there is a differential involvement of its medial and lateral regions in memory consolidation of inhibitory avoidance learning (Salado-Castillo, Diaz del Guante, Alvarado, Quirarte, & Prado-Alcalá, 1996), and that intense training increases dendritic mushroom spines in dorsomedial, but not in the dorsolateral striatum (Bello-Medina et al., 2016). In addition, cholinergic blockade of dorsal striatum induced retention deficits of an aversively motivated task while blockade of ventral striatum facilitated retention of this task (Neill & Grossman, 1970).

Given the functional heterogeneity of the striatum, the aim of this study was to determine whether different intensities of foot-shock used in inhibitory avoidance training induce distinct patterns of neuronal activation. One strategy to visualize neuronal activation is to measure the expression of immediate-early genes (IEGs). IEG expression is a well-recognized powerful tool for evaluating neuronal activity in the brain; detection of IEG mRNA or protein products in the brain provides information about where and when neurons were activated (Okuno, 2011; Ramírez-Amaya et al., 2005). One such IEG is Arc (Activity-regulated cytoskeletal associated protein, also known as Arg3.1) (Link et al., 1995; Lyford et al., 1995), whose expression is highly dynamic and is induced by robustly patterned synaptic activity, including natural stimuli, seizures, LTP, and memory-related processes (Guzowski, 2002; Guzowski, Setlow, Wagner, & McLaugh, 2001; Guzowski et al., 2000; Lyford et al., 1995; Ramírez-Amaya et al., 2005).

Exploration of new environments induces strong Arc expression in the hippocampus as well as in related neocortical areas such as the parietal and entorhinal cortex in rats and mice (Guzowski, McNaughton, Barnes, & Worley, 1999; Ramírez-Amaya et al., 2005). Arc involvement in learning and memory processes is further supported by the deterioration of long-term potentiation and spatial water maze learning produced by inhibition of its expression with infusion of antisense oligodeoxynucleotides directly into the hippocampus (Guzowski et al., 2000); this inhibition also impairs long-term, but not short-term memory of inhibitory avoidance (McIntyre et al., 2005). Furthermore, it was found that in the hippocampus and cortex of rats the proportion of cells expressing Arc protein is the same as that of cells that express Arc mRNA after spatial exploration (Ramírez-Amaya et al., 2005).

Although Arc mRNA expression in dorsomedial or dorsolateral striatum alone did not correlate with the stage of training in a dual-solution task (a task that can be solved using either place or

response strategies), the ratio of expression in the dorsomedial striatum to that in the dorsolateral striatum was relatively high among rats that used a place strategy early in training, as compared with the ratio among over-trained response rats (Gardner et al., 2016). Together, these data stress the importance of Arc protein in the consolidation of different types of memory, as well as its usefulness for mapping neuronal networks that underlie information processing.

In sum, the studies described above showed that there is a regional differentiation within the striatum regarding the processing of information involved in memory of diverse tasks, mediated by moderate or intense training. In the present work we hypothesized that moderate training of inhibitory avoidance induces the expression of Arc protein in different striatal regions; we also predicted that intense training will induce a higher expression of this protein in different striatal regions.

In order to test these hypotheses, we evaluated the expression patterns of the IEG Arc in the dorsomedial, dorsolateral, ventromedial, and ventrolateral regions of the striatum after training rats in the inhibitory avoidance task with different foot-shock intensities. Additionally, as an indication of the extent of emotional arousal produced by the task, we quantified blood serum corticosterone (CORT) concentration, which correlates positively with the intensity of aversive training (Cordero, Merino, & Sandí, 1998).

2. General methods

This section describes the procedures common to the different experiments of this study.

All experimental procedures were approved by the Animal Ethics Committee of the Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, which complies with the Mexican Council Norm (SAGARPA NOM-062-ZOO-1999) and the NIH Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals (National Research Council, 2011).

2.1. Subjects

We studied 98 adult male Wistar rats (250–350 g; 8–9 weeks old on arrival to the laboratory vivarium), which were maintained in a room with a 12/12 h light-dark cycle (lights on at 7:00 h) and housed individually in acrylic cages with food and tap water ad libitum. The temperature of the room where the animals were housed was kept at 21 °C.

2.2. Handling

Rats were handled, once a day, for 5 min across 3 days prior to the experiments. The handling procedure consisted of gently touching and holding the rat with both hands. All animals were handled and transported from the vivarium to the handling room, including a group that never experienced the inhibitory avoidance task nor the training room (group Cage). All the experiments were performed between 9:00 h and 13:00 h.

2.3. Apparatus

The rats were trained in an inhibitory avoidance apparatus consisting of two compartments separated by a sliding door. The safe compartment (30 × 30 × 30 cm) had a lid and walls made of red-colored acrylic, with a floor made of stainless steel bars (6 mm in diameter, 9 mm apart). This compartment was illuminated by a 10 W light bulb located in the center of its lid. The other, non-illuminated shock compartment (30 cm long) had front and back walls and a floor made of stainless steel plates with side walls

and lid constructed of red-colored acrylic. The walls and floor were shaped like a trough, 20 cm wide at the top and 8 cm wide at the bottom. In the middle of the floor, a 1.5-cm slot separated the two stainless steel plates that make up the walls and floor. Upon entering the non-illuminated compartment, the rats were in contact with both plates through which a foot-shock could be delivered. A square-pulse stimulator (Grass model S-48) in series with a constant current unit (Grass model CCU-1) generated the foot-shock. Shock delivery and measurement of latencies to cross from one compartment to the other one were accomplished by use of automated equipment. Both compartments were wiped with 10% alcohol before and after each trial. The apparatus was located inside a dark, sound-proof room provided with background masking noise.

2.4. Statistical analysis

Because the measurement of retention of the IA task was truncated at 600 s, nonparametric statistics were used in analyzing the behavioral results. Independent Kruskal–Wallis ANOVAs were computed for acquisition and escape latencies. When appropriate, the Mann–Whitney *U* test was used to make comparisons between any two groups. In the experiment on extinction the Friedman test was used to analyze retention latencies across the six days of testing for each group, followed by the Wilcoxon Signed-Rank Test to make comparisons between any two days along the extinction sessions in each group. To compare retention scores among the groups on each day of extinction testing the Kruskal–Wallis and the Mann–Whitney *U* tests were applied. For the histological results, independent one-way ANOVAs were used to analyze the area of Arc signal, the percentage of Arc-expressing cells, as well as the CORT serum concentration. When the *F*-ratios were significant, a Bonferroni multiple comparisons test was used to carry out pairwise comparisons. All statistical analyses were performed using SigmaStat Version 4.0.

3. High foot-shock intensity during the inhibitory avoidance training produces enhanced learning

Because one of the main objectives of this study was to evaluate possible changes in the expression of Arc after low, moderate, and intense training, it was important to demonstrate that training with 2.0 mA produces stronger learning than training with 0.0, 0.5, or 1.0 mA. To this end we measured resistance to extinction, which is stronger when a learning experience is also stronger.

On the day of training, each rat was placed inside the safe compartment and 10 s later the door between the two compartments was opened. The latency to cross from the safe to the shock compartment is referred to as the training latency. Once the animals crossed to this compartment the door was closed and a foot-shock was delivered (a train of 50 ms square pulses at 10 Hz, with intensities of 0.5, 1.0, or 2.0 mA). Five seconds later the door was reopened, allowing the rat to escape to the safe compartment and then the stimulator was turned off; this latency is referred to as the escape latency. After 30 s in the safe compartment the rat was placed back in its home cage. The 0.0 mA group was trained in the inhibitory avoidance task, except that the foot-shock was not delivered. In this group, once the rats crossed into the shock compartment, the door was re-opened after 5 s, and the latency to return to the safe compartment was computed; there were 10 rats per group.

Extinction of the task was measured on six consecutive days, starting 48 h after training. The same procedure as in training was followed, except that the foot-shock was omitted; if the rat

did not cross into to the shock compartment within 600 s, the session ended and a retention latency score of 600 s was assigned.

3.1. Results

The Kruskal–Wallis test demonstrated that there were no significant differences in the training latency among the groups ($H(3) = 5.06, p = 0.17$) (Fig. 1A). In the case of escape latencies significant differences were observed among the groups ($H(3) = 13.90, p < 0.005$). Pairwise comparisons revealed that the 0.0 mA group had a significantly higher escape latency compared to the 0.5, 1.0, and 2.0 mA groups (p 's $< 0.01, 0.005, \text{ and } 0.05$, respectively). The escape latencies of the latter three groups did not differ from each other (Fig. 1B).

As depicted in Fig. 1C, the Friedman test revealed significant differences throughout the extinction sessions in the 0.5 ($X^2(5) = 26.36, p < 0.001$); 1.0 ($X^2(5) = 37.42, p < 0.001$); and 2.0 ($X^2(5) = 29.89, p < 0.001$) mA groups, while no differences were found in the 0.0 mA group ($X^2(5) = 6.38, p = 0.23$). The Wilcoxon matched-pairs test showed that the 0.5 mA group had a significant reduction in the retention latency on the third extinction day compared to the first extinction day ($Z = 36, p < 0.01$) and continued low during the remaining sessions ($Z = 36, p < 0.01$ for the fourth, fifth, and sixth extinction days). The 1.0 mA group had a significant decrease in the retention latency on the second extinction day compared to the first day ($Z = 26, p < 0.05$). This reduction was more evident on the third extinction day and remained low up to the sixth day ($Z = 55, p < 0.005$ from the third to the sixth extinction day). The 2.0 mA group had the maximum median retention latency (600 s) during the first three extinction sessions; on the fourth, fifth and sixth days, a significant reduction on the retention latencies was observed ($Z = 21, p < 0.05$ for both fourth and fifth days; $Z = 36, p < 0.01$ for sixth day).

Session by session comparisons of retention scores among the groups across the six extinction sessions yielded significant differences ($H(3) = \text{range } 17.34\text{--}35.25, p < 0.001$ in each session). As depicted in Fig. 1C, group 2.0 mA had higher retention scores on every session than the rest of the groups (p values ranging between 0.001 and 0.0001), except for the first session where it did not differ from the 1.0 mA group. In turn, the 1.0 mA group had significantly higher scores than the 0.5 mA group only on the first session ($p < 0.005$), while it differed from the 0.0 mA group on the first five sessions (p values ranging from 0.01 to 0.001) but not in the sixth session. Lastly, the 0.5 mA group had higher retention latencies than the 0.0 mA group only in the first and third sessions (p 's < 0.001 and 0.05, respectively).

4. Intense inhibitory avoidance training increases Arc protein expression in ventral but not in dorsal regions of the striatum

In order to explore the effects of moderate and intense training on neuronal activation of the striatum, groups of rats were trained using 0.0, 0.5, 1.0, or 2.0 mA; none of these groups was tested for retention of the task, and they were sacrificed 45 min after training. The 0.0 mA group was trained in the inhibitory avoidance task, except that the foot-shock was not delivered. In this group, once the rats crossed into the shock compartment, the door was reopened after 5 s, and the latency to return to the safe compartment was computed. We also studied another group to factor out the effects of the foot-shock. This group received the highest intensity foot-shock (2.0 mA), but was not trained in the avoidance task (shock-only group; SO-2); the rats of this group were placed directly into the shock compartment and a 2.0 mA foot-shock was delivered (the foot-shock duration was 6.5 s, which was the median of the duration of the foot-shock received by the 2.0 mA

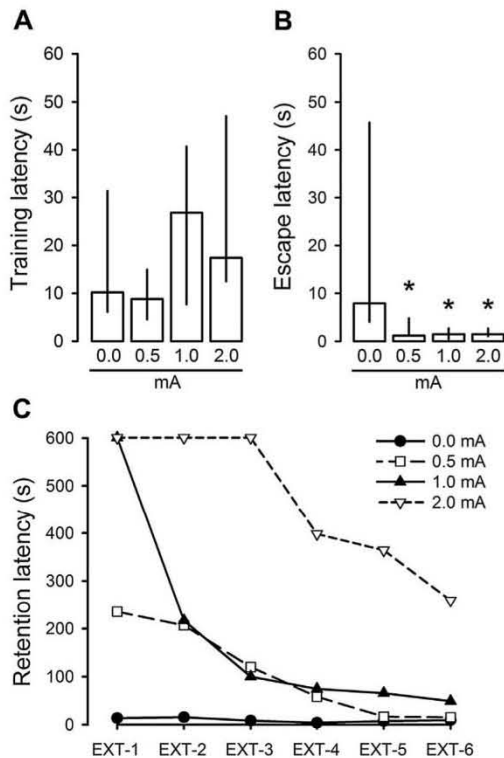


Fig. 1. Performance of groups of rats trained in inhibitory avoidance with 0.0, 0.5, 1.0, or 2.0 mA. (A) Median training latencies (with interquartile ranges). (B) Median escape latencies (with interquartile ranges). (C) Median retention latencies across the daily extinction sessions (EXT-1 to EXT-6). In every extinction session retention scores of the 2.0 mA group differed significantly from the latency scores of the other groups (p values ranging between 0.001 and 0.0001), except on EXT-1 where it did not differ from the 1.0 mA group ($n = 10$ per group). These results clearly indicate that the 2.0 mA group had the highest resistance to extinction, which is indicative of enhanced learning. * $p < 0.05$ vs. 0.0 mA.

trained group). Immediately after the foot-shock, the rat was placed back in its home cage. In order to determine the basal expression of Arc protein we also studied a caged control group that never experienced the inhibitory avoidance task nor the training room (group Cage). There were 4 rats in each group, and these same rats were used to measure serum concentration of CORT (see below).

4.1. Brain extraction and cryosectioning

Forty-five min after the manipulations just described the rats were decapitated and their brains were removed and immediately frozen in 2-methylbutane (Sigma-Aldrich) immersed in a slurry of dry ice and ethanol. After freezing, the brains were stored at -70°C until cryosectioning. Using a stainless steel matrix (Electron Microscopy Sciences), brain hemi-sections that included the whole striatum were obtained. The hemi-sections were placed in a mold and a block was made with Tissue-Tek OCT compound (Sakura Finetek), such that each block contained eight brains, at least one from each group, and their position differed in each block. Each of the resulting three blocks were coronally cryosectioned at -20°C to a thickness of $20\ \mu\text{m}$, using a CM1850 Leica cryostat. The brain slices were placed on slides and kept in a sealed box at -70°C prior to the immunostaining procedure.

4.2. Immunohistochemistry

Six slides from each block from the striatum (Bregma 0.24–1.20; Paxinos & Watson, 2007), were randomly selected, and the tissue was fixed in 2% paraformaldehyde, 7.4 pH, for 5 min, and washed in $2\times$ SSC, pH 7.0, followed by 50:50% acetone/methanol at 4°C for 5 min. The tissue was washed in $2\times$ SSC and 0.05% Tween 20 and quenched in $2\times$ SSC and 1% H_2O_2 for 15 min. After blocking with a tyramide signal amplification kit (TSA) blocking buffer (PerkinElmer Life Sciences), the slides were incubated in polyclonal rabbit anti-Arc antibody (1:800) (kindly supplied by Dr. Hiroyuki Okuno) for 48 h at 4°C . Incubation with the anti-rabbit biotinylated secondary antibody (Vector Laboratories) for 2 h at room temperature was followed by amplification with the avidin-biotin system (Vector Laboratories) for 45 min. The immunostaining was visualized using the cyanine 3 (CY3) TSA fluorescence system (PerkinElmer Life Sciences), and the nuclei were counterstained with SYTOX[®] Green (Molecular Probes). No immunostaining was detected in the absence of the primary or secondary antibodies. Immunostaining for Arc usually covered between 17 and $19\ \mu\text{m}$ of the thickness of the tissue; the vast majority had $18\ \mu\text{m}$, and all slides with staining covering less than $17\ \mu\text{m}$ were excluded from analysis.

4.3. Image acquisition and analysis

Single optical plain images covering the $20\ \mu\text{m}$ thickness of the tissue were obtained with an Apotome system (Zeiss), using a $10\times/0.45$ apochromatic objective lens and a filter set for CY3 detection with a bandpass excitation of 546/12 nm and emission of 575–640 nm, and a filter set for SYTOX[®] Green detection with a bandpass excitation of 450–490 nm and emission of 515–565 nm. With the aid of the MosaiX module these images were used to perform image stitching to build six mosaic images per animal. Each mosaic image was obtained in order to cover the whole striatum (Fig. 3). The parameters for the image acquisition were set in the slice of the animal from the Cage group in each slide. Once these parameters were set, they remained constant for the rest of the brain slices in that slide.

Analysis of the Arc expression was performed on the images using the ImageJ software (Schneider, Rasband, & Eliceiri, 2012). Because the number of images that would be used to count the total number of neurons was very high (1728 images), we decided to first do an area analysis approach, which allowed us to detect the striatal regions that showed changes in the expression of Arc, and then to do the cell count on the slides of such regions.

For this type of analysis, we divided the anterior striatum into four regions: dorsomedial (DM), dorsolateral (DL), ventromedial (VM) and ventrolateral (VL) (Fig. 2). This division was based on mapping studies of the striatum (Prado-Alcalá & Wise, 1984; Salado-Castillo et al., 1996). The boundary between the anterior and posterior regions was defined as the coronal plane 0.2 mm posterior to bregma. At each anterior-posterior level the medial-lateral dividing line was taken as half the distance between the most medial and most lateral extent of the striatum for that section; similarly, the dorsal-ventral dividing line was halfway between the most dorsal and the most ventral extent of the striatum for a given section. Then a detection threshold on the grayscale value (defined as the grayscale value that was at least twice as large as the background noise), was established on a tissue slice from an animal of the Cage group in each analyzed slide; this threshold value was used for the detection of Arc signal area of all the tissue slices of the same slide. This threshold-setting was used as a stereological measure to control the variation in the signal produced by the immunostaining process. Lastly, the area of Arc signal that reached the threshold was measured in each

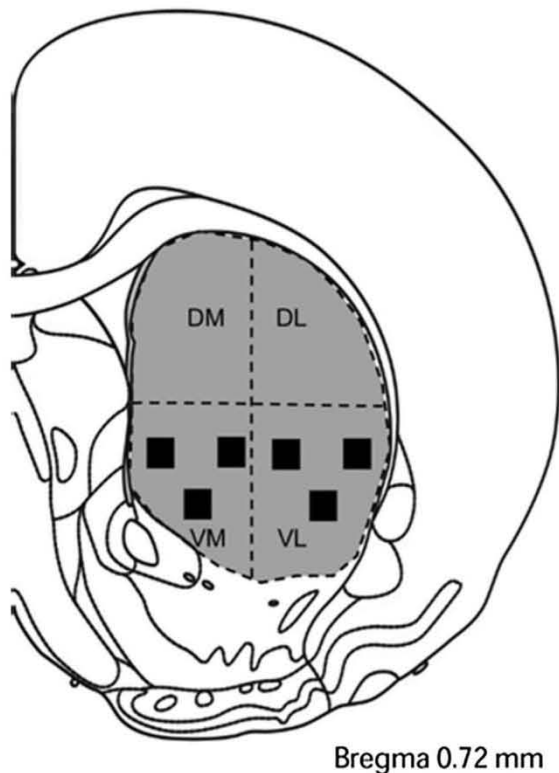


Fig. 2. Schematic diagram illustrating the location of the four striatal regions used for the signal area measurement (gray areas), and the areas where the cell count (black squares) was performed. Abbreviations are as follows: DM, dorsomedial; DL, dorsolateral; VM, ventromedial; VL, ventrolateral. Drawing modified from Paxinos & Watson (2007).

delimited region (expressed in μm). In order to minimize the variations due to the histological procedures, such as shrinkage or flattening of the tissue, we divided the Arc signal area by the total area of each given striatal region (also expressed in μm), thus obtaining the Arc signal area ratio.

Subsequently, in those striatal regions where significant differences in Arc signal area ratio were found, three sample z-stack images, from the same slices previously analyzed, were obtained for cell counts (0.7 μm optical thickness per plane, approximately 26 ± 2 planes of optimal staining per image, $40\times$ objective) (Fig. 2). The cell count method was previously reported by Vazdarjanova, McNaughton, Barnes, Worley, and Guzowski (2002). Briefly, this method consists of identifying and classifying neurons on the basis of the nuclear counterstain, thereby discriminating neurons from glial cells; glial nuclei are small, with intense and uniform DNA staining, while neuronal nuclei are larger and have a less intense and non-uniform DNA staining. Only the neuron-like cells found in the middle 60% of each stack were included in the analyses (this stereological measure was used to minimize sampling errors attributable to incomplete cells). The probability of a biased cell count analysis regarding different cell populations was negligible because the vast majority of striatal neurons (95–98%) are medium spiny neurons, which have an approximate diameter of 12–14 μm (Dudman & Gerfen, 2015; Kemp & Powell, 1971; Kreitzer & Malenka, 2008). For Arc protein analysis, the selected cells were classified as either positive or negative. Positive neurons had perinuclear or cytoplasmic staining

surrounding at least 60% of nucleus circumference, and had to be visible in at least three planes together with the cell nucleus. Special attention was paid to ensure that the staining belonged to the cell of interest and not to a dendrite of a different cell.

4.4. Results

4.4.1. Signal area analysis

The signal area measurements of Arc protein obtained from mosaic images revealed no significant effects of treatments in DM and DL regions of the striatum ($F(5, 18) = 1.69$, $p = 0.19$; and $F(5, 18) = 2.15$, $p = 0.11$, respectively) (Fig. 3A and B). In contrast, the ventromedial striatal region showed significant differences among the groups ($F(5,18) = 3.9$; $p < 0.05$), and the Bonferroni post hoc test revealed significant differences in Arc signal area between the 2.0 mA and the SO-2 groups ($p < 0.05$); there were no significant differences when pairwise comparisons were made with the rest of the groups (Fig. 3C).

In the ventrolateral region of the striatum significant differences were also found among groups ($F_{(5,18)} = 3.76$; $p < 0.05$). The Bonferroni post hoc analysis revealed that Arc signal area was significantly higher in the 2.0 mA group than in the Cage, 0.0 mA, and SO-2 groups (p 's < 0.05 , 0.05 , and < 0.01 , respectively). Bonferroni pairwise comparisons showed that the rest of the groups did not differ significantly from each other (Fig. 3D).

As stated above, the signal area measurement revealed that no changes in Arc protein expression in DM and DL striatum were produced by any of the experimental manipulations. By contrast, in the ventral striatal regions training with the higher foot-shock (2.0 mA) induced Arc protein expression particularly in the ventrolateral striatal regions. This increase in Arc protein could be related to a higher concentration of Arc protein in the active neurons, to a higher number of active neurons, or both. In order to determine the contribution of the number of active neurons to this outcome, a cell count was performed in the ventromedial and ventrolateral regions of the striatum.

4.4.2. Cell count

The one-way ANOVA showed significant differences among the groups in the proportion of Arc expressing neurons of the ventromedial striatal region ($F_{(5,18)} = 11.76$, $p < 0.0001$). The post hoc Bonferroni test revealed a higher proportion of Arc-expressing neurons in the 2.0 mA group as compared to the Cage, 0.0, 0.5 mA, and SO-2 groups (p 's < 0.001 , 0.005 , 0.005 , and 0.001 , respectively). Group 1.0 mA also had a higher proportion of Arc-expressing neurons than the Cage and SO-2 groups (p 's < 0.01 and 0.005 , respectively), but it was not significantly different from the others groups; particularly important is the lack of significance with the 0.0 and 0.5 mA groups, indicating that the increase in the number of Arc expressing neurons in the ventromedial striatum found in the 1.0 mA group is not above the proportion of Arc expressing neurons induced by exploration of the inhibitory avoidance box or by training with the low foot-shock intensity. Significant differences were evident neither among the Cage, 0.0, 0.5 mA, and SO-2 groups nor between the 1.0 and 2.0 mA groups.

Similarly, in the ventrolateral region of the striatum the one-way ANOVA showed significant differences in the proportion of Arc expressing neurons among the groups ($F_{(5,18)} = 10.33$, $p < 0.0001$); the post hoc Bonferroni test also showed a significant increase in the 2.0 mA group as compared to the Cage, 0.0, 0.5 mA, and SO-2 groups (p 's < 0.001 , 0.005 , 0.004 , and 0.001 , respectively). The proportion of Arc expressing neurons in the 1.0 mA group was significantly higher with respect to the Cage and SO-2 groups ($p < 0.05$ in both comparisons). Significant differences were evident neither among the Cage, 0.0, 0.5 mA, and SO-2 groups nor between the 1.0 and 2.0 mA groups (Fig. 4B).

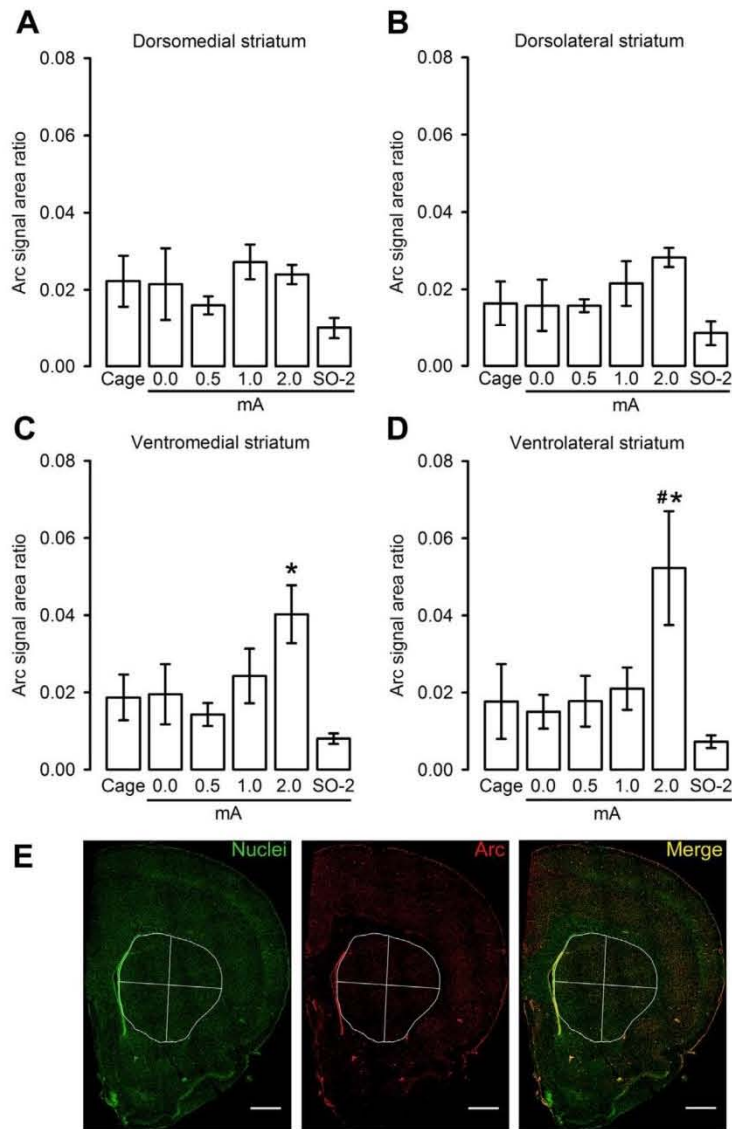


Fig. 3. Effects of intensity of inhibitory avoidance training on Arc signal area in four different regions of the striatum. There were no significant differences in Arc signal area (*mean \pm SEM*), among the groups in dorsomedial (A) and dorsolateral (B) striatum. A higher mean area of Arc signal was found in the groups trained with the high foot-shock intensity as compared to the SO-2 group in ventromedial (C) and ventrolateral (D) striatum ($n = 4$ per group). There was also a significant difference between the 2.0 and the 0.0 mA groups in ventrolateral striatum. * $p < 0.05$ as compared with the SO-2 group, # $p < 0.05$ as compared with the 0.0 mA group. (E) Representative images of SYTOX-green counterstain for nuclei detection (green), Arc detection (red), and a merge image of Arc and nuclei from an animal trained with 2.0 mA. Scale bar = 500 μ m.

These results indicate that, as in the case of non-contingent foot-shock and the 0.0 mA groups, training with the lower foot-shock did not induce changes in Arc expressing neurons. On the other hand, moderate training induced an increase in these neurons, which was even greater with intense training both in ventromedial and ventrolateral striatal neurons. Thus, the increased Arc protein expression in ventral-medial and ventral-lateral striatum very probably reflects the recruitment of more neurons by the intense training.

5. Increase in serum corticosterone concentration is related to foot-shock intensity but not to inhibitory avoidance training

As an index of strength of training, we investigated whether CORT serum concentration was related to the intensity of the foot-shocks used for inhibitory avoidance training. De Kloet, Vreugdenhil, Oitzl, and Joëls (1998), reported that CORT release usually reaches maximum levels within 15 min after hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis activation. For this

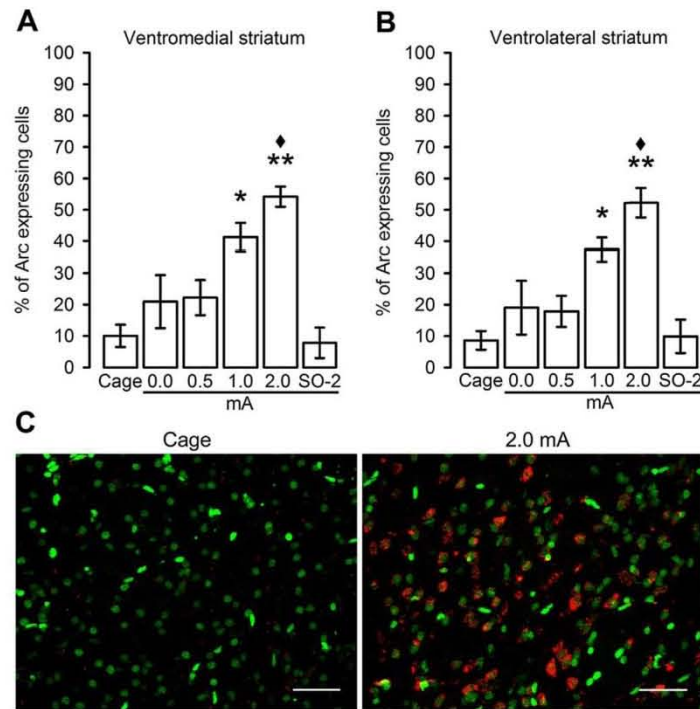


Fig. 4. Effects of intensity of inhibitory avoidance training on Arc cell count in ventromedial and ventrolateral striatum. The graphs show the mean (\pm SEM) percentage of Arc protein expressing cells in the ventromedial striatum (A) and ventrolateral striatum (B). In both regions the 1.0 and the 2.0 mA groups differed significantly from the Cage and SO-2 groups ($*p < 0.05$; $**p < 0.001$). Additionally, in both regions the 2.0 mA group showed increased Arc expressing neurons compared to the 0.0 and 0.5 mA groups ($*p < 0.01$). No significant differences between the 1.0 and 2.0 mA groups were found ($n = 4$ per group). (C) Representative two dimensional maximum intensity Z projection image from tridimensional z-stack images, labeled for Arc protein (red) and the cell nuclei (green). The left image is from a Cage animal, while the right image is from a 2.0 mA trained animal. Scale bar = 50 μ m.

reason, groups of rats ($n = 4$ per group) were trained in inhibitory avoidance, with the same intensities (0.0, 0.5, 1.0, and 2.0 mA) and control conditions (Cage and SO-2 groups) as described above, and then sacrificed 15 min after training; blood was collected at this time for CORT serum concentration measurement. We also evaluated CORT serum concentration in the animals that were sacrificed for Arc expression analysis 45 min after the inhibitory avoidance task (experiment described above; Section 4).

5.1. Radioimmunoassay procedure

The concentration of CORT in serum was determined by radioimmunoassay, using the sheep anti-CORT polyclonal antibody (AB1297, Merck-Millipore) at 1:9000 dilution. Serum samples were diluted 1:500 in 0.01 M phosphate buffer pH 7.5, with 0.15 M NaCl and 0.1% gelatin and heated at 98 $^{\circ}$ C for 10 min. Linear portion of the standard curve: 5–4000 pg of CORT/ml (CORT, catalog number 46148, Sigma-Aldrich) (Vetranal analytical standard), samples were assayed in duplicate.

5.2. Results

The one-way ANOVA yielded significant differences among the groups regarding concentration of CORT in serum at 15 min after training ($F_{(5,13)} = 10.55$, $p < 0.0005$). The post hoc Bonferroni test showed a significantly higher concentration of CORT in the 2.0 mA group than in the Cage and the 0.5 mA groups ($p < 0.05$ for both comparisons); the SO-2 group had a higher amount of CORT than that of the Cage, 0.0, and 0.5 mA groups (p 's < 0.001 ,

0.001, and 0.005, respectively) (Fig. 5A). The analysis of CORT concentration 45 min after the training and control procedures did not reveal significant differences among the groups (ANOVA $F_{(5,18)} = 1.48$, $p = 0.24$) (Fig. 5B). The high foot-shock clearly increased serum glucocorticoid concentration at the earlier time tested (15 min) which normalized 45 min after training. Thus, serum CORT concentration increased in response to the higher foot-shock intensity, regardless of whether the animals had been trained or not.

6. Discussion

The main results of the present study are: (1) training with a high foot-shock intensity produced a higher resistance to extinction than training with moderate or low foot-shock intensities; (2) the group trained with the high foot-shock intensity had a larger area of Arc expression in ventral striatum than the moderate and low foot-shock groups, while no changes in Arc expression were produced in dorsal striatum by any of the treatments; (3) training with both moderate and high foot-shock intensities increased the number of neurons that express Arc protein in ventral striatum, but not in dorsal striatum.

Intense inhibitory avoidance training, using a foot-shock of 2.0 mA, produced a memory trace that was highly resistant to extinction (Fig. 1), contrasting with the animals trained with 1.0 mA, which on the first test session showed a similar retention latency to the former group, but on subsequent sessions showed rapid extinction just as the animals trained with the lower foot-shock did. These results confirm previous observations, where

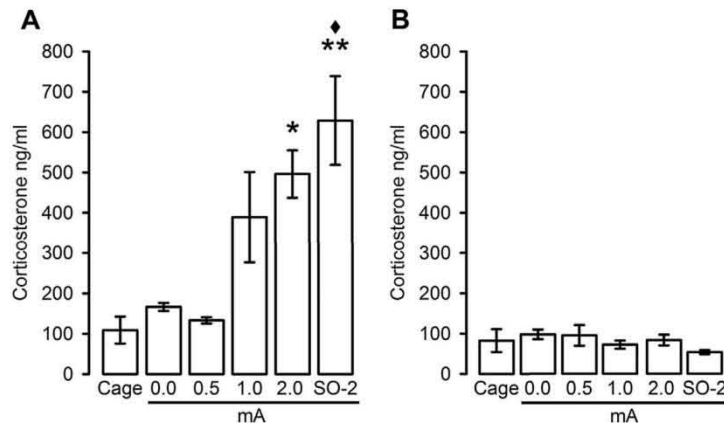


Fig. 5. Serum corticosterone concentration is related to high foot-shock intensity. Mean (\pm SEM) CORT serum concentration, measured at 15 min after training * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$ vs. the Cage and 0.5 mA groups; $\blacklozenge p < 0.01$ vs. the 0.0 mA group (A). No significant differences were found at 45 min after training (B); $n = 4$ per group.

training with a foot-shock of relatively high-intensity also induced a higher resistance to extinction of inhibitory avoidance learning (Bello-Medina et al., 2016; Garín-Aguilar et al., 2012; Prado-Alcalá et al., 1994, 2012).

The increase of about 40% in the number of Arc protein expressing cells found in the ventral regions, in both the 1.0 mA and 2.0 mA groups, does not seem to be congruent with the finding that there was a significantly larger Arc signal area in the 2.0 mA group, but not so in the 1.0 mA group. This apparent discrepancy might be due to a wider distribution of Arc protein in the soma and dendrites of striatal neurons of the animals that had been trained with 2.0 mA. However, the methods used in the present study did not permit us to properly test this possibility because we did not measure Arc protein expression quantitatively, and because the histological procedures used did not allow for an optimal preservation of the dendritic structure. Nonetheless, by measuring Arc protein concentration in dendritic fractions with Western blotting, previous reports showed that administering clenbuterol or CORT into the amygdala immediately after inhibitory avoidance training increased dendritic Arc protein concentration in hippocampus, cingulate, and prefrontal cortex; these treatments also improved inhibitory avoidance performance in a retention test run 48 h after training (McIntyre et al., 2005; McReynolds, Holloway-Erickson, Parmar, & McIntyre, 2014; McReynolds et al., 2010).

The specificity of the effects of training on Arc expression was verified by the results obtained in the Cage group, which was intentionally manipulated like the other groups in order to factor out the expression of Arc in the trained groups. As it was expected, the amount of Arc-expressing cells in the Cage group did not differ from the groups that were only exposed to the inhibitory avoidance box or to the foot-shock alone.

It should be pointed out that spatial exploration is known to induce Arc expression in about 20% of striatal neurons (Vazdarjanova et al., 2006); we also found that about 20% of ventral striatal neurons express Arc after the rats explored the inhibitory avoidance box (0.0 mA group) or after inhibitory avoidance training with the low foot-shock intensity (0.5 mA), suggesting that exploration, by itself, may account for the low amount of neurons expressing Arc in these conditions. The fact that the group trained with the low foot-shock intensity did not show an increment in Arc-expressing cells points to the idea that a certain threshold in the intensity of the aversive stimulation used for training must be reached to induce a significant increment of Arc.

Interestingly, we found that high CORT levels in blood serum were produced after training with the high foot-shock intensity; however, the increase in CORT release was also found in the group that received the non-contingent high foot-shock. This outcome leaves open the question of whether the inhibitory avoidance training by itself produced the release of CORT, since this result was confounded by the fact that the aversive stimulation, alone or administered during training was accompanied by such release.

A very important fact is that the increase in the expression of Arc protein in the ventral striatum was not induced in the high foot-shock untrained group, indicating that expression of Arc in the ventral striatum is not linked to the aversive stimulation per se, as the CORT release is, but rather to the complex associative processes derived from the interaction among the context, the high foot-shock, and the motor performance involved in IA.

Taken together, this set of findings demonstrates that, compared with low and moderate training, intense inhibitory avoidance training induces Arc protein expression in a higher number of neurons in ventral striatum, and, probably, a higher amount of Arc in these neurons. The role of Arc in long-term synaptic plasticity is well documented (Bramham, Worley, Moore, & Guzowski, 2008; Nonaka et al., 2014; Steward & Worley, 2002). The increased expression of Arc protein produced by intense training could be involved in the generation of robust synaptic modifications, such as those seen in striatal dendritic spine density and morphology following intense inhibitory avoidance training (Bello-Medina et al., 2016). These synaptic modifications are probably involved in the mechanisms underlying the strong resistance to extinction shown by the animals subjected to intense training. For this reason, we consider that evaluation of Arc expression gives reasonable clues about the neuronal mechanisms involved in enhanced learning.

The two measures used to analyze Arc protein expression, consistently indicated that the ventral regions of the striatum were the only regions where this expression was augmented after intense training. This may be explained by their anatomical and functional features. They communicate with different cortical and limbic regions (Berendse, Graaf, & Groenewegen, 1992; McGeorge & Faulk, 1989; Ramanathan, Hanley, Deniau, & Bolam, 2002; Voorn et al., 2004). Importantly, the ventrolateral striatal region communicates with the insular cortex (Lasiter, Deems, & Glanzman, 1985), which is involved in aversively motivated associations (Bermudez-Rattoni, 2014), and it has been proposed that the ventrolateral

striatum is involved in integrating the affective attributes of associated stimuli (Lelos, Harrison, & Dunnett, 2011).

In conclusion, training in the inhibitory avoidance task with a foot-shock of moderate intensity produces good retention of the task and an increment of active neurons in ventral, but not in dorsal striatum, as was also the case after training with the high-intensity foot-shock. However, only intense training induced high resistance to extinction and a larger area of Arc expression signal in the ventrolateral region, thus giving support to the hypotheses that guided this work. This Arc expression may be related to augmented synaptic plasticity, and may be one of the physiological substrates of enhanced learning.

Acknowledgements

The authors thank Elsa N. Hernández, Norma Serafin, Miguel Cisneros, Andrea C. Medina, Carlos Lozano, Martin García and Angel Méndez for excellent technical assistance, Dr. Hiroyuki Okuno for the supply of Arc antibody, Leonor Casanova and Lourdes Lara for administrative help, and Yave Lozano and Michael C. Jezierski for reviewing the manuscript. This research was supported by grants DGAPA-PAPIIT-UNAM – México (IN202414 and IN216510), CONACYT – México (251634, 130524 and 130802). This work was carried out in partial fulfillment of the requirements to obtain the Doctor's Degree (Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México) by D.A. González-Franco, who was a recipient of Graduate Scholarships from CONACYT – México (333697) and DGAPA-PAPIIT-UNAM – México (IN202414).

References

- Bello-Medina, P. C., Flores, G., Quirarte, G. L., McGaugh, J. L., & Prado Alcalá, R. A. (2016). Mushroom spine dynamics in medium spiny neurons of dorsal striatum associated with memory of moderate and intense training. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(42), E6516–E6525. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1613680113>.
- Berendse, H. W., Graaf, Y. G.-D., & Groenewegen, H. J. (1992). Topographical organization and relationship with ventral striatal compartments of prefrontal corticostriatal projections in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 316(3), 314–347. <http://dx.doi.org/10.1002/cne.903160305>.
- Bermudez-Rattoni, F. (2014). The forgotten insular cortex: Its role on recognition memory formation. *Neurobiology of Learning and Memory*, 109, 207–216. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2014.01.001>.
- Bramham, C. R., Worley, P. F., Moore, M. J., & Guzowski, J. F. (2008). The immediate early gene *arc/arg3.1*: Regulation, mechanisms, and function. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 28(46), 11760–11767. <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3864-08.2008>.
- Cobos-Zapíaín, G. G., Salado-Castillo, R., Sánchez-Alavez, M., Quirarte, G. L., Roldán-Roldán, G., Diaz del Guante, M. A., & Prado-Alcalá, R. A. (1996). High level of footshock during inhibitory avoidance training prevents amnesia induced by intranigral injection of GABA antagonists. *Neurobiology of Learning and Memory*, 65(3), 202–206. <http://dx.doi.org/10.1006/nlme.1996.0024>.
- Cordero, M. I., Merino, J. J., & Sandi, C. (1998). Correlational relationship between shock intensity and corticosterone secretion on the establishment and subsequent expression of contextual fear conditioning. *Behavioral Neuroscience*, 112(4), 885–891. <http://dx.doi.org/10.1037/0735-7044.112.4.885>.
- De Kloet, E. R., Vreugdenhil, E., Oitzl, M. S., & Joëls, M. (1998). Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocrine Reviews*, 19(3), 269–301. <http://dx.doi.org/10.1210/edrv.19.3.0331>.
- Devan, B. D., & White, N. M. (1999). Parallel information processing in the dorsal striatum: Relation to hippocampal function. *The Journal of Neuroscience*, 19(7), 2789–2798.
- Díaz-Trujillo, A., Contreras, J., Medina, A. C., Silveyra-Leon, G. A., Antaramian, A., Quirarte, G. L., & Prado-Alcalá, R. A. (2009). Enhanced inhibitory avoidance learning prevents the long-term memory-impairing effects of cycloheximide, a protein synthesis inhibitor. *Neurobiology of Learning and Memory*, 91(3), 310–314. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2008.10.006>.
- Dudman, J. T., & Gerfen, C. R. (2015). The Basal Ganglia. In G. Paxinos (Ed.), *The Rat Nervous System* (pp. 391–440). <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-374245-2.00017-6>.
- Durán-Arévalo, M., Cruz-Morales, S. E., & Prado-Alcalá, R. A. (1990). Is acetylcholine involved in memory consolidation of over-reinforced learning? *Brain Research Bulletin*, 24(6), 725–727. [http://dx.doi.org/10.1016/0361-9230\(90\)90129-N](http://dx.doi.org/10.1016/0361-9230(90)90129-N).
- Gardner, R. S., Suarez, D. F., Robinson-Burton, N. K., Rudnicki, C. J., Gulati, A., Ascoli, G. A., & Dumas, T. C. (2016). Differential Arc expression in the hippocampus and striatum during the transition from attentive to automatic navigation on a plus maze. *Neurobiology of Learning and Memory*, 131, 36–45. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2016.03.008>.
- Garín-Aguilar, M. E., Díaz-Cintra, S., Quirarte, G. L., Aguilar-Vázquez, A., Medina, A. C., & Prado-Alcalá, R. A. (2012). Extinction procedure induces pruning of dendritic spines in CA1 hippocampal field depending on strength of training in rats. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 6, 12. <http://dx.doi.org/10.3389/fnbeh.2012.00012>.
- Garín-Aguilar, M. E., Medina, A. C., Quirarte, G. L., McGaugh, J. L., & Prado-Alcalá, R. A. (2014). Intense aversive training protects memory from the amnesic effects of hippocampal inactivation. *Hippocampus*, 24(1), 102–112. <http://dx.doi.org/10.1002/hipo.22210>.
- Goodman, J., Leong, K.-C., & Packard, M. G. (2012). Emotional modulation of multiple memory systems: Implications for the neurobiology of post-traumatic stress disorder. *Reviews in the Neurosciences*, 23(5–6), 627–643. <http://dx.doi.org/10.1515/revneuro-2012-0049>.
- Guzowski, J. F. (2002). Insights into immediate-early gene function in hippocampal memory consolidation using antisense oligonucleotide and fluorescent imaging approaches. *Hippocampus*, 12(1), 86–104. <http://dx.doi.org/10.1002/hipo.10010>.
- Guzowski, J. F., Lyford, G. L., Stevenson, G. D., Houston, F. P., McGaugh, J. L., Worley, P. F., & 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. *The Journal of Neuroscience*, 20(11), 3993–4001.
- Guzowski, J. F., McNaughton, B. L., Barnes, C. A., & Worley, P. F. (1999). Environment-specific expression of the immediate-early gene Arc in hippocampal neuronal ensembles. *Nature Neuroscience*, 2(12), 1120–1124. <http://dx.doi.org/10.1038/16046>.
- Guzowski, J. F., Setlow, B., Wagner, E. K., & McGaugh, J. L. (2001). Experience-dependent gene expression in the rat hippocampus after spatial learning: A comparison of the immediate-early genes Arc, c-fos, and zif268. *The Journal of Neuroscience*, 21(14), 5089–5098. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2114-01.2001>.
- Hyman, S. E. (2005). Addiction: A disease of learning and memory. *The American Journal of Psychiatry*, 162(8), 1414–1422. <http://dx.doi.org/10.1176/appi.ajp.162.8.1414>.
- Kemp, J. M., & Powell, T. P. (1971). The structure of the caudate nucleus of the cat: Light and electron microscopy. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 262(845), 383–401. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.1983.0080>.
- Kreitzer, A. C., & Malenka, R. C. (2008). Striatal plasticity and basal ganglia circuit function. *Neuron*, 60(4), 543–554. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2008.11.005>.
- Lasiter, P. S., Deems, D. A., & Glanzman, D. L. (1985). *Thalamocortical relations in taste aversion learning: I. Involvement of gustatory thalamocortical projections in taste aversion learning*. Behavioral neuroscience. US: American Psychological Association. <http://dx.doi.org/10.1037/0735-7044.99.3.454>.
- Lelos, M. J., Harrison, D. J., & Dunnett, S. B. (2011). Impaired sensitivity to Pavlovian stimulus-outcome learning after excitotoxic lesion of the ventrolateral neostriatum. *Behavioural Brain Research*, 225(2), 522–528. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2011.08.017>.
- Link, W., Konietzko, U., Kauselmann, G., Krug, M., Schwanke, B., Frey, U., & Kuhl, D. (1995). Somatodendritic expression of an immediate early gene is regulated by synaptic activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(12), 5734–5738.
- Lozano, Y. R., Serafin, N., Prado-Alcalá, R. A., Roozendaal, B., & Quirarte, G. L. (2013). Glucocorticoids in the dorsomedial striatum modulate the consolidation of spatial but not procedural memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, 101, 55–64. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2013.01.001>.
- Lyford, G. L., Yamagata, K., Kaufmann, W. E., Barnes, C. A., Sanders, L. K., Copeland, N. G., ... 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(2), 433–445. [http://dx.doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90299-6](http://dx.doi.org/10.1016/0896-6273(95)90299-6).
- McGaugh, J. L. (2013). Making lasting memories: Remembering the significant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(Suppl. 2), 10402–10407. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1301209110>.
- McGeorge, A. J., & Faulk, R. L. M. (1989). The organization of the projection from the cerebral cortex to the striatum in the rat. *Neuroscience*, 29(3), 503–537. [http://dx.doi.org/10.1016/0306-4522\(89\)90128-0](http://dx.doi.org/10.1016/0306-4522(89)90128-0).
- McIntyre, C. K., Miyashita, T., Setlow, B., Marjon, K. D., Steward, O., Guzowski, J. F., & McGaugh, J. L. (2005). Memory-influencing intra-basolateral amygdala drug infusions modulate expression of Arc protein in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(30), 10718–10723. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0504436102>.
- McReynolds, J. R., Donowho, K., Abdi, A., McGaugh, J. L., Roozendaal, B., & McIntyre, C. K. (2010). Memory-enhancing corticosterone treatment increases amygdala norepinephrine and Arc protein expression in hippocampal synaptic fractions. *Neurobiology of Learning*, 93(3), 312–321. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2009.11.005>.
- McReynolds, J. R., Holloway-Erickson, C. M., Parmar, T. U., & McIntyre, C. K. (2014). Corticosterone-induced enhancement of memory and synaptic Arc protein in the medial prefrontal cortex. *Neurobiology of Learning and Memory*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2014.02.007>.
- National Research Council (2011). *Guide for the care and use of laboratory animals* (8th ed.). Washington DC: National Academy of Sciences. <http://doi.org/10.17226/12910>.

- Neill, D. B., & Grossman, S. P. (1970). Behavioral effects of lesions or cholinergic blockade of the dorsal and ventral caudate of rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 71(2 PART 1), 311–317. <http://dx.doi.org/10.1037/h0029110>.
- Nonaka, M., Fujii, H., Kim, R., Kawashima, T., Okuno, H., & Bito, H. (2014). Untangling the two-way signalling route from synapses to the nucleus, and from the nucleus back to the synapses. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 369(1633), 20130150. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2013.0150>.
- Okuno, H. (2011). Regulation and function of immediate-early genes in the brain: Beyond neuronal activity markers. *Neuroscience Research*, 69(3), 175–186. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neures.2010.12.007>.
- Packard, M. G., & Knowlton, B. J. (2002). Learning and memory functions of the Basal Ganglia. *Annual Review of Neuroscience*, 25(1), 563–593. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.neuro.25.1.563>.
- Parsons, R. G., & Ressler, K. J. (2013). Implications of memory modulation for post-traumatic stress and fear disorders. *Nature Neuroscience*, 16(2), 146–153. <http://dx.doi.org/10.1038/nn.3296>.
- Paxinos, G., & Watson, C. (2007). *The rat brain in stereotaxic coordinates* (6th ed). Burlington, MA: Academic Press.
- Pérez-Ruiz, C., & Prado-Alcalá, R. A. (1989). Retrograde amnesia induced by lidocaine injection into the striatum: Protective effect of the negative reinforcer. *Brain Research Bulletin*, 22(4), 599–603. [http://dx.doi.org/10.1016/0361-9230\(89\)90076-2](http://dx.doi.org/10.1016/0361-9230(89)90076-2).
- Prado-Alcalá, R. A., & Cobos-Zapíaín, G. G. (1977). Learning deficits induced by cholinergic blockade of the caudate nucleus as a function of experience. *Brain Research*, 138(1), 190–196. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993\(77\)90797-1](http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993(77)90797-1).
- Prado-Alcalá, R. A., Haiek, M., Rivas, S., Roldán-Roldán, G., & Quirarte, G. L. (1994). Reversal of extinction by scopolamine. *Physiology & Behavior*, 56(1), 27–30. [http://dx.doi.org/10.1016/0031-9384\(94\)90257-7](http://dx.doi.org/10.1016/0031-9384(94)90257-7).
- Prado-Alcalá, R. A. (1995). Serial and parallel processing during memory consolidation. In J. L. McGaugh, F. Bermúdez-Rattoni, & R. A. Prado-Alcalá (Eds.), *Plasticity in the central nervous system: Learning and memory* (pp. 57–65). Mahwah, NJ: L Erlbaum Associates.
- Prado-Alcalá, R. A., Medina, A. C., López, N. S., & Quirarte, G. L. (2012). Intense emotional experiences and enhanced training prevent memory loss induced by post-training amnesic treatments administered to the striatum, amygdala, hippocampus or substantia nigra. *Reviews in the Neurosciences*, 23(5–6), 501–508. <http://dx.doi.org/10.1515/revneuro-2012-0061>.
- Prado-Alcalá, R. A., Salado-Castillo, R., Quiroz, C., Garín-Aguilar, M. E., Díaz-Trujillo, A., Rivas-Arancibia, S., & Quirarte, G. L. (2007). Enhanced learning protects brain against effects of amnesic treatments. In F. Bermúdez-Rattoni (Ed.), *Neural plasticity and memory: From genes to brain imaging* (pp. 175–191). Boca Raton (FL): CRC Press. <http://doi.org/doi:10.1201/9781420008418.ch9>.
- Prado-Alcalá, R. A., & Wise, R. A. (1984). Brain stimulation reward and dopamine terminal fields. I. Caudate-putamen, nucleus accumbens and amygdala. *Brain Research*, 297(2), 265–273. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993\(84\)90567-5](http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993(84)90567-5).
- Quiroz, C., Martínez, I., Quirarte, G. L., Morales, T., Díaz-Cintra, S., & Prado-Alcalá, R. A. (2003). Enhanced inhibitory avoidance learning prevents the memory-impairing effects of post-training hippocampal inactivation. *Experimental Brain Research*, 153(3), 400–402. <http://dx.doi.org/10.1007/s00221-003-1704-1>.
- Ramanathan, S., Hanley, J. J., Deniau, J.-M., & Bolam, J. P. (2002). Synaptic convergence of motor and somatosensory cortical afferents onto GABAergic interneurons in the rat striatum. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(18), 8158–8169.
- Ramírez-Amaya, V., Vazdarjanova, A., Mikhael, D., Rosi, S., Worley, P. F., & Barnes, C. A. (2005). Spatial exploration-induced Arc mRNA and protein expression: Evidence for selective, network-specific reactivation. *The Journal of Neuroscience*, 25(7), 1761–1768. <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4342-04.2005>.
- Salado-Castillo, R., Díaz del Guante, M. A., Alvarado, R., Quirarte, G. L., & Prado-Alcalá, R. A. (1996). Effects of regional GABAergic blockade of the striatum on memory consolidation. *Neurobiology of Learning and Memory*, 66(2), 102–108. <http://dx.doi.org/10.1006/nlme.1996.0051>.
- Salado-Castillo, R., Sánchez-Alavéz, M., Quirarte, G. L., Martínez García, M. I., & Prado-Alcalá, R. A. (2011). Enhanced training protects memory against amnesia produced by concurrent inactivation of amygdala and striatum, amygdala and substantia nigra, or striatum and substantia nigra. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 5, 83. <http://dx.doi.org/10.3389/fnbeh.2011.00083>.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.2089>.
- Schwabe, L., Joëls, M., Roozendaal, B., Wolf, O. T., & Oitzl, M. S. (2012). Stress effects on memory: An update and integration. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 36(7), 1740–1749. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.07.002>.
- Solana-Figueroa, R., Salado-Castillo, R., Quirarte, G. L., Galindo, L. E., & Prado-Alcalá, R. A. (2002). Enhanced inhibitory avoidance training protects against the amnesic effect of p-chloroamphetamine. *Life Sciences*, 71(4), 391–399. [http://dx.doi.org/10.1016/S0024-3205\(02\)01684-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0024-3205(02)01684-3).
- Steward, O., & Worley, P. (2002). Local synthesis of proteins at synaptic sites on dendrites: Role in synaptic plasticity and memory consolidation? *Neurobiology of Learning and Memory*, 78(3), 508–527. <http://dx.doi.org/10.1006/nlme.2002.4102>.
- Torregrassa, M. M., Corlett, P. R., & Taylor, J. R. (2011). Aberrant learning and memory in addiction. *Neurobiology of Learning and Memory*, 96(4), 609–623. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2011.02.014>.
- Vazdarjanova, A., McNaughton, B. L., Barnes, C. A., Worley, P. F., & Guzowski, J. F. (2002). Experience-dependent coincident expression of the effector immediate-early genes arc and homer 1a in hippocampal and neocortical neuronal networks. *The Journal of Neuroscience*, 22(23), 10067–10071.
- Vazdarjanova, A., Ramirez-Amaya, V., Insel, N., Plummer, T. K., Rosi, S., Chowdhury, S., ... Barnes, C. A. (2006). Spatial exploration induces ARC, a plasticity-related immediate-early gene, only in calcium/calmodulin-dependent protein kinase II-positive principal excitatory and inhibitory neurons of the rat forebrain. *The Journal of Comparative Neurology*, 498(3), 317–329. <http://dx.doi.org/10.1002/cne>.
- Voorn, P., Vanderschuren, L. J. M. J., Groenewegen, H. J., Robbins, T. W., & Pennartz, C. M. A. (2004). Putting a spin on the dorsal-ventral divide of the striatum. *Trends in Neurosciences*, 27(8), 468–474. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tins.2004.06.006>.
- White, N. M., & McDonald, R. J. (2002). Multiple parallel memory systems in the brain of the rat. *Neurobiology of Learning and Memory*, 77(2), 125–184. <http://dx.doi.org/10.1006/nlme.2001.4008>.
- Yager, L. M., Garcia, A. F., Wunsch, A. M., & Ferguson, S. M. (2015). The ins and outs of the striatum: Role in drug addiction. *Neuroscience*, 301, 529–541. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.06.033>.