



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

CENTRO DE FÍSICA APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA

Efecto del entrenamiento incrementado en la tarea de evitación inhibitoria sobre la fosforilación de CREB en el estriado de ratas

**T E S I S**

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**Licenciado en Tecnología**

PRESENTA:

**Erika Viridiana Alonso Lorenzo**

DIRECTOR:

Dr. Roberto Agustín Prado Alcalá

CODIRECTOR:

Dra. Paola Cristina Bello Medina

Santiago de Querétaro, Qro., 2018





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
 CENTRO DE FÍSICA APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA  
 FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES, CUATITLÁN  
 LICENCIATURA EN TECNOLOGÍA



**Votos Aprobatorios**

**COMITÉ ACADÉMICO  
 LICENCIATURA EN TECNOLOGÍA**

Presente

En cumplimiento del Artículo 26 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la tesis de título **Efecto del entrenamiento incrementado en la tarea de evitación inhibitoria sobre la fosforilación de CREB en el estriado de ratas** que realizó la pasante **Erika Viridiana Alonso Lorenzo** con el número de cuenta **413005450**, bajo la opción de titulación por Tesis y Examen profesional en la Licenciatura en Tecnología.

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	Dra. Luz María López Marín	
<b>VOCAL</b>	Dr. Roberto Agustín Prado Alcalá	
<b>SECRETARIO</b>	Dra. Blanca Edith Millán Chiu	
<b>1er. SUPLENTE</b>	Dra. Sofía Yolanda Díaz Miranda	
<b>2º SUPLENTE</b>	Dr. Mauricio Díaz Muñoz	

Atentamente  
 "POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

UNAM, Campus Juriquilla, Qro. a 16 de marzo de 2018

## RESUMEN

El entrenamiento incrementado en la tarea de evitación inhibitoria (EI) implica aumentar la intensidad de choque eléctrico administrado a los sujetos durante la sesión de entrenamiento. Este tipo de entrenamiento produce una memoria persistente que es altamente resistente a la extinción; además este tipo de entrenamiento genera un efecto protector de la memoria contra tratamientos farmacológicos que producen amnesia al ser administrados en el estriado. La fosforilación de la proteína de unión al elemento de respuesta al cAMP (CREB) es un indicador de la actividad transcripcional en las neuronas, y se ha relacionado con la expresión génica necesaria para la consolidación de la memoria. Dos grupos de ratas macho de la cepa Wistar fueron entrenadas en la tarea de EI usando diferentes intensidades de choque eléctrico (1.0 y 3.0 mA); un grupo adicional fue entrenado sin la administración de un choque eléctrico (0.0 mA), y otros dos grupos fueron estudiados, uno que recibió la intensidad de choque eléctrico más alta (3.0 mA) sin ser entrenado en la tarea, y un grupo que permaneció en el bioterio. Estas ratas fueron sacrificadas una hora después del entrenamiento y sus tejidos cerebrales fueron procesados para la detección inmunohistoquímica de CREB fosforilado en la serina 133 (pCREB) en el estriado dorsal y ventral. Los resultados muestran una mayor proporción de núcleos neuronales pCREB positivos en el estriado ventral que en el dorsal en todos los grupos experimentales. Adicionalmente, se observó una dinámica en la proporción de núcleos pCREB positivos diferente entre el estriado derecho en comparación con el izquierdo, es decir, el hemisferio izquierdo presenta una mayor proporción de núcleos neuronales pCREB positivos en el grupo entrenado con un choque eléctrico de 1.0 mA con respecto a los otros grupos. Sin embargo, el hemisferio derecho muestra una alta proporción de núcleos neuronales pCREB positivos en los grupos 0.0 mA, 1.0 mA y 3.0 mA comparados con el grupo bioterio, sin presentar diferencias entre estos grupos. Estos resultados sugieren que la vía de transcripción modulada por pCREB en el estriado durante la consolidación de la memoria es requerida por los animales entrenados con un choque eléctrico moderado no así por un incrementado y, por lo tanto, la consolidación de la memoria de un entrenamiento incrementado debe requerir otro mecanismo molecular.

## **ABSTRACT**

Intense training is brought about through the increase of foot-shock intensity in inhibitory avoidance (IA) training, which produces a strong and persistent memory that is highly resistant to extinction. Intense training protects memory consolidation against the amnestic effects of pharmacological treatments in the striatum. The phosphorylation status of the cyclic AMP (cAMP)-responsive element-binding protein (CREB) is an indicator of its transcriptional activity and of gene expression in memory consolidation. Two groups of adult male Wistar rats were trained in IA using different intensities of foot-shock (1.0 and 3.0 mA), and an additional group was trained without foot-shock (0.0 mA); two other control groups were studied, one that received the higher foot-shock (3.0 mA) without training, and a naïve group. These rats were sacrificed 1 h after training for immunohistochemical detection of phospho-CREB ser133 (pCREB) in the dorsal and ventral striatum. The results showed a higher p-CREB ratio in the ventral striatum, that in the dorsal striatum. Also, p-CREB ratio showed a lateralization; the right hemisphere did not have a clear correlation between the p-CREB ratios and the intensity of training, while the left hemisphere showed a higher p-CREB ratio in the 1.0 mA group with respect to the other groups. A higher p-CREB ratio was not found in neurons of the intense training group. These results suggest that memory consolidation of intense training does not activate genomic mechanisms.

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer a mi director de tesis el Dr. Roberto Agustín Prado Alcalá por todo el apoyo que recibí y por darme la oportunidad de trabajar en el laboratorio bajo su tutela, por compartir sus conocimientos, por sus sugerencias y por su paciencia conmigo.

A mi codirectora, tutora y amiga, la Dra. Paola Cristina Bello Medina por confiar en mí y darme la oportunidad de finalizar mis estudios de Licenciatura en Tecnología. Por los regaños, y las largas horas de asesoría, por su casi infinita paciencia (insisto, no la merecía). Por no solo formarme en la parte académica sino por procurar mi crecimiento personal. Por los abrazos. ¡Gracias por todo!

A ambos muchas gracias por inculcarme una ética y disciplina en el trabajo intachable, permitirme crecer para ser una mejor profesional, y por guiarme durante los últimos pasos de esta etapa. Gracias.

Agradezco a los miembros de mi jurado por revisar y corregir este trabajo: Dra. Luz María López Marín, Dra. Blanca Edith Millán Chiu, Dra. Sofía Díaz Miranda y Dr. Mauricio Díaz Muñoz.

Agradezco a la Dra. Gina Quitarte por el apoyo mostrado durante el tiempo que pasé trabajando en el laboratorio, y por su participación en mi formación. Especialmente por crear un sólida formación conceptual durante su clase de Aprendizaje y Memoria.

A las técnicas académicos, la Dra. Andrea Cristina Medina Fragoso y la M.V.Z. Norma Serafín López por su excelente asistencia técnica y su colaboración en este proyecto.

A la Sra. Bertha Islas por su asistencia técnica con el manejo de los animales que se utilizaron durante el desarrollo del proyecto de esta tesis.

A las entidades que contribuyeron con financiamiento.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por auspiciar el proyecto de investigación N° 237570.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-PAPIIT), por auspiciar el proyecto de investigación IN201415

A las unidades de apoyo del Instituto de Neurobiología:

- A la unidad de enseñanza y posgrado, particularmente a la M. en C. Leonor Casanova Rico por todo su apoyo y colaboración.
- A la Unidad de Microscopía, en especial a la Ing. Elsa Nydia Hernández Ríos por su asistencia técnica para el uso del microscopio Apotome.
- A la Unidad de Cómputo, en especial al Ing. Ramón Martínez Olvera, M. en C. Alberto Lara Rubalcava, Ing. Omar González y la Ing. Sandra Hernández García.

A todo el personal de la Biblioteca y del Bioterio del campus Juriquilla.

Al Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada (CFATA).

A mis profesores de la Licenciatura en Tecnología del CFATA por haber participado en mi formación.

Al personal de Servicios Escolares de la Licenciatura en Tecnología.

### ***Agradecimientos personales***

A mis padres, *Demetrio Salvador* y *María del Carmen*, por su apoyo y paciencia, por dejar que siguiera mis sueños aun cuando no los comprendieran. A mis hermanos, *Jairo*, *José Luis* y *Dositeo*, los cuales me protegen aun siendo una mujer adulta, y cuyo ejemplo me inspira a mejorar todos los días. A mi hermanita y camarada *Diana*, gracias por tomar más de una vez el papel de la mayor, por los regañones y las correcciones, por apoyarme y por las hermosas cartas que me escribes. A *Miriam Revueltas* la cual es una segunda madre para mí.

A mis amigos de antes de este episodio en mi vida, en especial a *Javier*, *Valentín*, *Oscar*, *Sofía*, *Brenda* y *Yadira*, nuestras aventuras me prepararon para esta. A mis amigos de esta etapa: *Alma*; la cual se ha convertido en otra hermana para mí, *Erik*, *Tatiana*, *Luz*, *Alan*, *Ana*, *Liliana*, *Maritere*, y a todos ellos, quienes en incontables ocasiones me escucharon y lidiaron con el proceso de escritura de esta tesis tanto como yo. A *Rosemary* quien a pesar de estar lejos siempre está allí.

A mis amigos y maestros del Laboratorio de Investigación en Procesos Avanzados de Tratamiento de Aguas (LIPATA), el primer laboratorio en el que trabaje, con especial mención a *Iván Moreno*, *Manuel Cuautle*, *Isaac Rivera* y *Víctor García Rea* (mi Maestro Jedi). Ellos me vieron tomar mis primeros pasos en este medio; mis primeros aciertos y mis primeras metidas de pata, ellos me inspiraron a continuar por el camino de la ciencia.

A mis amigos y compañeros del Laboratorio de Aprendizaje y Memoria. En especial a *Paola*, *Alexander*, *Rafael* y *Martha*, gracias por toda la ayuda, por hacer más leves las caídas, por recordarme que trabajar duro es importante, pero sentirse bien también, por aceptar mis extrañas tradiciones y por ayudarme a comer todos esos aguacates, por estar ahí no solo en el ámbito profesional. Gracias.

A los amigos fuera del ámbito académico sin los cuales habría perdido una parte importante en mi formación, en especial a la *Sra. Yolada Martínez* y su familia que me ayudaron en mi literal metida de pata que culminó en brazo roto. A *Myryam Adaliz* y a *Don Agustín*. Cada uno de ellos apporto ayuda incondicional, regañones y alegrías, ellos crearon un ambiente familiar en esta ciudad.

A la gente de mi país, que financió el pago de mis estudios y mis actividades académicas. Gracias por estos 5 años.

*“Puesto que no se puede ser universal y saber todo lo que se puede saber acerca de todo, hay que saber un poco de todo. Porque es mucho más hermoso saber algo de todo que saberlo todo de una cosa; esta universalidad es la hermosa.”*

***-Blaise Pascal***



## **ABREVIATURAS**

**Ach:** Acetilcolina

**AMPA:** Ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico

**Arc:** Proteína asociada al citoesqueleto regulada por actividad

**bZIP:** Zipper de leucina

**CaMKII:** Quinasa calmodulina II

**cAMP:** Adenosina monofosfato cíclico

**CBP:** Proteína de unión de al elemento de respuesta al cAMP

**CED:** Centro del estriado dorsal

**CEV:** Centro del estriado ventral

**CREB:** Elemento de respuesta al cAMP

**DA:** Dopamina

**DAPI:** 4',6-diamino-2-fenilindol

**ED:** Estriado dorsal

**EDL:** Estriado dorsolateral

**EDM:** Estriado dorsomedial

**EGF:** Factor de crecimiento epidérmico

**EI:** Evitación inhibitoria

**EV:** Estriado ventral

**EVL:** Estriado ventrolateral

**EVM:** Estriado ventromedial

**GEIs:** Genes de expresión inmediata

**GPCR:** Receptores acoplados a proteínas G

**GPe:** Segmento externo el globo pálido

**Gpi:** Segmento interno del globo pálido

**KID:** Dominio inducible por quinasa

**MSNs:** Neuronas medianas espinosas

**NGF:** Factor de crecimiento nervioso

**NMDA:** N-metil-D-aspartato

**pCREB:** proteína de unión elemento de respuesta de cAMP fosforilada en la serina 133

**PKA:** Proteína quinasa A

**PKC:** Proteína quinasa C

**SNr:** Sustancia nigra pars reticulata

**STR:** Estriado

**STN:** Núcleo subtalámico

**SC:** Colículo superior

# ÍNDICE

RESUMEN .....	III
ABSTRACT .....	IV
AGRADECIMIENTOS.....	V
ABREVIATURAS .....	VIII
I. ANTECEDENTES.....	1
1. Aprendizaje y memoria.....	1
1.1 Tipos de aprendizaje.....	1
1.2 Memoria y su clasificación .....	3
1.3 La consolidación de la memoria.....	5
1.4 Tarea de evitación inhibitoria.....	7
1.5 Entrenamiento incrementado.....	8
2. Estriado .....	10
2.1 Tipos de células en el estriado.....	10
2.2 Conectividad.....	12
2.3 Regionalización funcional del estriado y su participación en la consolidación de la memoria.....	14
3. Cambios moleculares en la consolidación de la memoria .....	16
3.1 Factores de transcripción.....	18
3.2 La fosforilación de CREB .....	19
3.3 CREB fosforilado y su participación en la consolidación de la memoria.....	22
II. JUSTIFICACIÓN .....	24
III. OBJETIVOS.....	25
OBJETIVO GENERAL.....	25
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	25
IV. HIPÓTESIS .....	25
V. MÉTODOLOGÍA.....	26
1 Animales .....	26
2 Tarea de evitación inhibitoria .....	27
2.1 Aparatos .....	27
2.2 Entrenamiento .....	27

2.3 Extinción .....	28
3 Análisis histológico.....	28
3.1 Tejidos cerebrales.....	28
3.2 Bloques.....	28
3.4 Criosección.....	29
3.5 Inmunohistoquímica.....	29
4 Imágenes .....	30
4.1 Captura de imágenes .....	30
4.2 Análisis de imágenes.....	32
5 Análisis estadístico .....	34
5.1 Conducta.....	34
5.2 Histología .....	34
6 Diseño experimental .....	34
6.1 Curva de extinción de ratas entrenadas con diferentes intensidades de choque eléctrico .....	35
6.2 Efecto del entrenamiento moderado e incrementado sobre la fosforilación de CREB en la serina 133.....	35
V. RESULTADOS .....	37
5.1 Curva de extinción de ratas entrenadas con diferentes niveles de choque eléctrico... 37	
5.2 Aprendizaje de la tarea de evitación inhibitoria .....	38
5.3 Efecto del entrenamiento moderado e intenso sobre la fosforilación de CREB en la serina 133 .....	39
5.3.1 Laterización del estriado .....	40
5.3.2 Regionalización del estriado .....	41
5.3.3 Laterización de la región dorsal del estriado.....	42
5.3.4 Laterización de la región ventral del estriado. ....	43
VI. DISCUSIÓN.....	45
VIII. CONCLUSIONES.....	49
IX.- REFERENCIAS.....	50
X. ÍNDICE DE FIGURAS .....	72

# **I. ANTECEDENTES**

## **1. Aprendizaje y memoria**

El aprendizaje se define como el cambio relativamente permanente de la conducta derivado de la experiencia. Esta definición excluye los cambios producidos por adaptación sensorial, factores de motivación, daño cerebral, intoxicación, lesión, fatiga y enfermedad. Debido a que el entrenamiento o la experiencia son factores en el proceso de aprendizaje, se excluyen cambios conductuales del sujeto debido a la maduración, la senectud o de variables fisiológicas (Bower & Hilgard, 1989).

El uso de la palabra aprendizaje también hace referencia a alteraciones de procesos neuronales o sinápticos, incluso si la correlación con el cambio conductual no es documentada (Roediger, Dudai, & Frizpatrick, 2007). La plasticidad sináptica es una propiedad de conectividad que explica los mecanismos de aprendizaje y memoria; tal propiedad postula que la fuerza de las conexiones sinápticas no es fija sino que es modificable como el resultado de su uso (Cajal, 1894).

La conducta y el aprendizaje son expresiones de actividad neuronal. En las últimas décadas, la investigación sobre la plasticidad sináptica ha proporcionado modelos elegantes acerca de los mecanismo moleculares y genéticos que describen algunas de las conductas más simples de los organismos (Kandel, 2005).

### **1.1 Tipos de aprendizaje**

Uno de los principales avances en nuestro entendimiento de las implicaciones neuronales del aprendizaje en el último siglo ha sido el reconocimiento de la existencia de múltiples tipos de aprendizaje, que se apoyan en diferentes sistemas neuroanatómicos (Phelps, 2007).

El aprendizaje se puede clasificar, según el tipo de información, en declarativo y no declarativo o procedimental. El aprendizaje declarativo es creado a partir de conocimiento disponible con una correlación consciente, y puede ser evocado como un recuerdo verbal o no verbal, como una idea, sonido, imagen, sensación, olor o palabra. El aprendizaje procedimental recurre a información basada en habilidades, usualmente supone el

aprendizaje de una respuesta motora (procedimiento) en relación a un estímulo sensitivo (Squire & Kandel, 2009).

Al inicio del siglo XX se distinguieron dos procedimientos no declarativos; el aprendizaje asociativo y el aprendizaje no asociativo. El aprendizaje no asociativo se describe como el cambio de la respuesta funcional a un solo tipo de estímulo. Puede ser de dos clases, habituación y sensibilización (Squire & Kandel, 2009). La asociación de dos sucesos requiere una forma más compleja de aprendizaje conocida como aprendizaje asociativo. Se suelen distinguir dos tipos: condicionamiento clásico y condicionamiento instrumental.

En el condicionamiento clásico el sujeto asocia dos estímulos. Este tipo de aprendizaje fue descrito por Ivan Pavlov estudiando los reflejos digestivos de los perros. El trabajo de Pavlov demostró que un estímulo inicialmente neutral puede generar una respuesta aprendida, asociada a un evento específico posterior (Pavlov, 1927).

En el condicionamiento clásico el sujeto ejecuta una respuesta incondicionada (RI) ante un estímulo incondicionado (EI) específico, por ejemplo, la salivación ante la presentación de comida. Si al sujeto se le presenta un estímulo neutro antes del estímulo incondicionado, por ejemplo el sonido de una campana, después de cierto número de sesiones de entrenamiento se asocia el sonido (estímulo condicionado (EC)), con la entrega próxima de comida, de tal manera que al escuchar la campana el sujeto empieza a salivar. Si se presenta el EC sin el EI repetidamente la magnitud de la respuesta aprendida disminuye considerablemente, proceso que se conoce como extinción (Bear, Connors, & Paradiso, 2016).

El condicionamiento instrumental fue descubierto por el psicólogo Edward Thorndike, y fue ampliamente estudiado por B.F. Skinner. En este tipo de aprendizaje se crea una relación entre una respuesta (un actor motor) y un estímulo. En el condicionamiento instrumental el animal emite espontáneamente una determinada respuesta que forma parte de su repertorio conductual, y la asocia con un estímulo posterior que es consecuencia de la respuesta. Por ejemplo, una rata hambrienta puede aprender a presionar una palanca que suministra comida, es decir, la presión de la palanca tiene como consecuencia el acceso a la comida (Skinner, 1974).

A diferencia del condicionamiento clásico, que modifica las respuestas reflejas específicas a determinados estímulos, el condicionamiento operante modifica la frecuencia de las conductas que aparentemente ocurren ya sea espontáneamente o sin que haya estímulos incentivos identificables (Kandel, Schwartz, & Jessell, 1997).

Los estímulos asociados en el condicionamiento operante pueden ser reforzadores o castigos, ambos cambian la frecuencia de aparición la conducta asociada. Un reforzador aumenta la probabilidad de la aparición de la conducta, en cambio un castigo la disminuye. A su vez los reforzadores y los castigos se clasifican en positivos cuando se administra el estímulo al sujeto experimental; y en negativos cuando el estímulo es omitido (Domjan, 2015; Reynolds, 1968).

El escape y la evitación son ejemplos de conductas asociadas a reforzadores negativos. La evitación es una respuesta le permite al organismo posponer o evitar el comienzo del estímulo. En el escape la respuesta da término al estímulo después de su presentación; el organismo no puede evitar la aparición del estímulo (Domjan, 2015).

## **1.2 Memoria y su clasificación**

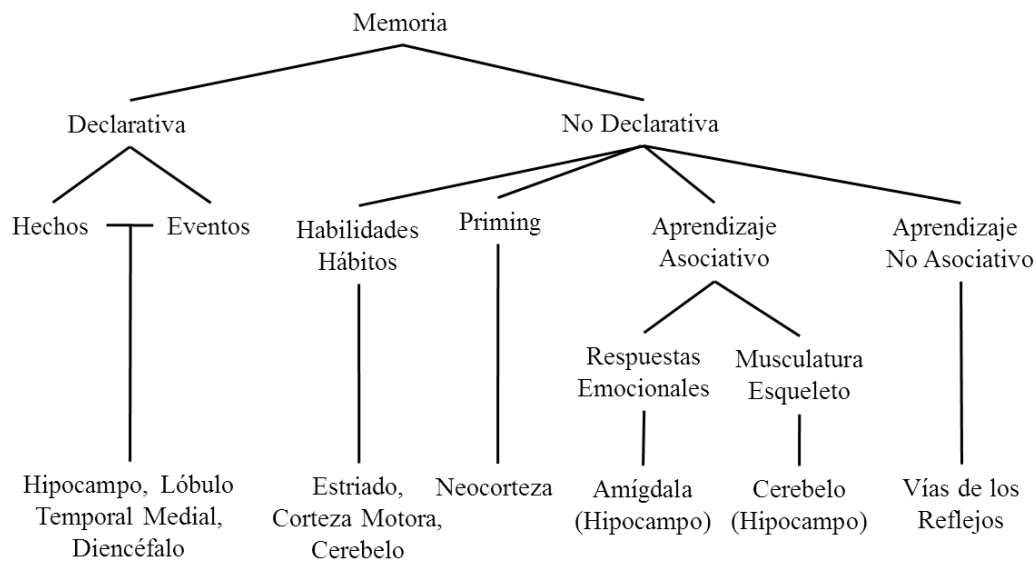
La memoria es el proceso de almacenamiento de la información adquirida derivada de la experiencia, la cual se puede recuperar a lo largo del tiempo (Kandel, Dudai, & Mayford, 2016). El día de hoy es claro que existen diferentes tipos de memoria, las cuales han sido relacionadas con diferentes estructuras cerebrales (Squire & Dede, 2015).

La investigación biológica y experimental sobre este tema empezó con los estudios realizados en Henry G. Molaison, conocido como el paciente H.M., los cuales permitieron distinguir dos tipos de memoria. El paciente H.M. se sometió a una operación que consistió en la extracción bilateral del hipocampo anterior, el uncus, la amígdala y corteza entorrinal para disminuir sus ataques de epilepsia (Annese et al., 2014). Después de la operación el paciente presentó amnesia anterógrada total, es decir carecía de la habilidad de formar nuevos recuerdos (Scoville & Milner, 1957; Squire, 2009).

Estudios posteriores mostraron que tanto el paciente H.M. como otros pacientes con afecciones de memoria parecidas, podían en un periodo no muy largo aprender habilidades

de coordinación óculo-manual (tarea de dibujo en espejo) y de dependencia de análisis de patrones (leer palabras invertidas en espejo), sin tener recuerdo de las sesiones de entrenamiento (Cohen & Squire, 1980; Milner, 1962). Estos estudios clínicos son el marco de referencia para la distinción efectiva entre dos tipos de memoria: la memoria declarativa y no declarativa.

Dada la gran importancia de fenómenos de aprendizaje y memoria, la memoria se organiza por tipo de información almacenada. Además, los trabajos de ablación de estructuras generaron múltiples evidencias experimentales que permitieron generar una lista de correspondencia entre la información adquirida y estructuras anatómicas participantes en su almacenamiento (Figura 1) (Squire, 1992).



**Figura 1 .-Diagrama de clasificación de la memoria en mamíferos.** Se muestra la clasificación de la memoria por tipo de información, el tipo de aprendizaje o material aprendido y las principales estructuras neuroanatómicas que se asocian a su proceso de almacenamiento. Modificado de Squire (1992).

La memoria declarativa proporciona una manera de representar el mundo externo. La memoria declarativa tiene dos componentes principales, la memoria semántica (hechos sobre el mundo) y memoria episódica (la habilidad de revivir un evento de tiempo y lugar específico con su contexto original) (Tulving, 1984).

El término no declarativo fue usado como un término paraguas para hacer referencia a múltiples formas de memoria (Squire & Zola-Morgan, 1988). La memoria no declarativa

incluye habilidades y hábitos, simples formas de condicionamiento y aprendizaje perceptivo, así como formas de comportamiento plástico primitivo, como la habituación y la sensibilización.

La memoria no declarativa es medida y expresada por medio del desempeño en una tarea previamente aprendida. Un principio importante es la habilidad de extraer los elementos comunes de una serie de eventos separados de forma gradual. La memoria no declarativa proporciona formas inconscientes o automáticas para responder al mundo (Squire & Zola-Morgan, 2015).

En ambos tipos de memoria (declarativa y no declarativa) existen etapas en las que se presentan cambios en la fuerza sináptica, y la fuerza de estos cambios se relaciona con la permanencia temporal de la información almacenada en el sujeto. Con este criterio la memoria se divide en memoria de corto y de largo plazo.

Derivado de los trabajos experimentales usando sílabas sin sentido, para evaluar el tiempo de permanencia de este material en la memoria de los humanos (Ebbinghaus, 1885), William James concluyó que debían existir al menos dos tipos de etapas en el proceso de memoria. Planteó una distinción cualitativa entre la memoria primaria o de corto plazo y la memoria secundaria o de largo plazo. Propuso que la memoria de corto plazo es una memoria lábil que dura de segundos a minutos. En contraste, la memoria de largo plazo es una memoria estable que puede durar semanas, meses o incluso toda la vida, y es recuperada en el momento en que se requiera (James, 1890).

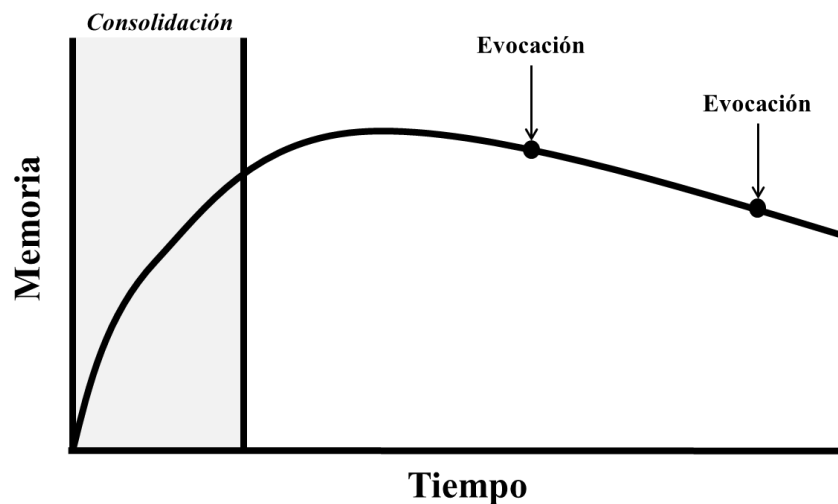
La memoria de corto plazo tiene tres características fundamentales básicas: es transitoria, no requiere cambios anatómicos y no requiere de la síntesis de nuevas proteínas. En contraste la memoria de largo plazo puede ser establecida por cambios anatómicos, y requerir de la síntesis de nuevas proteínas (Kandel, 2005).

### **1.3 La consolidación de la memoria**

Al final del siglo XIX Georg Müller y Alfons Pilzecker introdujeron el concepto de consolidación. Propusieron que el aprendizaje no induce instantáneamente un almacenamiento permanente en la memoria, sino que las memorias toman tiempo para ser



fijadas (consolidadas) (Lechner, Squire, & Byrne, 1999; Müller & Pilzecker, 1900). En otras palabras, las memorias son inicialmente frágiles, pero a través de un proceso de estabilización, éstas se vuelven resistentes; este proceso se denomina consolidación. La consolidación es un proceso que inicia después del aprendizaje, la cual tiene un carácter gradual y estable, que culmina en el almacenamiento a largo plazo de la memoria (Figura 2). La consolidación se logra durante los primeros minutos a horas después del proceso de adquisición (Dudai, 2004).



**Figura 2.- Representación esquemática de la formación de una memoria de largo plazo.** Se representan diferentes etapas de la memoria (adquisición, consolidación y evocación). El proceso conocido como consolidación se desarrolla en la línea temporal durante las primeras horas después de la adquisición. Modificado de Dudai (2004).

Las memorias que han sido consolidadas se vuelven resistentes a agentes que de otra manera son capaces de impedir la formación de una memoria de largo plazo. Estos agentes incluyen interferencia conductual, fármacos, convulsionantes y lesiones anatómicas. La ventana de tiempo de efectividad para detener el proceso de consolidación depende de la tarea y del bloqueador, y oscila entre los segundos y minutos (Brashers-Krug, Shadmehr, & Bizzi, 1996; Dudai, 2004; Duncan, 1949; McGaugh, 1966).

La transcripción de *novo* del ARNm es un requerimiento fundamental para la formación de una memoria de largo plazo. La administración de inhibidores de la síntesis de proteínas como la anisomicina, puromicina y cicloheximida, inmediatamente después del entrenamiento, en tareas como la habituación a largo-plazo, reconocimiento de objetos,

evitación activa y evitación inhibitoria, bloquea la formación de memorias de largo plazo; es decir afecta el proceso de consolidación (Agranoff & Klinger, 1964; Davis & Squire, 1984; Freeman, Rose, & Scholey, 1995). Estos inhibidores no reducen significativamente la percepción o la formación de la memoria de corto plazo y tampoco la retención de la memoria de largo plazo una vez que ha sido establecida (Barondes & Cohen, 1965, 1968; Davis & Squire, 1984; Squire & Barondes, 1974).

En las neuronas, la transcripción y traducción del ARNm son procesos necesarios para la formación de nuevas conexiones sinápticas, así como la transcripción de ARN no codificantes, que tienen funciones reguladoras o efectoras en la expresión génica. El resultado es una cascada de eventos que finalmente conduce a cambios estructurales y funcionales en las neuronas que median el almacenamiento de la memoria a largo plazo (Alberini & Kandel, 2014).

La única manera de saber si una memoria fue consolidada es a través de un proceso complejo conocido como evocación. La evocación implica que un sujeto recupere la información almacenada y tome decisiones coherentes con el contexto actual (Tulving & Thomson, 1973).

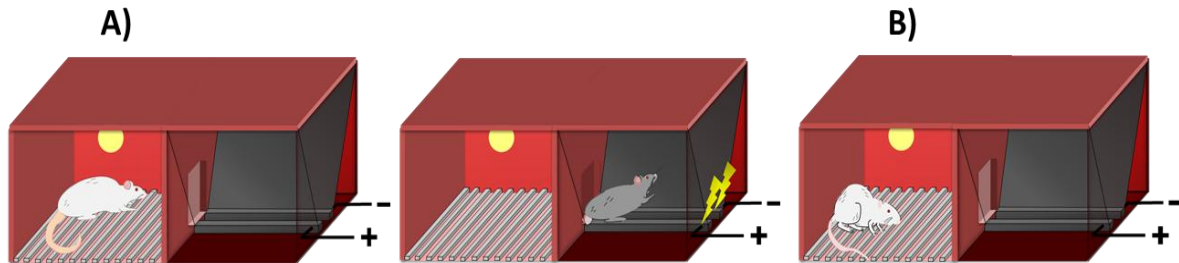
La evocación de la memoria puede inducir un proceso denominado extinción. La extinción es una disminución en la intensidad o frecuencia de la conducta aprendida debido a la ausencia del reforzador (Prado-Alcalá & Bermúdez-Rattoni, 2001).

#### **1.4 Tarea de evitación inhibitoria**

En las últimas cinco décadas de investigación acerca de la consolidación de la memoria se han usado diferentes tipos de modelos y paradigmas conductuales en invertebrados y en vertebrados. La tarea de evitación inhibitoria es una tarea cuya adquisición ocurre en un solo ensayo y permite una caracterización temporal del proceso de consolidación (Dudai, 2004).

La tarea de evitación inhibitoria (EI) tiene dos variantes: “Step-down” y “Step-through”; esta última, fue desarrollada por Jarvik y Kopp (1967). Se sabe que los roedores son fotofóbicos, por lo que cuando se les coloca en un compartimento iluminado comunicado

con uno obscuro, éstos se desplazarán al obscuro. El animal crea la asociación del compartimento oscuro con la administración de un choque eléctrico, de tal manera que cuando el animal es colocado de nuevo en la cámara evitará recibir el choque, inhibiendo la conducta de entrada al compartimento oscuro (Figura 3).



**Figura 3 .- Esquema de fases de la tarea de evitación inhibitoria.** A) Se muestra las dos fases de la sesión de entrenamiento. B) Se muestra la conducta típica durante la sesión de retención.

En la tarea de evitación inhibitoria se forma una memoria con diferentes componentes conductuales que son mediados por diferentes estructuras anatómicas. Esta tarea tiene un componente emocional, ya que se establece mediante la administración del estímulo aversivo, un componente espacial ya que se constituye una memoria que implica la navegación allocéntrica, y un componente procedimental ya que involucra la asociación de estímulos ambientales con la respuesta motora. Se proponen a la amígdala, el hipocampo y el estriado como las estructuras necesarias para el establecimiento de la memoria de esta tarea (Ambrogio Lorenzini, Baldi, Bucherelli, Sacchetti, & Tassoni, 1999; McDonald & White, 1993; Mcgaugh, McIntyre, & Power, 2002; Packard & Knowlton, 2002; Prado-Alcalá et al., 2006).

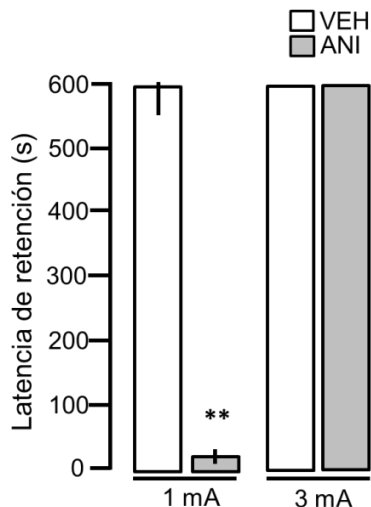
### **1.5 Entrenamiento incrementado**

La teoría de consolidación es apoyada por una gran cantidad de literatura que deriva de experimentos en los que los sujetos fueron entrenados para realizar una tarea después de un número relativamente pequeño de ensayos o sesiones de entrenamiento con niveles bajos de estimulación; en estas condiciones la administración de tratamientos que interfieren con la actividad neuronal producen deficiencia significativa en la consolidación de la memoria con el consecuente cuadro amnésico (Prado-Alcalá, Medina, López, & Quirarte, 2012).

En los últimos años se ha estudiado un nuevo paradigma de adquisición de la información conocido como entrenamiento incrementado. El término entrenamiento incrementado puede hacer referencia a dos tipos de condiciones de entrenamiento: el sobreentrenamiento y el sobrerreforzamiento (Prado-Alcalá et al., 2006). El sobreentrenamiento hace referencia al aprendizaje se lleva por medio de más sesiones de entrenamiento que las usuales para así alcanzar un buen desempeño (asintótico) en la tarea (Prado-Alcalá, Bermúdez-Rattoni, Velázquez-Martínez, & Bacha, 1978; Prado-Alcalá, Kaufmann, & Moscona, 1980). El sobrerreforzamiento es el aumento en la intensidad del estímulo aversivo administrado en tareas de tipo aversivo, como en el caso de la EI (Prado-Alcalá et al., 2006).

Tratamientos que típicamente producen amnesia se tornan inocuos al ser administrados a animales sobrerreforzados en la tarea de evitación inhibitoria. Tales tratamientos incluyen la administración sistémica de fármacos que bloquean el sistema colinérgico (Cruz-Morales, Durán-Arevalo, Del Guante, Quirarte, & Prado-Alcalá, 1992; Durán-Arevalo, Cruz-Morales, & Prado-Alcalá, 1990), o que lesionan el sistema serotoninérgico (Solana-Figueroa, Salado-Castillo, Quirarte, Galindo, & Prado-Alcalá, 2002), así como la administración de fármacos que interfieren con la actividad colinérgica y la inactivación reversible de regiones discretas del cerebro involucradas en la formación de la memoria de evitación inhibitoria, como el estriado (Giordano & Prado-Alcalá, 1986; Pérez-Ruiz & Prado-Alcalá, 1989), la sustancia nigra (Cobos-Zapíaín et al., 1996), la amígdala (Salado-Castillo, Sánchez-Alavez, Quirarte, Martínez García, & Prado-Alcalá, 2011) y el hipocampo (Quiroz et al., 2003).

En un trabajo realizado en nuestro laboratorio, a ratas se les administró anisomicina en el estriado anterodorsal 20 min antes del entrenamiento de la tarea de EI. Las ratas que fueron entrenadas con un choque eléctrico moderado mostraron un típico cuadro amnésico. Sin embargo, la anisomicina no produjo el cuadro amnésico en ratas que fueron entrenadas con una intensidad de choque alta, corroborándose así el efecto protector de la memoria producido por el entrenamiento incrementado (Figura 4) (González-Franco et al., en preparación).



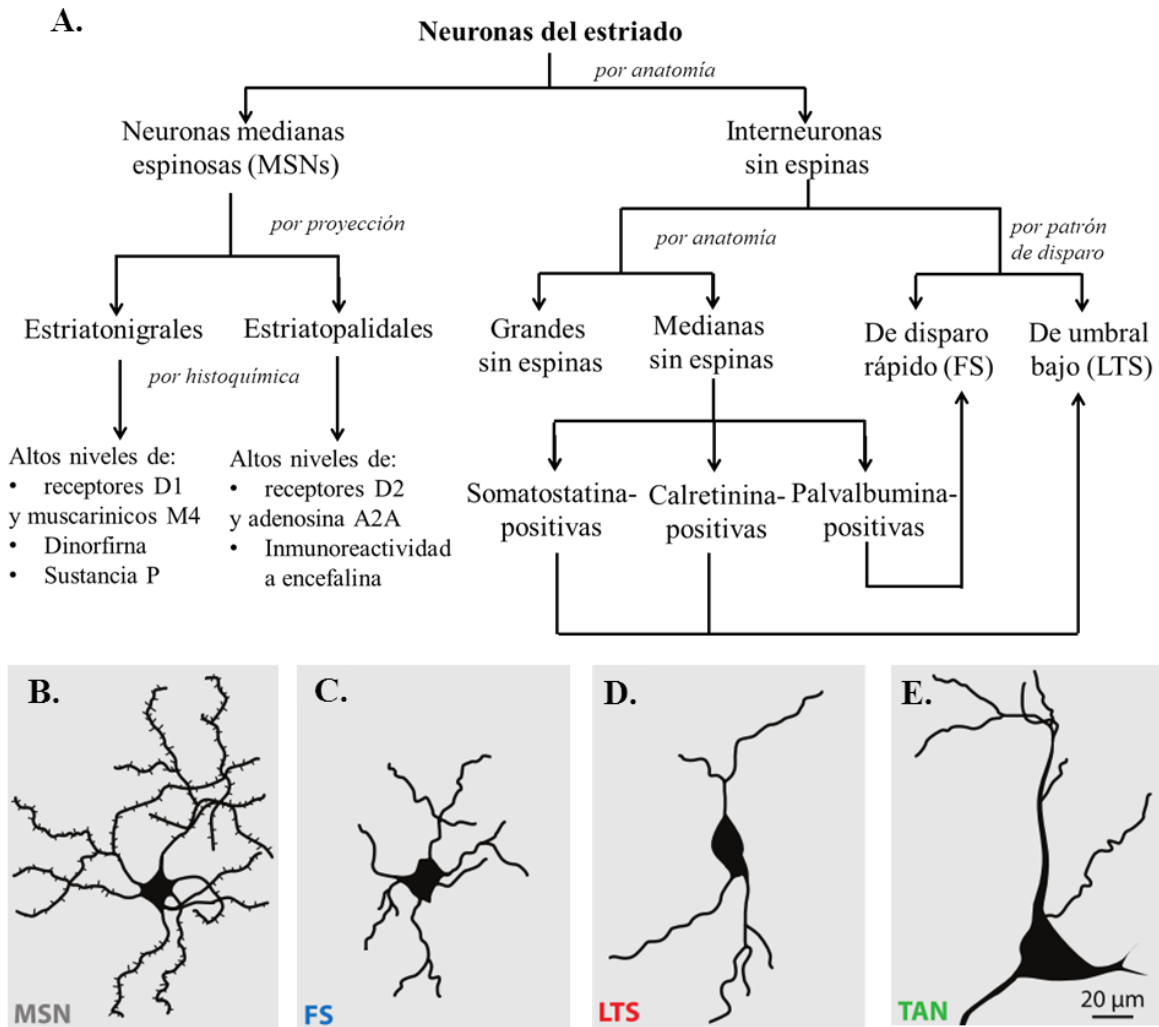
**Figura 4.-Efecto protector de la memoria ante un inhibidor de la síntesis de proteínas.** Se muestra la latencia de retención (memoria de largo plazo) de animales entrenados en la tarea de EI con un choque eléctrico moderado e intenso, a los cuales se les administro anisomicina (ANI) o la solución vehículo (VEH) en la región anterodorsal del estriado. Modificado de González-Franco et al., en preparación.

## 2. Estriado

El estriado (STR) es la estructura aferente principal de los ganglios basales. Esta estructura es clave para los procesos de aprendizaje y memoria, y también está relacionada con el control de la postura y el movimiento (Albin, Penney, & Young, 1983; Kreitzer, 2009). En los mamíferos superiores, el cuerpo estriado comprende el núcleo caudado, el putamen y el núcleo accumbens (Gerfen & Bolam, 2017b). En los roedores, el STR, a pesar de estar formado por estas regiones se estudia como una entidad única dado que el tejido no muestra una clara división en su citoarquitectura.

### 2.1 Tipos de células en el estriado

Las neuronas del estriado han sido caracterizadas bajo los criterios de anatomía, histoquímica y fisiología (Figura 5A). Las neuronas del estriado se dividen principalmente en dos: neuronas medianas espinosas (MSNs) e interneuronas sin espinas (Figura 5B). Las neuronas medianas espinosas representan la mayoría de la población en el estriado (aproximadamente el 95%) las cuales están distribuidas de manera casi homogénea y son GABAérgicas (Kemp & Powell, 1971).



**Figura 5.-Tipo de neuronas en el estriado.** A. Diagrama de árbol de tipos de neuronas e interneuronas en el estriado, clasificadas bajo los criterios de anatomía, proyección, histoquímica y patrón de disparo. B. Neurona mediana espinosa (MSNs), C. Interneurona de disparo rápido (FS), D. Interneurona de disparo de umbral bajo (LTS). E. Interneurona colinérgica (TAN). Modificado de Kreitzer (2009).

Usando la técnica de transporte axonal, se estableció que las MSNs son las neuronas de proyección del estriado (Grofová, 1975). Las MSNs dependiendo de sus proyección se dividen en estriatonigrales (vía directa) y estriatopalidales (vía indirecta), y su activación es modulada diferencialmente por la dopamina (DA) y la acetilcolina (ACh) (Shen et al., 2007; Surmeier, Ding, Day, Wang, & Shen, 2007).

Las neuronas que conforman la población restante en el estriado son las interneuronas (Bishop, Chang, & Kitai, 1982). Las interneuronas distribuyen sus axones dentro del STR,

la mayoría de los cuales establecen contacto sináptico con las MSNs (Gerfen & Wilson, 1996).

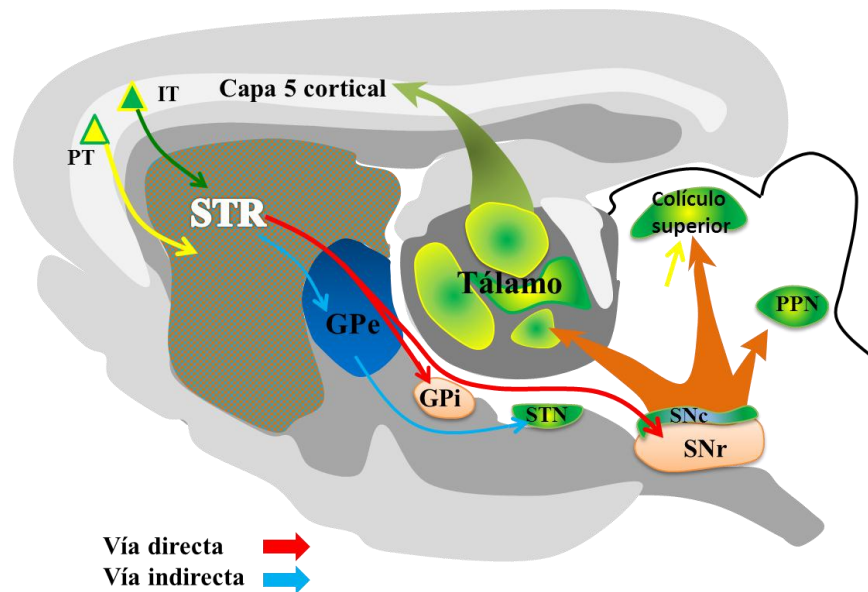
Las interneuronas sin espinas se pueden clasificar en interneuronas grandes sin espinas (Figura 5E) e interneuronas medianas sin espinas, las cuales usan acetilcolina y GABA como su neurotransmisor, respectivamente (Bishop et al., 1982; Kawaguchi, Wilson, Augood, & Emson, 1995; Kita, 1993). Las interneuronas medianas sin espinas pueden ser divididas en parvalbumina-positivas, somatostatina-positivas, neuropéptido Y, óxido nítrico sintetasa positivas y calretinina-positivas.

Las interneuronas sin espinas también se pueden clasificar por su patrón de disparo de potencial de acción en interneuronas de disparo rápido (FS) (Figura 5C) e interneuronas de umbral bajo (LTS) (Figura 5D). Las interneuronas parvalbumina-positivas presentan tasas de disparo rápido de manera sostenida por lo cual se clasifican como FS, mientras que las somatostatina-positivas y las calretinina-positivas tienen tasa de disparo menores, así que se clasifican como LTS (Kreitzer, 2009).

## **2.2 Conectividad**

El estriado es un punto de convergencia de entradas excitatorias glutamatérgicas (Kitai, Kocsis, Preston, & Sugimori, 1976) provenientes de la neocortezas (Hattori, McGeer, & McGeer, 1979) y el tálamo (Lacey, Bolam, & Magill, 2007). Las neuronas del STR tienen una salida de tipo inhibitoria (Deniau, Feger, & Le Guyader, 1976), las cuales usan GABA como su neurotransmisor principal (Yoshida & Precht, 1971).

Las neuronas de proyección estriatales forman parte de una de dos vías, la directa y la indirecta. El sistema de proyección directa está conformado por neuronas que proporcionan información directamente a las neuronas del segmento interno del globo pálido (GPi) y la sustancia nigra pars reticulata (SNr). El sistema de proyección indirecto está conformado por neuronas con proyecciones hacia el segmento externo del globo pálido (GPe), las cuales proyectan de regreso al estriado, a las neuronas que conforman parte del sistema directo (Figura 6) (Gerfen, Paletzki, & Heintz, 2013). En términos generales, la actividad de estas vías puede verse como un sistema de regulación contrabalanceado o antagonista de la regulación de las salidas de los núcleos basales (Gerfen & Bolam, 2017a).



**Figura 6.- Diagrama de circuitos principales en los núcleos basales en un plano sagital.** Las neuronas cortico-estriatales intratelencefálicas (IT), proporcionan entradas bilaterales al estriado, y las neuronas piramidales del tracto cortico estriatal (PT), proyectan su axón al estriado, el tálamo, el núcleo subtalámico (STN), el colículo superior (SC), el puente de Varolio y la médula espinal. Las neuronas de proyección del estriado se clasifican en dos subtipos, de proyección directa e indirecta. La vía directa proporciona entradas directas al segmento interno del globo pálido (GPi) y la sustancia nigra pars reticulata (SNr). La vía indirecta se proyecta hacia el segmento externo del globo pálido (GPe), que se conecta indirectamente a través del STN al GPi y al SNr. Las neuronas GABAérgicas en el GPi y SNr, proporcionan una entrada inhibitoria al tálamo, SC y el núcleo pedunculopontino (PPN). Modificado de Gerfen et al. (2013).

Además de los circuitos de proyección compuesto por las neuronas del estriado, hay una serie de conexiones adicionales dentro de los núcleos basales que forman parte de otros sistemas de retroalimentación. El sistema dopaminérgico nigroestriatal es uno de estos; este sistema está formado por las neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra que proyectan de regreso al estriado. También existen otros circuitos de retroalimentación formados por las proyecciones desde el globo pálido al estriado, desde el núcleo subtalámico hasta el globo pálido y el estriado, y desde el tálamo hasta el estriado. Tales circuitos de retroalimentación contribuyen significativamente a la función de los ganglios basales (Gerfen & Wilson, 1996).



### **2.3 Regionalización funcional del estriado y su participación en la consolidación de la memoria**

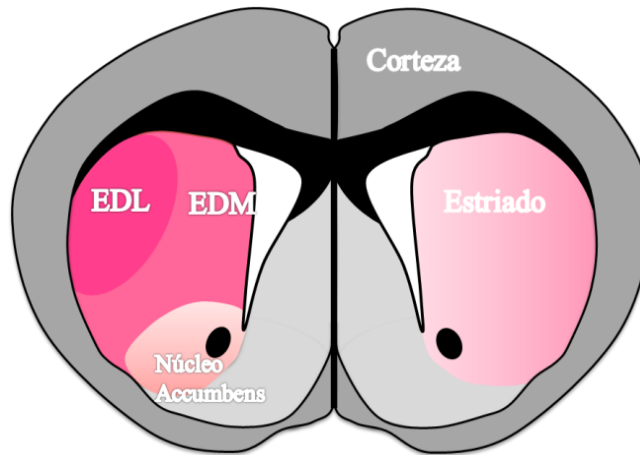
Investigaciones realizadas en las pasadas tres décadas ha indicado un papel claro de la participación del estriado en los procesos de aprendizaje y memoria (Packard & Knowlton, 2002). Mishkin y colaboradores propusieron la hipótesis de que el estriado participa en los procesos de tipo estímulo-respuesta (S-R) y en el aprendizaje de hábitos (Mishkin & Petri, 1984). Un apoyo directo a esta hipótesis fue proporcionada en un experimento empleando la inactivación localizada del estriado y su efecto en el aprendizaje de dos protocolos del laberinto radial (Packard, Hirsh, & White, 1989). Los resultados de este trabajo permitieron establecer la participación del estriado en la memoria de tipo procedimental.

Las diferentes regiones del estriado pueden operar de una manera bastante independiente para mediar los diferentes tipos de memoria. El estriado se divide de manera clásica en una parte dorsal de naturaleza sensomotora y una ventral la cual procesa información del sistema límbico, pero esta distinción no ofrece la mejor percepción de la participación regional del estriado en la memoria (Voorn, Vanderschuren, Groenewegen, Robbins, & Pennartz, 2004).

Existe una participación clara y diferencial de las regiones *dorsal* y *ventral* del estriado con respecto a sus funciones cognitivas (Voorn et al., 2004). La región dorsal del estriado se puede subdividir en la región lateral y medial (Figura 7). La región *dorsolateral* del estriado (EDL), la cual recibe aferencias corticales de la neocorteza sensomotora, participa en el aprendizaje procedimental de tipo estímulo-respuesta (S-R) (Figura 8) (Packard & Knowlton, 2002).

La región *dorsomedial* del estriado (EDM), recibe información sensorial, ejecutiva y afectiva de la neocorteza, el hipocampo y la amígdala, respectivamente. Esta región tiene una participación en el aprendizaje espacial; sin embargo, la complejidad de la tarea dicta el porcentaje de participación de esta región (Devan, Hong, & McDonald, 2011). El desempeño de tareas que dependen de la navegación aloctrica es afectado de manera más significativa al provocar una lesión en el hipocampo que una lesión en el EDM (Devan & White, 1999). En contraste tareas que dependen de respuestas de navegación compleja

(ejemplo; laberinto en T de 14 brazos) son más sensibles a una lesión en el EDM que a lesiones hipocámpales (Figura 8) (Pistell et al., 2009).

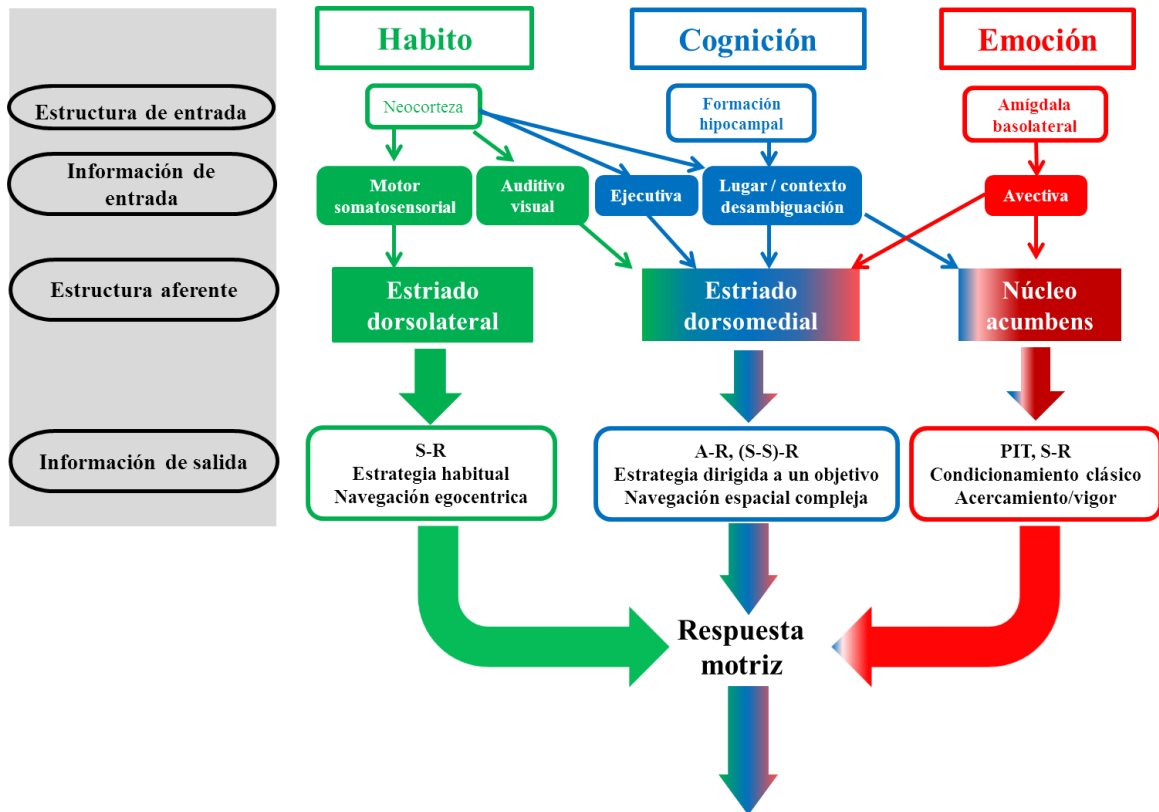


**Figura 7.- Representación de corte coronal de cerebro de roedores mostrando la corteza y el cuerpo estriado.** En el hemisferio izquierdo se muestran ilustrados las regiones dorsomedial (EDM), dorsolateral (EDL) y el núcleo accumbens. En el hemisferio derecho se muestra la organización de tipo parche-matriz (en color rosado los parches estriatales). Modificado de Kreitzer (2009).

El área *ventral* del estriado (EV), recibe una entrada robusta de las estructuras límbicas, como la amígdala basolateral y el hipocampo (Groenewegen, der Zee, te Kortschot, & Witter, 1987; Kelley & Domesick, 1982). Se considera que esta región sirve como una interfase límbica motora, en la cual la información límbica es integrada y usada para guiar la conducta con respecto a los estímulos presentados (Mogenson, Jones, & Yim, 1980; Pennartz, Groenewegen, & Lopes da Silva, 1994). Se le atribuye participación en la adquisición de tareas con componente espacial alocéntrico y una fuerte participación de procesamiento de sistema de recompensa (Figura 8) (Hollerman & Schultz, 1998; Rinaldi, Oliverio, & Mele, 2012).

Estudios en los que se han empleado métodos bioquímicos también han demostrado la existencia de tal división en el papel funcional regional del estriado (Goodman & Packard, 2017). Estudios en los que se mide la actividad de pCREB, c-Fos y c-Jun (factores de transcripción de genes de expresión inmediata) como indicadores de la actividad neuronal, han mostrado la participación diferencial de las regiones dorsomedial y dorsolateral del estriado en tareas cuya memoria es de tipo estímulo-respuesta, no así espacial (Colombo, Brightwell, & Countryman, 2009; Teather, Packard, Smith, Ellis-Behnke, & Bazan, 2005).

También se ha estudiado la existencia de una correspondencia entre la activación de la vía genómica de la región ventral del estriado con pruebas conductuales de alto valor emocional y con la creación de memorias de tipo de hábito (Franklin & Druhan, 2000).



**Figura 8.- Sistemas de memoria en el estriado.** El diagrama muestra una versión simplificada de los circuitos que se integran en el estriado los cuales participan en los procesos de aprendizaje y memoria. El estriado recibe aferencias de las regiones corticales y subcorticales de manera segregada y crean tres sistemas de memoria anatómicamente distintos. A-R, acción-resultado; PIT, transferencia pavloviana-instrumental; S-R, estímulo-respuesta; (S-S)-R, estrategias de S-R de orden superior; S-O, estímulo-resultado) Modificada de Goodman & Packard, 2017.

### 3. Cambios moleculares en la consolidación de la memoria

El proceso de consolidación de la memoria requiere de diversos cambios moleculares en las neuronas; tales cambios reclutan rutas específicas de señalización usando segundos mensajeros, los cuales activan la transcripción de proteínas, un requisito fundamental para la formación de la memoria a largo plazo (Alberini, 2009; Alberini & Kandel, 2014; Johansen, Cain, Ostroff, & Ledoux, 2011). Consistente con esta idea, numerosos estudios han demostrado que se puede impedir la formación de una memoria de largo plazo en una

gran variedad de tareas sí se bloquea el proceso transcripcional o el traduccional (Agranoff & Klinger, 1964; Casadio et al., 1999; Flexner, Flexner, Stellar, Roberts, & Haba, 1962; Hernandez & Abel, 2008; Warburton et al., 2005; Worley, Cole, Saffen, & Baraban, 1990; Yin, Del Vecchio, Zhou, & Tully, 1995).

La neuroquímica de la consolidación de la memoria se ha estudiado principalmente en el hipocampo, pero también en otras estructuras durante las últimas tres décadas. Estos estudios han generado una imagen general de los procesos intracelulares necesarios para la consolidación de la memoria (Korte & Schmitz, 2016).

Los principales hallazgos bioquímicos en el hipocampo sobre la consolidación de la memoria se han obtenido usando la tarea de evitación inhibitoria, y han implicado una participación concertada tanto de la actividad de receptores de membrana como de ciertas familias de proteínas quinasas (Izquierdo, Furini, & Myskiw, 2016). La consolidación de la memoria implica la activación temprana de los receptores glutamatergicos ionotrópicos AMPA y NMDA, así como receptores metabotrópicos. (Bliss & Collingridge, 1993; Riedel, Platt, & Micheau, 2003). CaMKII, PKC, PKA y ERKs son las cuatro grandes familias de quinasas que se han implicado en los procesos intracelulares para la formación de la memoria (Izquierdo et al., 2006)

La activación de los receptores glutamatergicos (ionotrópicos y metabotrópicos) incrementa la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular, seguida por una mayor actividad de la proteína quinasa calmodulina II (CaMKII) (Cammarota, Bernabeu, Levi de Stein, Izquierdo, & Medina, 1998; Carew & Sutton, 2001) y de la proteína quinasa C (PKC) de la familia dependiente de calcio (Kleschevnikov & Routtenberg, 2001; Paratcha et al., 2000). Esto coincide con un aumento de la fosforilación y actividad de la proteína asociada al crecimiento 43 (GAP-43) implicada en la liberación de glutamato en los sinaptosomas, evento que ha sido relacionado con la consolidación de la memoria (Cammarota et al., 1997; Colley & Routtenberg, 1993). También se ha encontrado un aumento en la actividad de la proteína quinasa A (PKA) después del entrenamiento en la tarea de evitación inhibitoria y exploración de campo abierto (Igaz, Bekinschtein, Vianna, Izquierdo, & Medina, 2004; Roberson et al., 1999; Vianna, 2000; Vianna et al., 2000) y de otras rutas de señalización como la PKC, MAPK y CaMKIV que convergen en la activación de varios

factores de transcripción (Alberini, 2009; Kida & Serita, 2014), lo cual propicia la transcripción de nuevas proteínas, evento que se ha propuesto como esencial para la consolidación de la memoria (Kandel, 2001).

### **3.1 Factores de transcripción**

La transcripción de los genes es el primer paso regulador en la expresión génica y es un requisito molecular para la formación de una memoria de largo plazo. Este es un proceso altamente regulado que involucra la acción concertada de muchas proteínas, algunas de las cuales son esenciales para los procesos basales de la transcripción, mientras que otras los factores de transcripción “up-stream” controlan la activación o represión selectiva de genes específicos (Alberini, 2009; Kida & Serita, 2014).

Numerosos estudios han demostrado que para una gran variedad de paradigmas conductuales el bloqueo de los mecanismos *transcripcionales* y *traduccionales* impiden la consolidación de la memoria (Agranoff & Klinger, 1964; Costa-Mattioli et al., 2005; Davis & Squire, 1984; Flexner et al., 1962; Hernandez & Abel, 2008). Adicionalmente estudios de manipulación de las señales moleculares “up-stream” a los procesos de transcripción y traducción; incluidos: el bloqueo de los receptores de NMDA, así como la inhibición de proteínas de control de señalización como la proteína quinasa A (PKA), la proteína quinasa C (PKC), CaMKII y numerosos factores de transcripción en múltiples regiones cerebrales impiden la formación de una memoria estable (Izquierdo et al., 2002; Jarome & Helmstetter, 2013; Jarome, Thomas, & Lubin, 2014; Johansen et al., 2011).

Una hipótesis interesante propone que la complejidad del comportamiento se correlaciona con el número de patrones de expresión génica que produce un organismo (Levine & Tjian, 2003). Es tentador especular que las bases de la cognición se encuentran dentro de la acción concertada de una regulación compleja de la expresión génica. La investigación de los últimos 15 años ha llevado a la conclusión de que la plasticidad sináptica y la formación de la memoria de largo plazo subyace a la activación de estos patrones de expresión génica organizados en cascadas de señalización molecular; donde factores de transcripción regulan la expresión de genes de expresión inmediata (Alberini & Kandel, 2014).

Entre las familias de los factores de transcripción “up-stream” involucrados en los procesos de plasticidad sináptica y memoria se encuentran la proteína de unión al elemento de respuesta al cAMP (CREB) (Dash, Hochner, & Kandel, 1990; Kandel, 2001), la proteína de unión del potenciador de CCAAT (C/EBP) (Chen et al., 2003; Taubenfeld, Wiig, et al., 2001; Taubenfeld, Milekic, Monti, & Alberini, 2001), la proteína de activación 1 (AP-1) (Abraham et al., 1993; Tischmeyer, Grimm, Schicknik, Brysch, & Schlingensiepen, 1994) y el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- $\kappa$ B) (Meberg, Kinney, Valcourt, & Routtenberg, 1996; Meffert & Baltimore, 2005; Merlo, Freudenthal, & Romano, 2002).

Los factores “up-stream” regulan la eficiencia de la transcripción y pueden intervenir en los diferentes pasos de este proceso, tanto promoviendo el ensamble del aparato basal de transcripción o de cofactores que interactúan con éste. La función y expresión de estos factores están regulados de manera temporal y/o se producen directamente en respuesta al entorno, y pueden participar en el proceso de transcripción como interruptores activados por una sola señal o como pequeños microprocesadores que responden a una gran variedad de señales, las cuales integran e interpretan para activar o desactivar sus genes diana (Alberini, 2009). Uno de los factores de transcripción que recluta el mecanismo basal para iniciar la transcripción es el elemento de respuesta de cAMP (CREB) cuya activación se considera un mecanismo de convergencia de varias vías de señalización (Silva, Kogan, Frankland, & Kida, 1998).

### **3.2 La fosforilación de CREB**

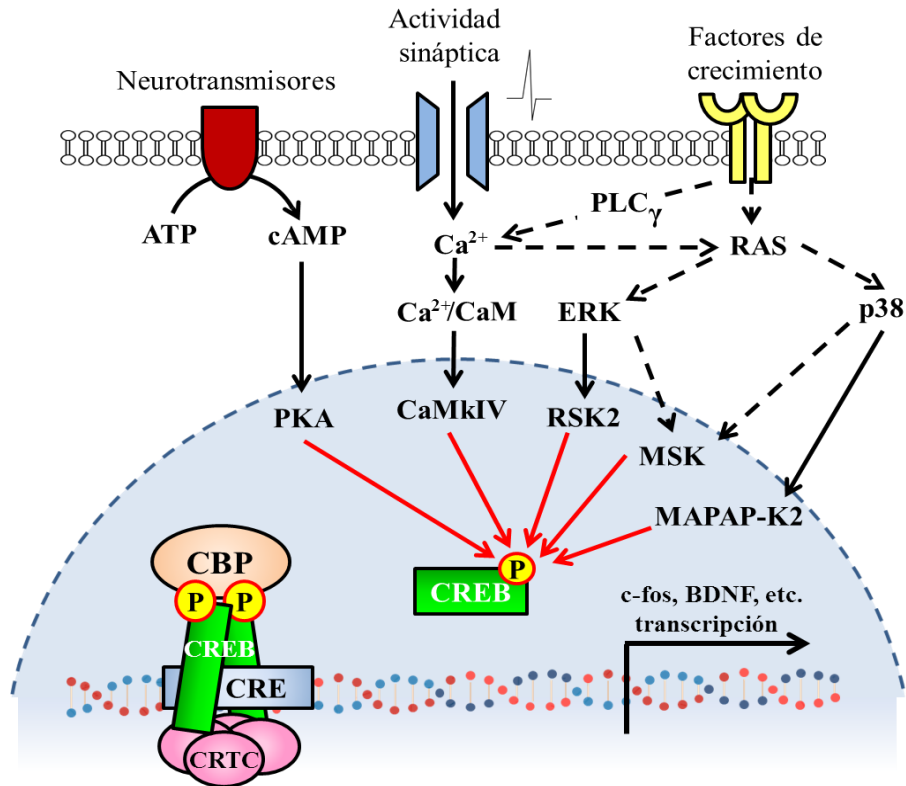
La identificación de factores de transcripción requeridos para la consolidación de la memoria ha generado basta evidencia de que uno de los mecanismos de expresión génica requeridos en este proceso para diferentes especies es el activado por los mecanismos dependientes del adenosina monofosfato cíclico (cAMP), el cual es modulado por los miembros de una familia de proteínas de unión a elementos de respuesta al cAMP conocido como CREB (cAMP response element binding) (Alberini & Kandel, 2014; Bourtchuladze et al., 1994; Dash et al., 1990).

La familia de los factores de transcripción CREB está formada por tres proteínas: CREB, CREM (modulador del elemento de respuesta a cAMP) y ATF-1 (factor activado de transcripción -1). Esta familia contiene un dominio básico C-terminal que media el anclaje con el ADN, y un zipper de leucina (bZIP) que facilita su dimerización y su unión al ADN. Estos factores pueden formar homodímeros y heterodímeros, que se unen a un sitio de regulación del ADN conocido como elemento de respuesta a cAMP (CRE) (Mayr & Montminy, 2001; Sassone-Corsi, 1995).

Las isoformas más abundantes de CREB son CREB<sub>α</sub> y CREB<sub>Δ</sub>, contienen el dominio bZIP y dos dominios ricos en glutamina, conocidos como Q1 y Q2/CAD los cuales están separados por el dominio inducible por quinasa (KID). En este dominio se encuentra la Ser 133, la cual al ser fosforilada provoca que el dominio KID se convierta en blanco de unión para la proteína de unión de CREB (CBP) (Chrivia et al., 1993). El CBP se une a la serina 133 fosforilada en el dominio KID y se cree que esta interacción funciona como el inicio de la inducción de la expresión génica (Parker et al., 1996).

Se ha identificado a la serina 133 en el dominio de la familia de proteínas CREB como el sitio de regulación clave; el cual debe estar fosforilado para que CREB pueda funcionar como un factor de transcripción (Gonzalez & Montminy, 1989). En neuronas, la fosforilación de CREB es inducida por una gran variedad de estímulos externos los cuales median procesos como el desarrollo del sistema nervioso, el ritmo circadiano, la neuroprotección, la plasticidad sináptica, el aprendizaje y la memoria (Lonze & Ginty, 2002).

La fosforilación de CREB puede ser iniciada por una variedad de procesos de señalización, incluido el incremento intracelular de Ca<sup>2+</sup> por la activación de canales de iones regulados por voltaje o por ligandos; como los receptores de NMDA, un incremento en el cAMP por medio de la activación de los receptores acoplados a las proteínas G, o la activación de receptor tirosina quinasa por medio de factores de crecimiento. El factor de transcripción CREB es un activador central que puede integrar una gran variedad de estímulos (Figura 9) (Alberini, 2009).



**Figura 9.- Visión general de las vías de señalización que convergen en la fosforilación de CREB.** Los neurotransmisores excitatorios extracelulares, los ligandos para GPCR y los factores de crecimiento neuronal se encuentran entre los estímulos que activan las vías de señalización que conducen en la fosforilación de CREB. Se ha implicado múltiples proteínas quinasas dependientes de estímulos externos como mediadoras de la activación de CREB y existe un alto grado de convergencia entre las vías de señalización. Las proteínas quinasas que convergen en la activación de CREB incluyen PKA, CaMKIV, MAPKAP K2 y miembros de las familias RSK y MSK. Modificado de Kida, et al. 2014.

La quinasa dependiente de cAMP (PKA) se considera como el sistema clásico que describe la fosforilación de CREB (Gonzalez & Montminy, 1989). La actividad de la proteína PKA está regulada por cambios en los niveles de cAMP, los cuales son elevados por medio de la activación de la adenilato ciclasa que ocurre tras el acoplamiento de ligandos específicos a receptores acoplados a proteínas G (GPCR). Una vez activada PKA, la subunidad catalítica es transportada al núcleo, donde fosforila a CREB (Montminy, 1997; Sassone-Corsi, 1995).

Las calcio calmodulinas que pueden activar *in vitro* a CREB son la CaMKI, CaMKII y la CaMKIV (Dash, Karl, Colicos, Prywes, & Kandel, 1991; Sheng, Thompson, & Greenberg, 1989; West et al., 2001). Se ha identificado que la proteína CaMKIV es activada por  $Ca^{2+}$ ,



y fosforila a CREB después de una despolarización de la membrana celular (Anderson & Means, 2002)

Los factores de crecimiento, como el factor de crecimiento nervioso (NGF) y factor de crecimiento epidérmico (EGF), parecen tener la capacidad de disparar la activación de cascadas de señalización paralelas que convergen en la activación de CREB por medio de la activación de un solo receptor (Bonni et al., 1999; De Cesare, Jacquot, Hanauer, & Sassone-Corsi, 1998; Xing, Ginty, & Greenberg, 1996). Estos factores modulan su señal por medio del receptor de la quinasa tirosín-quinasa, el cual por medio de unión del ligando y la dimerización, activan varias cascadas de señalización (Patapoutian & Reichardt, 2001).

### **3.3 CREB fosforilado y su participación en la consolidación de la memoria**

Una gran cantidad de trabajos han demostrado la necesidad de la activación de procesos “up-stream” a la activación de CREB, para la consolidación de la memoria. Una de estas vías de señalización “up-stream” la cual ha sido ampliamente caracterizada es la cascada de señalización de cAMP la cual se ha implicado en los procesos de formación de memoria a largo plazo (Bourtchuladze et al., 1994; Lamprecht, Hazvi, & Dudai, 1997; Yin et al., 1994, 1995).

Al mismo tiempo varios estudios de la activación de mecanismos transcripcionales (procesos “down-stream” de la activación de CREB) han mostrado que pCREB regula la expresión de genes de expresión inmediata (GEIs), entre ellos factores de transcripción como c-Fos (Sheng & Greenberg, 1990) y Zif268 (Christy, Lau, & Nathans, 1988), moléculas efectoras productos de la expresión de GEIs como Arc/Arg3.1 (Kawashima et al., 2009), y de factores de crecimiento como el factor neurotrópico derivado del cerebro (BDNF) (Shieh, Hu, Bobb, Timmusk, & Ghosh, 1998), todos los cuales también están implicados en el proceso de consolidación de la memoria (Kida & Serita, 2014).

A pesar de que el factor de transcripción CREB es ampliamente expresado y fácilmente activado, existen diferencias cinéticas en sus perfiles de expresión lo cual lleva a la conclusión de que CREB funciona a través de un mecanismo más complejo que un simple

interruptor y que este factor modula diversas respuestas de carácter específico, las cuales culminan en la transcripción de genes determinados (Lonze & Ginty, 2002).

Se ha encontrado un aumento de la fosforilación de CREB en el hipocampo después del entrenamiento en múltiples tareas como la de campo abierto (Moncada & Viola, 2006; Vianna, 2000; Winograd & Viola, 2004), condicionamiento de miedo al contexto (Impey et al., 1998; Stanciu, Radulovic, & Spiess, 2001; Trifilieff et al., 2006), entrenamiento en el laberinto radial (Mizuno et al., 2002), laberinto elevado en cruz (Colombo et al., 2009) y evitación inhibitoria (Bernabeu et al., 1997; Cammarota et al., 2000).

En el trabajo de Trifilieff (2006) se usaron dos protocolos de condicionamiento al miedo, condicionamiento de miedo al tono y condicionamiento de miedo al contexto, los cuales implican la participación del hipocampo de una manera diferencial. Analizaron tejido del hipocampo (región CA1) para la detección de la forma fosforilada de la proteína CREB. Los condicionamientos indujeron eventos moleculares diferentes sobre la cinética de activación de la proteína; el condicionamiento al tono provocó una activación inmediata del factor de transcripción, disminuyendo la presencia de fosforilación con respecto al tiempo. El condicionamiento al contexto generó la máxima tasa de fosforilación después de una hora del entrenamiento; estos resultados apoyan la idea de una marca molecular única por tipo de aprendizaje (Trifilieff et al., 2006).

Por lo tanto, se puede esperar que cada paradigma de aprendizaje resultase en un patrón de señalización molecular específico que podría caracterizarse por la vía de señalización implicada o por la cinética de activación de la ruta de señalización crítica (Trifilieff et al., 2006)

En varios trabajos se ha reportado que el entrenamiento en diversas tareas puede provocar cambios bidireccionales en la expresión génica, sugiriendo que la formación de la memoria requiere tanto de un aumento como de una disminución en la transcripción de genes en las neuronas (Gupta-Agarwal et al., 2012; Kerimoglu et al., 2013). Estos resultados apoyan la teoría de que la dinámica de regulación del ARN mensajero es un paso crítico en la consolidación de la memoria. Sin embargo, aun cuando se han implicado múltiples factores de transcripción en la consolidación de la memoria (ej. CREB), muy poco es conocido

sobre cómo es la regulación “up-stream” o “down-stream” de la transcripción en la consolidación de la memoria (Jarome et al., 2014), y tampoco se sabe si estos cambios en la regulación se conservan en el paradigma de un entrenamiento incrementado.

## **II. JUSTIFICACIÓN**

Estudios recientes se han enfocado en el efecto protector de la memoria producido por entrenamiento incrementado; específicamente se han medido los cambios plásticos en la región del estriado asociados a este tipo de entrenamiento. Recientemente, se demostró que el entrenamiento incrementado genera cambios anatómicos posinápticos en la zona dorsal del estriado de ratas, los cuales presentan un efecto específico con respecto a la intensidad del choque eléctrico administrado durante el entrenamiento en la tarea de EI. En el estriado dorsomedial la densidad de espinas dendríticas total aumenta correlativamente con el aumento del reforzador en el entrenamiento. Esta dinámica es similar en el estriado dorsomedial (EDM) con respecto a la proporción de espinas detriticas tipo hongo, las cuales han sido relacionadas con los procesos de memoria; adicionalmente la administración no contingente del estímulo aversivo no generó dichos cambios anatómicos. Estos hallazgos sugieren que el aumento de la densidad de espinas dendríticas tipo hongo en la región dorsomedial del estriado podría facilitar la activación eferente de MSNs de otras regiones del cerebro y puede explicar el efecto protector contra los tratamientos amnésicos (Bello-Medina, Flores, Quirarte, McGaugh, & Prado-Alcalá, 2016).

En otro trabajo reciente se midió la proteína asociada al citoesqueleto regulada por actividad (Arc) en el estriado de ratas sobrerreforzadas en la tarea de EI. Se encontró que las neuronas del estriado ventral, no así el dorsal, expresaron la proteína tanto en el grupo de ratas entrenadas moderadamente como en las sobrerreforzadas, teniendo una mayor expresión de la proteína este último grupo (González- Franco, Ramírez-Amaya, Joseph-Bravo, Prado-Alcalá, & Quirarte, 2017). Concluyeron que el aumento de la expresión de Arc debe estar relacionado con la mayor plasticidad sináptica, las características anatómicas y la funcionalidad de la región ventral del estriado. Además proponen que la expresión de la proteína Arc puede estar involucrada en la generación de modificaciones sinápticas robustas, tales como las que se observaron en el trabajo de Bello-Medina et al. (2016).

Debido a que se desconoce si existe una activación del mecanismo génico (proceso “up-stream” de transcripción) durante la consolidación de la memoria de largo plazo en un modelo de entrenamiento incrementado, así como su participación en los cambios plásticos asociados, en el presente trabajo se estudió la fosforilación de la proteína CREB en la serina 133 (pCREB) en el estriado de ratas, entrenadas en la tarea de EI con un entrenamiento moderado o incrementado.

### **III. OBJETIVOS**

#### **GENERAL**

Cuantificar la proporción de núcleos neuronales del estriado que presentan la fosforilación de CREB en la serina 133 (pCREB) en condiciones de un entrenamiento moderado e incrementado en la tarea de evitación inhibitoria.

#### **ESPECÍFICOS**

Determinar la intensidad de choque eléctrico correspondiente a un entrenamiento moderado e incrementado en la tarea de evitación inhibitoria.

Cuantificar la proporción de núcleos neuronales en el estriado dorsal y ventral que presentan pCREB en condiciones de un entrenamiento moderado e incrementado en la tarea de evitación inhibitoria.

### **IV. HIPÓTESIS**

Los animales entrenados con un choque incrementado (3.0 mA) presentarán una mayor resistencia a la extinción de la tarea de evitación inhibitoria que los entrenados con un choque moderado (1.0 mA).

La proporción de los núcleos neuronales pCREB positivos en el estriado ventral será mayor que en el estriado dorsal de los animales entrenados en la tarea de evitación inhibitoria.

La proporción de los núcleos neuronales pCREB positivos en el estriado dorsal de los animales entrenados con un entrenamiento incrementado será mayor que en los animales entrenados con un entrenamiento moderado.

La proporción de los núcleos neuronales pCREB positivos en el estriado ventral de los animales entrenados con un entrenamiento incrementado será mayor que en los animales entrenados con un entrenamiento moderado.

## **V. METODOLOGÍA**

Todos los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo a los lineamientos bioéticos del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México para el uso de animales experimentales, bajo la Norma Oficial Mexicana NOM-062- ZOO-1999 y las estipuladas en la Guide for care and use of laboratory animals del NIH (National Research Council, 2011).

### **1 Animales**

Se utilizaron 50 ratas macho de la cepa Wistar, con un peso entre 250 g y 300 g, las cuales fueron proporcionadas por el bioterio del Instituto de Neurobiología, UNAM. Los animales fueron alojados en cajas individuales de acrílico (24 x 21 x 45 cm) con agua y comida *ad libitum*. Se mantuvieron en un cuarto sono-amortiguado con temperatura controlada entre 22 y 24 °C, con un ciclo luz/oscuridad de 12:00 horas (07:00 a 19:00 h).

Una vez que los animales se habituaron al vivario del laboratorio, fueron manipulados durante una sesión diaria de 5 min, durante 3 días. La manipulación consistió en un proceso de familiarización de la rata con el experimentador. Se acarició a cada rata durante 5 min, de esta manera el animal se acostumbró a ser sujetado y desplazado. Las sesiones de manipulación tienen como objeto reducir el estrés que pueda generar el experimentador a la rata.

## **2 Tarea de Evitación inhibitoria**

### **2.1 Aparatos**

La cámara de evitación inhibitoria (EI), está compuesta por dos compartimentos del mismo tamaño (30 x 30 x 30 cm) separadas por una puerta deslizante. El primer compartimento, llamado de *seguridad*, está iluminado por un foco de 10W colocado en la tapa del compartimento y tiene una rejilla como piso. El segundo compartimento, denominado de *castigo*, es oscuro y tiene dos paredes laterales de acero inoxidable en forma de V de 30 cm de longitud, las que en su parte inferior cada una de ellas forma la mitad del piso de este compartimento, separado de la otra mitad de piso por un distancia de 1.5 cm (Figura 3).

Se puede administrar un choque eléctrico en el compartimento de *castigo*, electrificando las láminas con un estimulador de pulsos cuadrados (Grass Modelo No. S-48) acoplado a una unidad de corriente constante (Grass Modelo No. CCU-1A). La duración de la administración del estímulo, las latencias de entrada, escape y retención fueron medias automáticamente con ayuda de un controlador lógico programable (PLC SR3B101FU Schneider Electric Zelio Logic).

### **2.2 Entrenamiento**

Durante el entrenamiento la rata se colocó en el compartimento de seguridad y pasados 10 s después se abrió la puerta deslizante permitiéndole el acceso al compartimento de castigo. Una vez que el animal entró completamente al compartimento oscuro se cerró la puerta y se administró un choque de 1.0 mA o 3.0 mA durante 10 s. Transcurridos 5 s después del inicio del choque eléctrico se abrió la puerta, permitiendo al sujeto escapar al compartimento de seguridad. Una vez en el compartimento de seguridad se cerró la puerta, y la rata permaneció en tal área durante 30 s antes de ser regresada a su caja-habitación.

El tiempo que la rata tarda en entrar al compartimento de castigo se le denomina latencia de entrada y el tiempo que la rata demora en regresar del compartimento de castigo al de seguridad durante la administración del choque eléctrico se le denomina latencia de escape.

## **2.3 Extinción**

La medición de extinción se realizó a una muestra de 30 ratas, la primera sesión se hizo 24 h después del entrenamiento en la tarea de evitación inhibitoria. Se registró el tiempo transcurrido entre la apertura de la puerta y el momento en el que la rata pasó completamente al compartimento de castigo; este parámetro es conocido como latencia de retención. Las condiciones de la prueba de extinción son las mismas descritas para la sesión de entrenamiento, excepto que no se administró el choque eléctrico. La sesión se dio por terminada una vez que la rata pasó al compartimento de castigo o que transcurrieran 600 s de la colocación en el compartimento de seguridad. Se realizaron 7 sesiones de extinción a todas las ratas que conformaron el grupo experimental, con un intervalo de 24 h entre cada sesión.

## **3 Análisis histológico**

### **3.1 Tejidos cerebrales**

Un grupo de 20 ratas fueron decapitadas 1 h después del entrenamiento en la tarea de EI. Se extrajeron rápidamente los cerebros (entre 120 y 180 s) y se colocaron en un recipiente con 2-metilbutano a una temperatura de aproximadamente  $-30^{\circ}\text{C}$ , lo cual provocó el congelamiento completo del tejido y se almacenaron en un congelador a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

### **3.2 Bloques**

Con el uso de una matriz de acero inoxidable, los cerebros congelados fueron cortados y se obtuvo una rebanada coronal de tejido nervioso de ambos hemisferios de 4 mm de grosor en un eje antero-posterior, siguiendo las coordenadas del atlas de Paxinos y Watson (1998) (antero-posterior, de +3.72 a -0.12 con respecto a Bregma).

Los cortes de tejido nervioso que incluyeron el estriado de ambos hemisferios fueron colocados en un molde de plástico (Electron Microscopy) en el que se pueden colocar hasta 6 rebanadas, una vez colocados los tejidos se aplicó un medio crioprotector (OCT Tissue Tek). Al final de este procedimiento se obtuvo un bloque de cerebros. Cada bloque incluye al menos un animal de los 5 diferentes grupos experimentales.

Este procedimiento nos permite tener todos los animales de los diferentes grupos en la misma laminilla después de la crío-sección, y de esta manera podemos comparar con alta confiabilidad los resultados histológicos de los diferentes grupos de animales, reduciendo la variabilidad debida a los procedimientos histológicos.

### **3.4 Criosección**

Los bloques fueron seccionados a 20  $\mu\text{m}$  en un criostato a una temperatura entre  $-14^{\circ}\text{C}$  y  $-18^{\circ}\text{C}$ . Los tejidos fueron montados en laminillas silanizadas, que se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  una semana antes de ser procesados para inmunohistoquímica.

### **3.5 Inmunohistoquímica**

Se realizó un doble marcaje para detectar DAPI (marcador de núcleos celulares), y pCREB.

Se tomaron 3 laminillas de cada bloque, las cuales contienen el estriado, el cual fue identificado usando el atlas Paxinos y Watson (1998) (anteroposterior, de 1.67 a 0.36 con respecto a Bregma). El tejido fue fijado con paraformaldehído al 2%, con un pH 7.4, durante 8 min, se lavó con TBS (Trizma buffer solution) pH 7.0. Se bloqueó con el sistema de amplificación de tiramida (Trichostatin A TSA Perkin Elmer). Las laminillas se incubaron secuencialmente con un anticuerpo de ratón Anti pCREB (1:300) (Phospho-CREB Ser 133; Cell Signaling). Se bloqueó la acción de la peroxidasa con  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 3.3 % disuelto en metanol por 20 min.

Para detectar el anticuerpo de pCREB se utilizó un segundo anticuerpo biotinilado (1:400) contra ratón hecho en cabra (Vector). La detección de pCREB se amplificó con el sistema AB (Vector). Después de la amplificación con AB, la señal se detectó con cianina 3 (Cy3) (1:75), y se hizo una contratinción con DAPI (1:5000). Finalmente se montaron los cubre objetos con Vectashield (Vector).

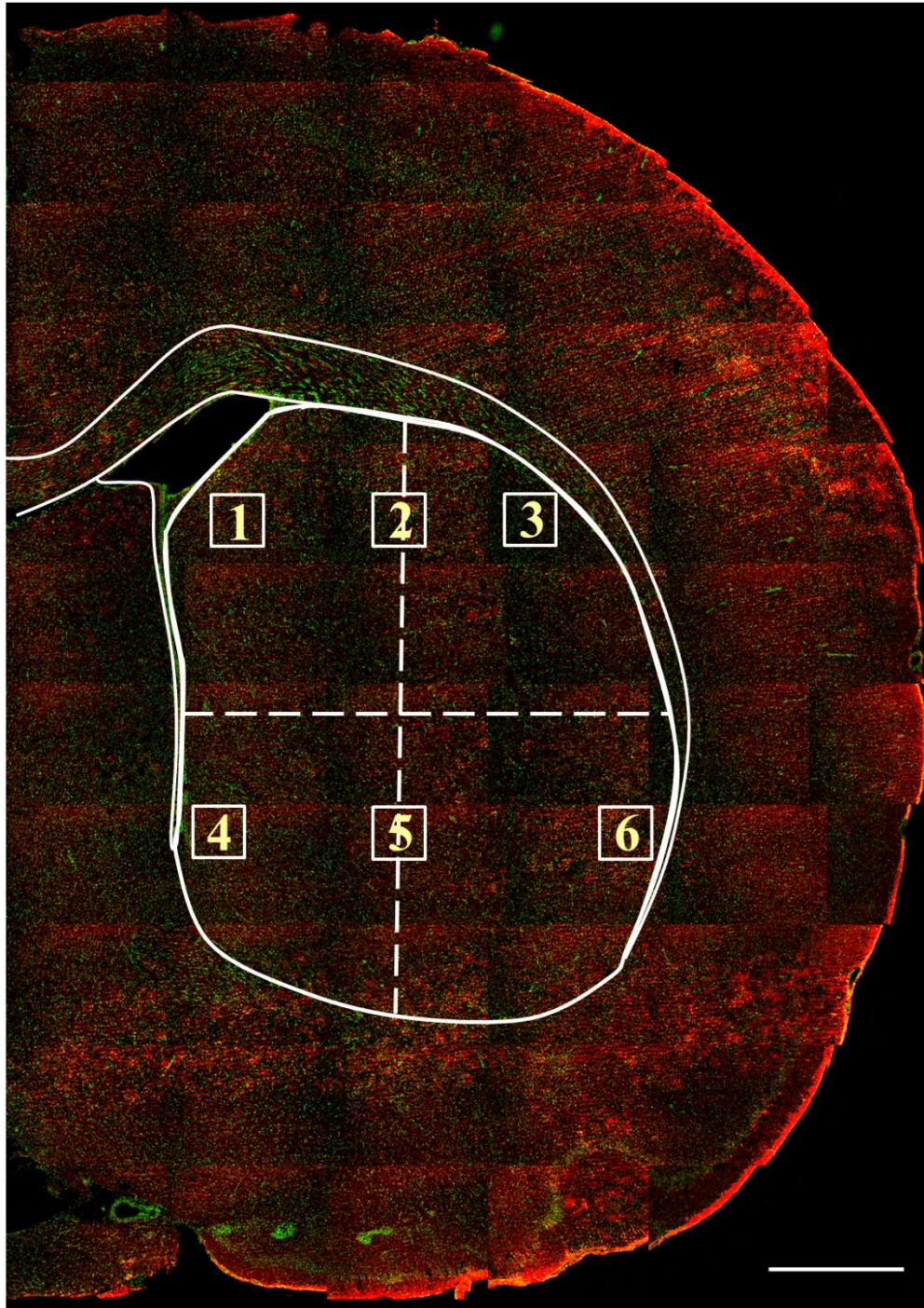


## **4 Imágenes**

### **4.1 Captura de imágenes**

Para obtener las imágenes de las diferentes regiones del estriado de cada cerebro en ambos hemisferios se utilizó un microscopio semi-confocal Apotome marca Carl Zeiss Imager Z1, con una cámara AxioCamMR3. Los parámetros para la toma de imágenes en el microscopio se definieron en cada laminilla utilizando un animal control (bioterio) como referencia y se mantuvieron estables para la captura del resto de las imágenes en la misma laminilla.

Las imágenes se obtuvieron con un objetivo de 40 x en el plano Z con un rango de 22 a 32 planos por imagen, con una distancia de 1µm entre cada plano. Se utilizó el software AxioVision 4.8 para la captura de las 6 imágenes en cada estriado derecho y al estriado izquierdo. De cada hemisferio se obtuvieron tres muestras del estriado dorsal; una de la región dorsomedial (EDM), otra de la región dorsolateral (EDL), y una más del centro de la región dorsal (EDC). De igual manera, del estriado ventral se obtuvo una muestra de la región ventromedial (EVM), otra de la región ventrolateral (EVL), y otra del centro de la región ventral (EVC) (Figura 10).



**Figura 10.- Regiones del estriado seleccionadas para la captura de imágenes.** Mosaico del estriado de la muestra tratada con el proceso de inmunohistoquímica mostrando las regiones donde se tomaron las muestras. En rojo se muestra la señal de pCREB, en verde los núcleos celulares teñidos con DAPI. Las regiones numeradas corresponden a: 1) el estriado dorsomedial (EDM), 2) el centro del estriado dorsal (EDC), 3) el estriado dorsolateral (EDL), 4) el estriado ventromedial (EVM), 5) el centro del estriado ventral (EVC), 6) el estriado ventrolateral (EVL). En blanco se superpuso un esquema modificado del Paxinos y Watson (2007) mostrando la delimitación de la región del estriado, el cuerpo calloso y un ventrículo. Barra de escala 1000  $\mu$ m.

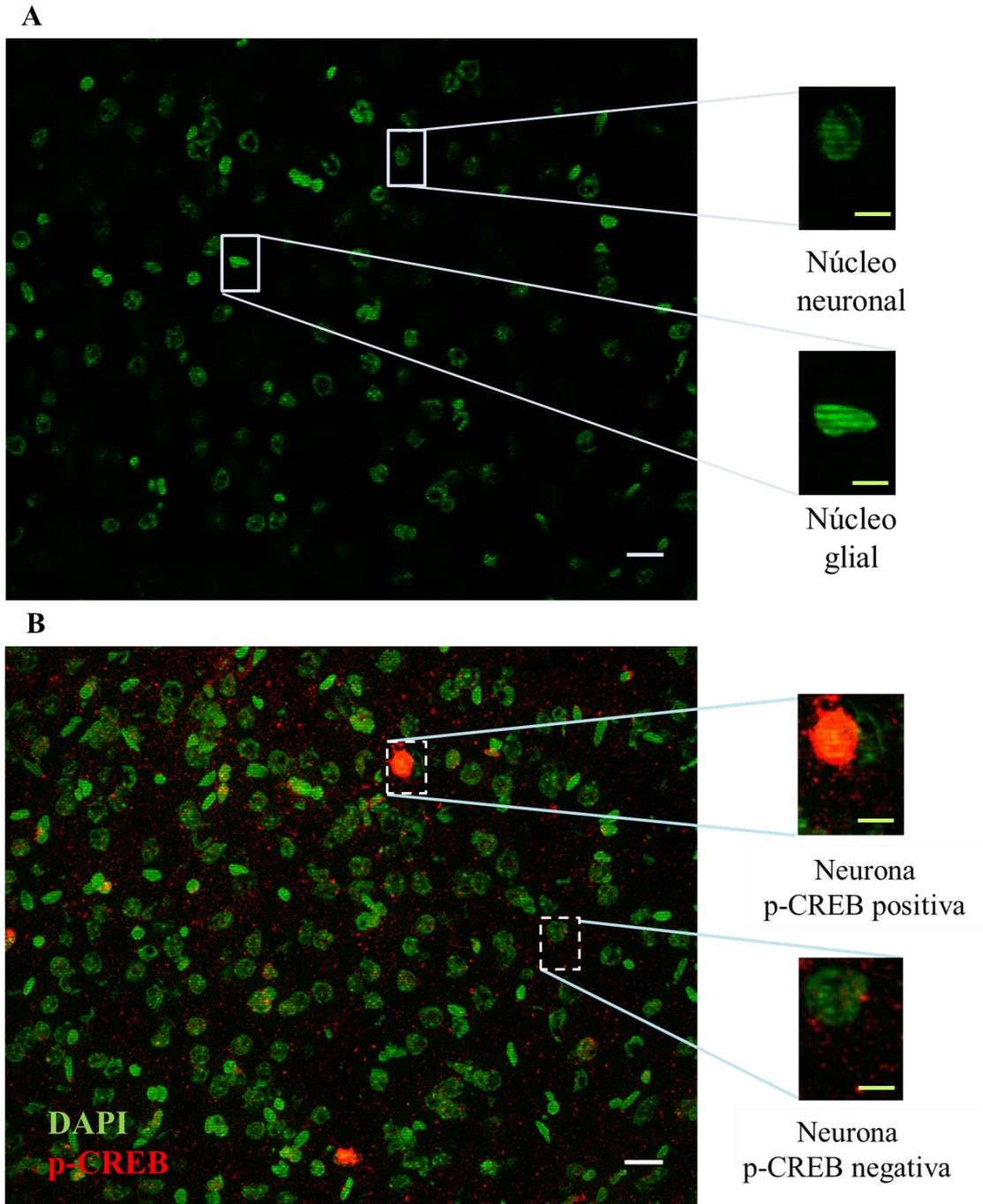
En cada animal se tomaron cuatro mediciones: la suma de las células con núcleos positivos pCREB así como la suma de todos los núcleos en las tres regiones del estriado dorsal y suma de las células con núcleos positivos pCREB así como la suma de todos los núcleos en las tres regiones del estriado ventral. Para cada animal se determinó la proporción de núcleos positivos en relación con el total de núcleos (núcleos positivos/total de núcleos). En otras palabras, de cada animal se tomaron dos datos para hacer los análisis estadísticos.

## **4.2 Análisis de imágenes**

Las imágenes se analizaron con el software libre ImageJ (Schindelin et al., 2012). A partir del plano medio de cada apilamiento de imágenes en Z, se tomaron solo el 60% (30% hacia arriba y 30% hacia debajo del plano medio) para la cuantificación de los núcleos de las neuronas estriatales teñidas con DAPI.

Se identificaron los núcleos correspondientes a neuronas y a células gliales, gracias a las marcadas diferencias morfológicas de tamaño y la densidad del empaquetamiento de ADN mostrada por la tinción de DAPI. Núcleos con un tamaño inferior que se presentaran en pocos planos y que se les apreciase densidades altas fueron catalogados como gliales y no fueron contabilizados. Los núcleos que presentaron una densidad baja (estructura porosa), un tamaño mayor y que se presentaran en al menos tres planos útiles, fueron contabilizados como núcleos neuronales, como se ha reportado previamente (Vazdarjanova, McNaughton, Barnes, Worley, & Guzowski, 2002) (Figura 11 A).

Terminado el conteo de núcleos neuronales se hizo la colocalización de las imágenes (núcleos teñidos con DAPI y la señal positiva de pCREB) y se contaron todos los núcleos neuronales previamente contados que empalmaran la señal de pCREB y DAPI; y que la señal se presentara como mínimo en 3 planos en la proyección en Z, aquellos núcleos que cubrieran con estos criterios fueron designados como pCREB positivos (Figura 11 B).



**Figura 11.- Criterios de selección para conteo celular.** A. Representación de un solo plano de la proyección en Z, se ejemplifica la distinción de núcleos neuronales de núcleos gliales por criterios morfológicos. B. Representación en dos planos de la proyección en Z de la imagen tridimensional, se muestra en rojo la proteína pCREB y en verde los núcleos celulares teñidos con DAPI, a la derecha se muestran ejemplos de núcleos neuronales positivos y negativos para la señal de pCREB. Barras de escala: en blanco, 20  $\mu\text{m}$ ; en amarillo, 5  $\mu\text{m}$ .

## **5 Análisis estadístico**

### **5.1 Conducta**

El análisis de los resultados conductuales empleó estadística no paramétrica, debido a que se estableció un corte arbitrario de 600 s durante la prueba de retención, impidiéndose así una distribución normal de los datos. Se utilizó la prueba de análisis de varianza de Kruskal-Wallis para comparar, en forma independiente, las latencias de entrada, escape y retención, y en caso de encontrar diferencias significativas se utilizó la prueba de U de Mann-Whitney para hacer comparaciones entre pares de grupos.

Para cada grupo del experimento de extinción de la tarea de EI, se utilizó una prueba de Friedman para analizar las latencias de retención a lo largo del tiempo, durante las siete sesiones evaluadas. En el caso de haberse encontrado diferencias significativas se utilizó la prueba de Wilcoxon para comparar cada dos sesiones entre sí en cada grupo. Para hacer comparaciones entre dos grupos en cada sesión de extinción se utilizó la prueba U de Mann-Whitney.

### **5.2 Histología**

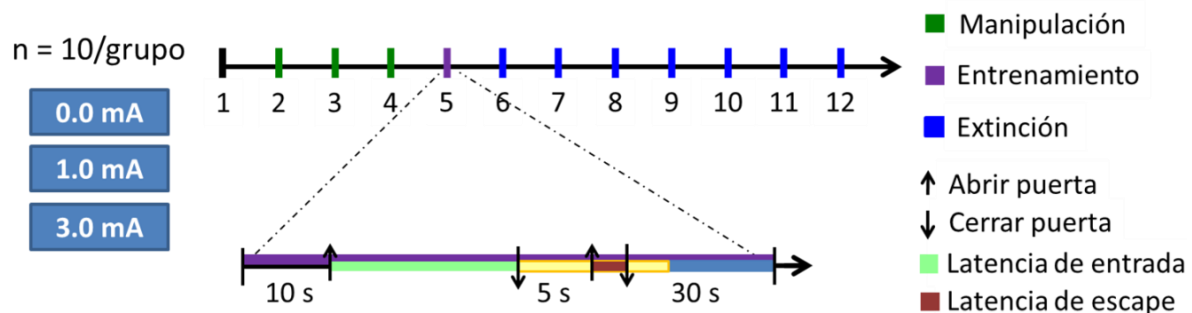
Para determinar las diferencias en la proporción de núcleos positivos se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una o dos vías según el caso. Cuando el análisis de varianza fuera significativo se utilizó el post-hoc de Bonferroni para comparar los grupos experimentales.

## **6 Diseño experimental**

Se utilizaron 50 ratas que se dividieron en dos grupos. Ambos grupos fueron entrenados en la tarea de EI; las ratas del primer grupo se usaron en un primer experimento en el que se analizó la conducta después del aprendizaje de la tarea de EI, y las ratas del segundo grupo se usaron en un segundo experimento con el objetivo de estudiar los cambios moleculares en cada región del estriado con la técnica de inmunohistoquímica.

## 6.1 Curva de extinción de ratas entrenadas con diferentes intensidades de choque eléctrico

En la primera parte del diseño experimental se emplearon 30 ratas macho de la cepa Wistar, las cuales fueron manipuladas durante tres días, y 24 h después de la última manipulación, fueron entrenadas en la tarea de evitación inhibitoria. Las ratas fueron asignadas de forma aleatoria a tres grupos experimentales. El primer grupo las ratas fueron entrenadas sin la administración de choque eléctrico (0.0 mA). En el segundo grupo, las ratas fueron entrenadas con un choque eléctrico moderado (1.0 mA) y el tercer grupo las ratas fueron entrenadas con un choque eléctrico alto (3.0 mA). El tamaño de la muestra fue de 10 ratas por grupo. El día del entrenamiento se midió las latencias de entrada y de escape. Se midió la extinción, es decir la latencia de retención pasadas 24 h del entrenamiento y así sucesivamente durante siete días consecutivos sin la administración choque eléctrico (Figura 12).

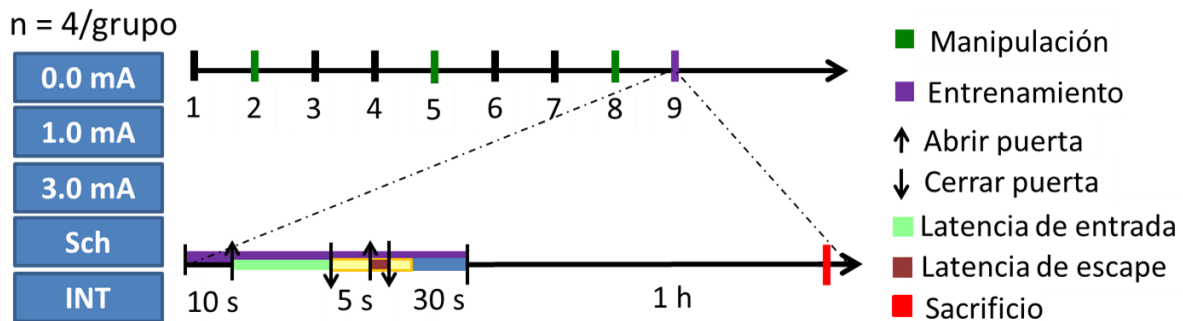


**Figura 12.- Línea temporal del experimento de extinción.** Después de un día de habituación al bioterio, las ratas fueron manipuladas tres consecutivos durante sesiones de 5 min cada una. El día consecutivo a la última manipulación las ratas fueron entrenadas en la tarea de EI, se midió la latencia de entrada y latencia de escape. Siete días consecutivos las ratas se sometieron a pruebas de extinción, en las que se midió la latencia de retención.

## 6.2 Efecto del entrenamiento moderado e incrementado sobre la fosforilación de CREB en la serina 133

En la segunda parte del diseño experimental se utilizaron 20 ratas macho de la cepa Wistar que fueron distribuidas aleatoriamente en cinco grupos experimentales. A dos grupos de ratas se les administró un choque eléctrico durante el entrenamiento de la tarea de EI; un primer grupo recibió un choque de 1.0 mA (1.0 mA; n = 4), mientras un segundo grupo

recibió un choque de 3.0 mA (3.0 mA; n = 4). Un tercer grupo de ratas fue entrenado en la tarea de evitación inhibitoria sin la administración del choque eléctrico (0.0 mA; n = 4) con el fin de tener un grupo únicamente expuesto al contexto. En un cuarto, los sujetos fueron colocados en el compartimento de castigo donde recibieron un choque eléctrico 3.0 mA (Sch 3.0 mA; n = 4) sin ser entrenados en la tarea de EI. Los sujetos del quinto grupo únicamente permanecieron en condiciones de bioterio (BIO; n = 4). Todos los animales fueron sacrificados por decapitación una hora después del entrenamiento y el grupo BIO fue sacrificado el mismo día en el que se sacrificaron a las ratas de los demás grupos (Figura 13).



**Figura 13.- Línea temporal del experimento de fosforilación de CREB en un entrenamiento moderado e intenso.** Después de un día de habituación al bioterio, las ratas fueron manipuladas tres consecutivos durante sesiones de 5 min cada rata. El día posterior a la última manipulación las ratas fueron entrenadas en la tarea de EI, se midió la latencia de entrada y escape. Una hora después los sujetos fueron sacrificados por medio de decapitación.

Los tejidos cerebrales de este experimento fueron usados para el análisis histológico, se seleccionaron 6 laminillas obtenidas de cada bloque que contienen todos los grupos experimentales. Las laminillas seleccionadas fueron marcadas con la técnica de inmunohistoquímica previamente descrita y se capturaron las imágenes de las zonas de interés en el estriado (Figura 10) de cada hemisferio de los animales en el microscopio semi-confocal.

## V. RESULTADOS

### 5.1 Curva de extinción de ratas entrenadas con diferentes niveles de choque eléctrico

Se midió la latencia de retención durante las sesiones de extinción de los grupos de ratas entrenadas con 0.0 mA (n = 10), 1.0 mA (n = 10) y 3.0 mA (n = 10). Se aplicó la prueba de Friedman para determinar si existía una diferencia significativa entre las siete sesiones de extinción de cada grupo experimental. El grupo entrenado sin choque eléctrico (0.0 mA) no mostró diferencias significativas entre las siete sesiones ( $X^2_{(6)} = 10.69$ ,  $p > 0.05$ ).

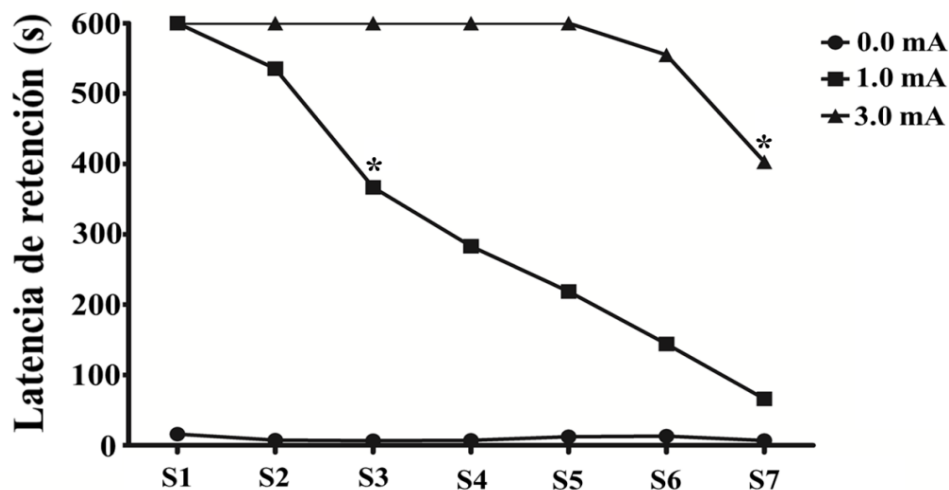
El grupo que recibió el choque eléctrico de 1.0 mA mostró diferencias significativas entre las sesiones. ( $X^2_{(6)} = 49.96$ ,  $p < 0.0001$ ), y la prueba de Wilcoxon mostró que la sesión (S) 1 es diferente a las sesiones S3, S4, S5, S6 y S7 ( $p < 0.01$ ); sin embargo, no es diferente de la S2 ( $p > 0.05$ ). También se encontraron diferencias significativas a lo largo de las sesiones de extinción en el grupo entrenado con 3.0 mA ( $X^2_{(6)} = 27.77$ ,  $p = 0.0001$ ); la prueba post hoc indicó que la latencia de retención de S1 solamente difiere significativamente de S7 ( $p < 0.05$ ) (Figura 14).

La prueba de Kruskal-Wallis ( $H_{(2)} = 24.36$ ,  $p < 0.0001$ ) mostró que existen diferencias significativas durante la sesión 1 entre los 3 grupos estudiados. La prueba U de Mann-Whitney mostró diferencias significativas al comparar el grupo de 0.0 mA con los grupos de 1.0 mA y 3.0 mA ( $p = 0.002$ , en ambos casos); sin embargo no mostró diferencias entre los grupos de 1.0 mA y 3.0 mA ( $p > 0.05$ ). Al comparar los grupos entre sí en S2, S3, S4, S5, S6 y S7. Se encontraron resultados similares a los encontrados en la S1. Se encontraron diferencias significativas entre los grupos en cada una de las sesiones ( $p < 0.0001$ , para cada sesión), y se presentaron diferencias significativas al comparar el grupo de 0.0 mA con respecto a los otros ( $p$  de 0.0002 a  $<0.0001$ ); asimismo al evaluarse los grupos entrenados con choque eléctrico se encontraron diferencias significativas entre ellos ( $p$  de  $<0.05$  a  $<0.01$ ).

La extinción permite determinar si las intensidades de choque administradas forman parte de un modelo de entrenamiento incrementado, un efecto previamente reportado (Bello-



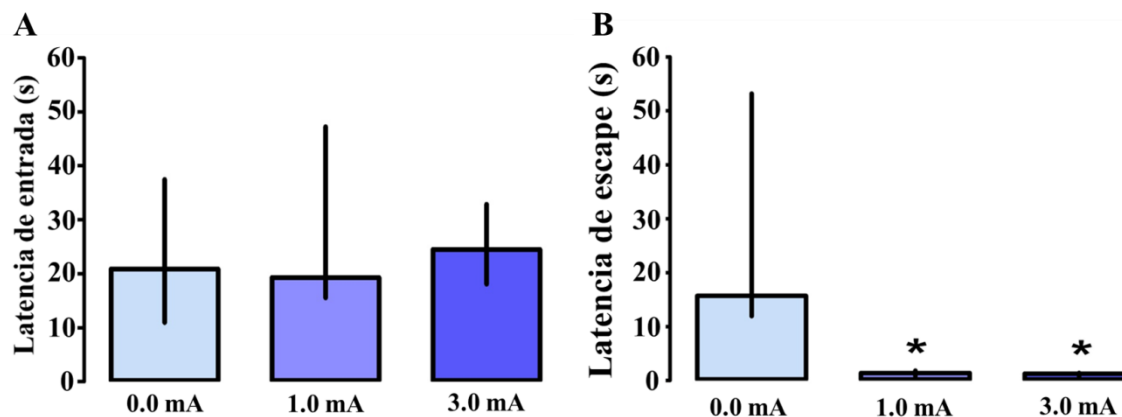
Medina, et al., 2016; Garín-Aguilar et al., 2012). Los resultados muestran una mayor resistencia a la extinción en los animales entrenados con el choque eléctrico más alto (3.0 mA) en comparación con los animales entrenados con el choque bajo (1.0 mA). Estos resultados confirman que el choque eléctrico de tipo moderado es de 1.0 mA y el choque eléctrico incrementado es el de 3.0 mA.



**Figura 14.- Curva de extinción de la tarea de evitación inhibitoria.** Se muestra la mediana de la latencia de retención de los tres grupos entrenados (0.0 mA, 1.0 mA y 3.0 mA) a lo largo de las siete sesiones de extinción (S1-S7). (\*) Primera diferencia significativa usando la prueba de Wilcoxon al comparar la sesión 1 (S1) con el resto de las sesiones de extinción en los grupos de 1.0 mA ( $p < 0.010.0078$ ) y 3.0 mA ( $p < 0.05$ ).

## 5.2 Aprendizaje de la tarea de evitación inhibitoria

Durante el entrenamiento de la tarea de evitación inhibitoria del segundo experimento se registró tanto la latencia de entrada como la latencia de escape. La prueba de Kruskal-Wallis mostró que no existen diferencias significativas en las latencias de entrada al compartimento oscuro entre los grupos de 0.0 mA, 1.0 mA y 3.0 mA ( $H_{(2)} = 0.5480$ ,  $p > 0.05$ ) (Fig. 16 A). Sin embargo, se encontraron diferencias significativas en las latencias de escape entre los tres grupos experimentales ( $H_{(2)} = 19.712$ ,  $p < 0.0001$ ); la prueba de U de Mann-Whitney mostró que el grupo 0.0 mA tuvo latencias de escape significativamente mayores que los grupos 1.0 mA y 3.0 mA ( $p = 0.0002$ , para ambas comparaciones); estos últimos grupos no presentaron diferencias estadísticas entre sí ( $p > 0.05$ ) (Figura 15)



**Figura 15.- Entrenamiento en la tarea de evitación inhibitoria.** A. Latencia de entrada de los grupos experimentales entrenados con 0.0 mA, 1.0 mA y 3.0 mA en la tarea de evitación inhibitoria. B. Latencia de escape. Las mediciones se muestran en medianas con rangos intercuartiles. \*  $p < 0.0002$  vs. el grupo 0.0 mA.

El hecho de que no se encontraran diferencias en las latencias de entrada entre los grupos experimentales, nos permite inferir que todos los animales tenían sus capacidades motrices intactas el día del entrenamiento. Las diferencias encontradas en la latencia de escape en los grupos de choque moderado y choque sobrerreforzante comparados con los que no recibieron un choque eléctrico, se atribuyen a la naturaleza aversiva del estímulo del choque eléctrico, el cual al ser administrado a las ratas en el compartimento de castigo provoca una conducta de escape hacia el compartimento de seguridad. Por último, dado que no hay diferencias significativas en las latencias de escape entre los grupos de 1.0 mA y 3.0 mA, nos demuestra que el aumento del estímulo aversivo no afecta el tiempo de escape, es decir, si se aumenta la intensidad de choque eléctrico no se disminuye el tiempo de escape.

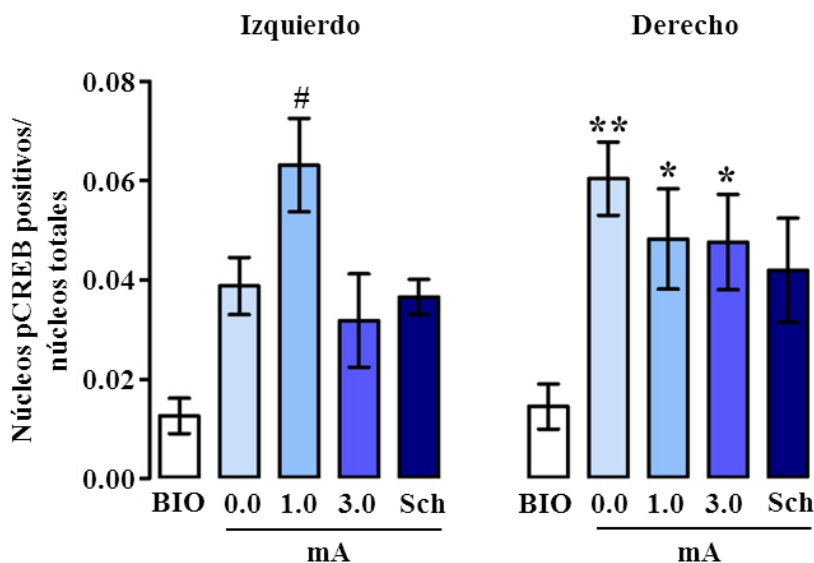
### 5.3 Efecto del entrenamiento moderado e intenso sobre la fosforilación de CREB en la serina 133

En cada estriado se cuantificó la suma de las células con núcleos positivos pCREB así como la suma de todos los núcleos neuronales en las seis muestras; tres correspondientes a la región del estriado dorsal y tres a la región del estriado ventral. Para cada animal se determinó la proporción de núcleos positivos en relación con el total de núcleos (núcleos positivos/total de núcleos). En otras palabras, de cada animal se tomaron dos datos para hacer los análisis estadísticos.

### 5.3.1 Laterización del estriado

Con el fin de determinar la presencia de una posible lateralización en la fosforilación de CREB en el estriado se calcularon las proporciones en cada hemisferio (Figura 16). El análisis de varianza (ANOVA) mostró diferencias significativas en el hemisferio izquierdo ( $F_{(4,14)} = 5.128, p < 0.01$ ); la prueba post-hoc de Bonferroni indicó que los grupos 0.0 mA, 3.0 mA y Sch no son diferentes del grupo bioterio (BIO) ( $p > 0.05$ ), mientras que el grupo 1.0 mA posee una proporción de núcleos pCREB positivos significativamente mayor que en todos los otros grupos (valores de p entre 0.05 y 0.0005) (Figura 16).

En el hemisferio derecho el ANOVA también arrojó diferencias significativas entre los grupos ( $F_{(4,13)} = 4.060, p = 0.0237$ ); el análisis post-hoc puso en evidencia que los grupos 0.0 mA ( $p = 0.002$ ), 1.0 mA ( $p = 0.0163$ ) y 3.0 mA ( $p < 0.05$ ) tuvieron una mayor proporción de núcleos neuronales pCREB positivos en comparación al grupo BIO. Además, la prueba post-hoc de Bonferroni no encontró diferencias significativas entre el grupo BIO y el expuesto al estímulo aversivo (Sch) ( $p > 0.05$ ) (Figura 16)



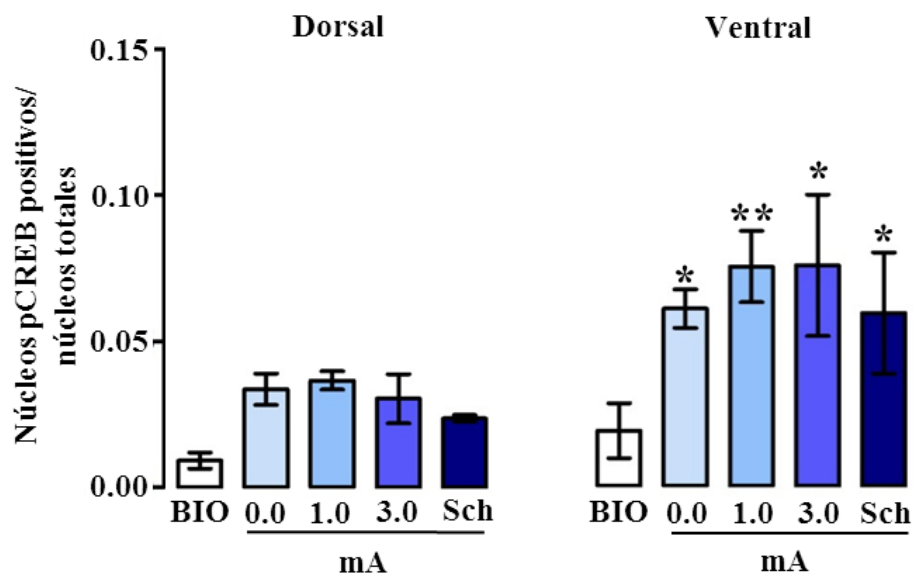
**Figura 16.- Proporción de núcleos pCREB positivos en ambos estriado izquierdo y derecho.**

En el eje de las ordenadas se muestra la media aritmética de la proporción de núcleos pCREB positivos sobre los núcleos totales de cada grupo experimental. BIO, bioterio (barra blanca); Sch, solo choque de 3.0 mA; 0.0, 1.0 y 3.0, grupos entrenados con choque eléctrico de 0.0 mA, 1.0 mA y 3.0 mA respectivamente. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  vs BIO. #  $p < 0.05$  vs BIO, 0.0, 3.0 y Sch. Cada barra representa el promedio  $\pm$  error estándar, cuatro ratas por grupo.

El análisis de varianza ANOVA de dos vías (grupo x hemisferio) muestra que no hay una interacción significativa entre las dos variables ( $F_{(4,27)} = 1.277, p > 0.05$ ).

### 5.3.2 Regionalización del estriado

Con el objetivo de discernir si existe una participación regional diferencial en el estriado, se analizó las proporciones de células CREB positivas en la región ventral y en la región dorsal (conteniendo los conteos de ambos hemisferios). El ANOVA por región no encontró diferencias significativas dorsal ( $F_{(4,14)} = 1.506, p > 0.05$ ), pero el análisis de la región ventral si mostró diferencias ( $F_{(4,13)} = 6.256, p < 0.005$ ) (Fig. 17).



**Figura 17.- Regionalización del estriado y la activación de CREB.** En el eje de las ordenadas se muestra la media aritmética de la proporción de núcleos pCREB positivos sobre los núcleos totales en las regiones dorsal y ventral del estriado. BIO, bioterio (barra blanca); Sch, solo choque de 3.0 mA; 0.0, 1.0 y 3.0, grupos estrados con choque eléctrico de 0.0 mA, 1.0 mA y 3.0 mA respectivamente. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  vs BIO. Cada barra representa el promedio  $\pm$  error estándar, cuatro ratas por grupo.

En la región ventral la prueba post-hoc de Bonferroni mostró que los grupos 0.0 mA ( $p = 0.0016$ ), 1.0 mA ( $p < 0.001$ ), 3.0 mA ( $p < 0.01$ ) y Sch ( $p < 0.05$ ) tienen una mayor proporción de núcleos neuronales pCREB positivos a comparación con el grupo bioterio (BIO) (Fig. 17).

El ANOVA de dos vías (grupo x región), mostró que existen diferencias significativas con respecto al factor grupo ( $F_{(4,27)} = 4.268, p < 0.01$ ) y en el factor región ( $F_{(4,27)} = 17.168, p$

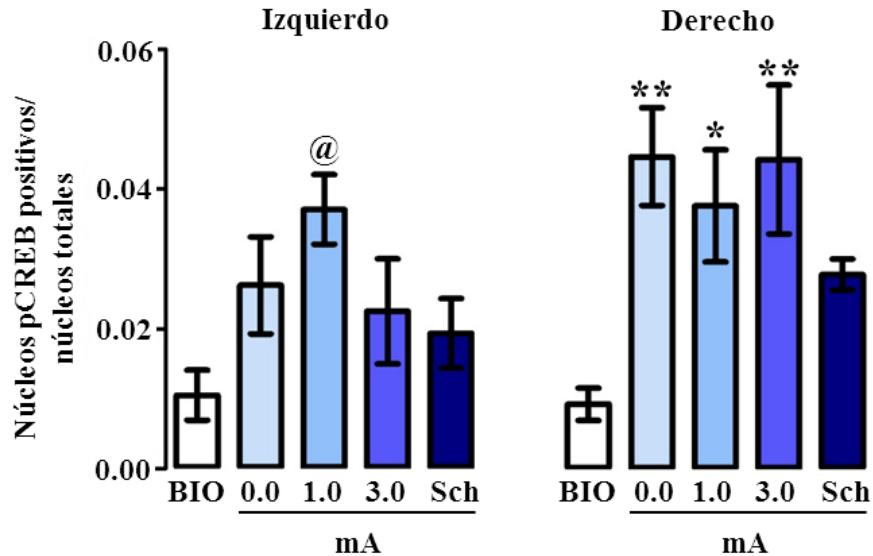
< 0.0005) sobre la variable dependiente (proporción de núcleos pCREB positivos) e indicó que no hay una interacción significativa entre las dos variables ( $F_{(4, 27)} = 0.687, p > 0.05$ ).

### **5.3.3 Laterización de la región dorsal del estriado**

Con el objetivo de saber si el efecto de laterización observado en todo el estriado se mantiene al ser estudiado por regiones, se analizó la región dorsal del estriado dividiendo las proporciones por hemisferios. El ANOVA determinó que existen diferencias significativas entre los grupos en el hemisferio izquierdo ( $F_{(4,14)} = 3.260, p < 0.05$ ), y entre los grupos del hemisferio derecho ( $F_{(4,14)} = 4.313, p < 0.05$ ) en la región dorsal del estriado (Figura 18). Como se puede observar en la Figura 18 un efecto parecido al encontrado en la Figura 16.

En el hemisferio izquierdo el post-hoc de Bonferroni mostró que sólo el grupo de 1.0 mA ( $p < 0.005$ ) tiene una proporción de núcleos neuronales pCREB positivos significativamente mayor al grupo bioterio (BIO); adicionalmente el grupo de 1.0 mA también fue significativamente mayor a los grupos de sólo choque (Sch) ( $p < 0.05$ ) y 3.0 mA ( $p < 0.05$ ). El grupo solo expuesto al contexto (0.0 mA) no mostró diferencias significativas con respecto al entrenado con el choque eléctrico moderado (1.0 mA) ( $p > 0.05$ ). El post-hoc de Bonferroni mostró que las proporciones de los núcleos neuronales pCREB positivos de los grupos 0.0 mA, 3.0 mA y Sch no son diferentes al grupo bioterio (BIO) ( $p > 0.05$ ) (Figura 18).

Con respecto al hemisferio derecho el post-hoc de Bonferroni mostro que el grupo bioterio (BIO) tiene una proporción de núcleos neuronales pCREB positivos significativamente menor que los grupos 0.0 mA ( $p < 0.005$ ), 1.0 mA ( $p < 0.05$ ) y 3.0 mA ( $p < 0.005$ ). Además, no se encontró diferencias significativas entre el grupo BIO y el expuesto al estímulo aversivo (Sch) ( $p > 0.05$ ) (Figura 18).



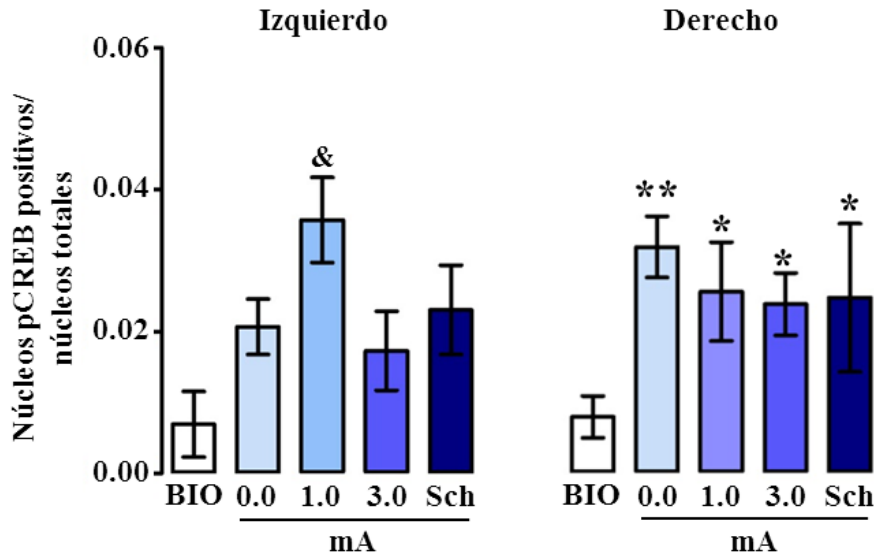
**Figura 18.- Proporción de núcleos pCREB positivos en la región dorsal del estriado izquierdo y derecho.** En el eje de las ordenadas se muestra la media aritmética de la proporción de núcleos pCREB positivos sobre los núcleos totales. BIO, bioterio, Sch, solo choque de 3.0 mA; 0.0, 1.0 y 3.0, grupos entrenados con choque eléctrico de 0.0 mA, 1.0 mA y 3.0 mA respectivamente. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  vs BIO. @  $p < 0.05$  vs BIO, 3.0 y Sch. Cada barra representa el promedio  $\pm$  error estándar, cuatro ratas por grupo.

El ANOVA de dos vías (grupo x hemisferio) muestra que no hay una interacción significativa entre las dos variables ( $F_{(4, 28)} = 1.274$ ,  $p > 0.05$ ).

### 5.3.4 Laterización de la región ventral del estriado

La región ventral del estriado mostró tener diferencias significativas entre grupos al ser analizado sin la separación por hemisferios (Figura 17), sin embargo, nos preguntamos si el efecto de laterización también está presente en esta región. Efectivamente, al analizar cada hemisferio por separado, el ANOVA indicó que existen diferencias significativas entre los grupos en ambos hemisferios. En el hemisferio izquierdo el resultado del ANOVA fue: ( $F_{(4,14)} = 4.568$ ,  $p < 0.05$ ). La prueba de Bonferroni mostró que el grupo entrenado con un choque eléctrico moderado (1.0 mA) tiene una proporción de núcleos neuronales pCREB positivos significativamente mayor al grupo bioterio (BIO) ( $p < 0.001$ ). Adicionalmente el grupo 1.0 mA tuvo una proporción de núcleos neuronales pCREB positivos mayor a la de los animales del grupo expuesto solo al contexto (0.0 mA) ( $p < 0.05$ ) y los animales del grupo entrenado con un entrenamiento incrementado (3.0 mA) ( $p < 0.01$ ). El grupo expuesto al estímulo aversivo (Sch) no mostro diferencias significativas con respecto al

entrenado con el choque eléctrico moderado (1.0 mA) ( $p > 0.05$ ). El post-hoc de Bonferroni mostró que los grupos 0.0 mA, 3.0 mA y Sch no son diferentes del grupo bioterio (BIO) ( $p > 0.05$ ) (Figura 19).



**Figura 19.- Proporción de núcleos pCREB positivos en el estriado ventral izquierdo y en el derecho.** En el eje de las ordenadas se muestra la media aritmética de la proporción de núcleos pCREB positivos sobre los núcleos totales de cada grupo experimental. BIO, bioterio; Sch, solo choque de 3.0 mA; 0.0, 1.0 y 3.0, grupos entrenados con choque eléctrico de 0.0 mA, 1.0 mA y 3.0 mA, respectivamente. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  vs BIO; &  $p < 0.05$  vs BIO, 1.0 mA y 3.0 mA. Cada barra representa el promedio  $\pm$  error estándar, cuatro ratas por grupo.

En cuanto al hemisferio derecho, el resultado del ANOVA fue: ( $F_{(4,13)} = 4.621$ ,  $p < 0.05$ ) (Figura 19). Como se puede observar en la Figura 19 se observó un efecto parecido al encontrado en la Figura 16. El estadístico post-hoc de Bonferroni reveló que los grupos 0.0 mA ( $p = 0.0026$ ), 1.0 mA ( $p = 0.0169$ ), 3.0 mA ( $p < 0.05$ ) y Sch ( $p < 0.05$ ) tienen una proporción de núcleos neuronales pCREB positivos significativamente mayor con respecto al grupo bioterio (BIO) (Figura 19).

El análisis de varianza ANOVA de dos vías (grupo x hemisferio) mostró que no hay una interacción significativa entre las dos variables ( $F_{(4,27)} = 1.941$ ,  $p > 0.05$ ).

## VI. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos durante el proceso de extinción indican que la intensidad de 3.0 mA de choque eléctrico utilizada en el entrenamiento de la tarea de evitación inhibitoria induce un aprendizaje incrementado, es decir, este grupo muestra una alta resistencia a la extinción en comparación con las ratas entrenadas con la intensidad de choque eléctrico moderado (1.0 mA) (Figura 14); este fenómeno ya se había reportado previamente por nuestro laboratorio (Bello-Medina, et al., 2016; Garín-Aguilar et al., 2012).

El principal hallazgo de este experimento es la lateralización hemisférica del estriado en relación con la proporción de células positivas a pCREB como resultado de las manipulaciones conductuales que se estudiaron, es decir, la dinámica de activación es diferente en cada hemisferio (Figura 16). Encontramos que en el hemisferio izquierdo hay una mayor proporción de núcleos neuronales que presentan la fosforilación de CREB en los animales con entrenamiento moderado (1.0 mA) en comparación con todos los demás grupos experimentales. En contraste, el hemisferio derecho tiene una alta proporción de núcleos neuronales pCREB positivos en todos los grupos entrenados en la tarea de EI en comparación con el grupo bioterio.

Existe evidencia de que el hemisferio derecho y el hemisferio izquierdo del cerebro funcionan de diferentes maneras. Se ha sugerido la existencia de una participación diferencial de la amígdala izquierda y la amígdala derecha en la memoria. Se ha reportado una disminución significativa en la latencia de retención en la tarea de EI después de la administración de lidocaína (Coleman-Mesches & McGaugh, 1995a, 1995b) y muscimol (agonista de GABA) (Coleman-Mesches & McGaugh, 1995) en la amígdala derecha. Estos datos sugieren que la amígdala derecha es indispensable para la evocación de memoria de la tarea de EI.

También se ha observado que en el condicionamiento de miedo al tono, el estrés por exposición a un predador y la hipersensibilidad mecánica inducida por formalina, inducen una liberación mayor de adrenalina (Young & Williams, 2010) y una mayor expresión de marcadores moleculares usados como un indicador de la actividad neuronal y asociados con la formación de memoria como Arc (Young & Williams, 2013), c-fos (Scicli, Petrovich,



Swanson, & Thompson, 2004), PKC (Orman & Stewart, 2007), ERK (Carrasquillo & Gereau, 2008), y pCREB (Blundell & Adamec, 2007) en la amígdala del hemisferio derecho.

Por otro lado, existen reportes en roedores que muestran que hay una mayor cantidad de receptores dopaminérgicos del tipo D2 en el estriado izquierdo (Capper-Loup & Kaelin-Lang, 2008; Schneider, Murphy, & Coons, 1982), y esto ha sido consistente con reportes previos de asimetría neuroquímica de la función del sistema nigroestriatal donde se ha observado una dinámica de regulación contralateral en la liberación de dopamina proveniente de la sustancia nigra sobre el estriado (Leviel, Chéramy, & Glowinski, 1979); en la misma estructura se produce una mayor liberación de DA en el hemisferio derecho, mientras que en el hemisferio izquierdo disminuye la concentración de este neurotransmisor (Nieoullon, Chéramy, & Glowinski, 1977).

De igual manera, se ha descrito una mayor liberación de dopamina en el hemisferio derecho, y se ha relacionado con aspectos cognitivos del comportamiento como la preferencia de rotación a la derecha, la actividad motora, y con respuestas a estímulos aversivos (Berridge, Mitton, Clark, & Roth, 1999; Carlson, Fitzgerald, Keller, & Glick, 1991, 1993; Sullivan & Gratton, 1998; Sullivan & Dufresne, 2006) en el sistema mesoestriatal (Denenberg, 1981; Glick, Ross, & Hough, 1982) y sus estructuras relacionadas como la corteza prefrontal (PFC), la corteza entorrinal (EC) y el hipocampo (Fride & Weinstock, 1987; Molochnikov & Cohen, 2014; Nielsen et al., 1997).

En el estriado los principales receptores de dopamina son los D1 y D2, los cuales median las respuestas de las neuronas medianas espinosas (MSNs). Estos receptores forman parte de un sistema en donde la activación de los receptores D1 o el bloqueo de los receptores D2 inducen la expresión génica en estas neuronas (Albin et al., 1983; Gerfen et al., 1990; Nisenbaum, Kitai, Crowley, & Gerfen, 1994; Wang & McGinty, 1996).

La activación del receptor D1 a través de la señalización de la PKA (Monsma, Mahan, McVittie, Gerfen, & Sibley, 1990), tiene efectos directos sobre la apertura de los receptores AMPA y NMDA (Westphal et al., 1999), provocando un incremento en la expresión de GEIs en las MSNs en presencia de glutamato (Keefe & Horner, 2017). La activación de los

receptores NMDA causa un flujo de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{+2}$  (Macdermott, Mayer, Westbrook, Smith, & Barker, 1986) lo cual estimula la actividad de la familia de las calcio calmodulinas (Fukunaga, Soderling, & Miyamoto, 1992). Se ha establecido que la estimulación del receptor D1 en las MSNs induce la fosforilación de la Ser897 de la proteína PKA, evento crucial para la fosforilación de CREB; sin embargo, no es la acción directa de la PKA sino un efecto de la ruta de señalización de los receptores NMDA la cual culmina en la fosforilación de CREB (Dudman et al., 2003).

En cambio, la activación de los receptores D2 atenúan la expresión génica (Gerfen et al., 1990; Le Moine, Svenningsson, Fredholm, & Bloch, 1997; Pinna, Wardas, Cristalli, & Morelli, 1997). En las MSNs el bloqueo de los receptores D2 induce la expresión de GEIs en estas neuronas (Lobo et al., 2013; Robertson, Vincent, & Fibiger, 1992). Esta diferencia refleja el hecho de que la activación del receptor D2 inhibe la señalización del segundo mensajero necesaria para la regulación génica, en oposición a los efectos estimulantes de la activación del receptor D1 (Keefe & Horner, 2017; Steiner, 2017).

Con la evidencia del papel opuesto de los receptores dopaminérgicos D1 y D2 en la modulación de la transcripción y los reportes de la lateralización hemisférica de la distribución de los receptores a DA en el estriado, se propone que el efecto de lateralización observado en esta investigación (Figura 16, Figura 18, Figura 19) puede ser producido por la modulación dopaminérgica sobre la expresión génica resultante durante la consolidación de la memoria.

Otro de los resultados sustanciales de esta tesis es el hecho de que en la región ventral del estriado se observó un aumento en la proporción de núcleos neuronales pCREB positivos comparado con la región dorsal (Figura 17). Este fenómeno ha sido reportado con anterioridad en la misma estructura y con el mismo paradigma conductual sobre la expresión de la proteína Arc (González- Franco et al., 2017), y se atribuyó este efecto al modelo de procesamiento de información propuesto por Yin y Knolwton (2006). Este modelo propone un proceso de consolidación de tipo serial donde la información del aprendizaje es procesada en pasos transfiriéndose por diferentes estructuras cerebrales que termina en la adquisición de un nuevo hábito, donde la región ventral del estriado es la primera región donde se procesa la información del aprendizaje de tipo asociativo (Yin &

Knowlton, 2006). Asimismo, el análisis de la región ventral muestra que el grupo expuesto sólo al contexto y el grupo expuesto al choque eléctrico no contingente tiene una mayor proporción de núcleos neuronales pCREB positivos comparado con el grupo bioterio, resultado que sugiere que la región está involucrada en el proceso de información resultante tanto del contexto y como la estimulación aversiva.

Por otro lado, la exploración al contexto (0.0 mA) produjo un aumento en la proporción de núcleos neuronales que presentan CREB fosforilado en el estriado dorsal y ventral derecho. Esto se debe en gran medida a las aferencias de regiones cerebrales que participan en el procesamiento de información espacial como el hipocampo (Groenewegen et al., 1999; Groenewegen, der Zee, te Kortschot, & Witter, 1987). Por último, se encontró una mayor proporción de núcleos neuronales pCREB positivos en el grupo entrenado con un choque eléctrico moderado (1.0 mA) y no así en el grupo de entrenamiento incrementado (3.0 mA) en el hemisferio izquierdo (Figura 16, Figura 18, Figura 19), nos permite inferir que la ruta de expresión génica en el estriado modulada por CREB no participa en la consolidación de la memoria de un entrenamiento incrementado. En un trabajo previo del laboratorio se encontró un dinámica similar con respecto a los cambios de la proporción de espinas tipo hongo, en donde se observó un aumento en este tipo de espinas asociado a un entrenamiento moderado en la región agranular de la corteza insular (Marín Juárez, 2016). Con los resultados derivados de esta tesis se sugiere que el entrenamiento moderado requiere la modulación de pCREB para promover la transcripción de genes asociados a la consolidación de la memoria, mientras que, en el entrenamiento incrementado, esta dinámica puede no ser requerida. De manera indirecta, estos resultados apoyan la hipótesis propuesta por Bello-Medina y colaboradores, en la que se propone que los cambios de densidad de espinas encontrados en el estriado producidos por un entrenamiento incrementado son causados por cascadas de señalización no genómicas activadas por los glucocorticoides y moduladas por otras proteínas como la PKC (Bello-Medina et al., 2016).

## VIII. CONCLUSIONES

-Los animales entrenados en la tarea de EI con un choque incrementado (3.0 mA) muestran una mayor resistencia a la extinción, es decir, una mayor persistencia de la memoria que los animales entrenados con un estímulo eléctrico moderado (1.0 mA).

-La proporción de los núcleos neuronales pCREB positivos mostró una dinámica de lateralización hemisférica en el estriado, es decir, el hemisferio izquierdo presenta una mayor proporción de núcleos neuronales pCREB positivos en el grupo entrenado con un choque eléctrico de 1.0 mA con respecto a los otros grupos, mientras que el hemisferio derecho muestra una alta proporción de núcleos neuronales pCREB positivos en todos los grupos con respecto al bioterio sin diferencias entre estos grupos.

-Una mayor proporción de núcleos pCREB positivos no fue encontrado en el grupo de entrenamiento incrementado, estos resultados sugieren que la consolidación de memoria de un entrenamiento incrementado no activan los mecanismo genómicos modulados por CREB, por lo mismo se sugiere que la consolidación de la memoria presente en un entrenamiento incrementado deber ser modulada por otras vías de señalización como la PKC.

## IX. REFERENCIAS

- Abraham, W. C., Mason, S. E., Demmer, J., Williams, J. M., Richardson, C. L., Tate, W. P., ... Dragunow, M. (1993). Correlations between immediate early gene induction and the persistence of long-term potentiation. *Neuroscience*, *56*(3), 717–727.
- Agranoff, B. W., & Klinger, P. D. (1964). Puromycin effect on memory fixation in the goldfish. *Science*, *146*(3646), 952–953. <https://doi.org/10.1126/science.146.3646.952>
- Alberini, C. M. (2009). Transcription factors in long-term memory and synaptic plasticity. *Physiological Reviews*, *89*(1), 121–145. <https://doi.org/10.1152/physrev.00017.2008>.
- Alberini, C. M., & Kandel, E. R. (2014). The regulation of transcription in memory consolidation. In *Learning & Memory* (pp. 1–18).
- Albin, R. L., Penney, J. B., & Young, A. B. (1983). The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Annual Review of Neuroscience*, *6*(1), 73–94. <https://doi.org/10.1146/annurev.ne.06.030183.000445>
- 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*, 1–18. <https://doi.org/10.1006/nlme.1998.3865>
- Anderson, K. A., & Means, A. R. (2002). Defective signaling in a subpopulation of CD4 + T cells in the absence of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase IV. *Molecular and Cellular Biology*, *22*(1), 23–29. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.1.23>
- Annese, J., Schenker-Ahmed, N. M., Bartsch, H., Maechler, P., Sheh, C., Thomas, N., ... Corkin, S. (2014). Postmortem examination of patient H.M.'s brain based on histological sectioning and digital 3D reconstruction. *Nature Communications*, *5*, 1–9. <https://doi.org/10.1038/ncomms4122>
- Barondes, S. H., & Cohen, H. D. (1965). Puromycin effect on successive phases of memory storage. *Science*, (December), 1965–1966.
- Barondes, S. H., & Cohen, H. D. (1968). Arousal and the conversion of “short-term” to “long-term” memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *61*, 923–929. <https://doi.org/10.1073/pnas.61.3.923>
- Bear, M. F., Connors, B. W., & Paradiso, M. A. (2016). *Neuroscience: exploring the brain* (Fourth edi).

- 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. <https://doi.org/10.1073/pnas.1613680113>
- Bernabeu, R., Bevilacqua, L., Ardenghi, P., Bromberg, E., Schmitz, P., Bianchin, M., ... Medina, J. H. (1997). Involvement of hippocampal cAMP/cAMP-dependent protein kinase signaling pathways in a late memory consolidation phase of aversively motivated learning in rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(13), 7041–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.13.7041>
- Berridge, C. W., Mitton, E., Clark, W., & Roth, R. H. (1999). Engagement in a non-escape (displacement) behavior elicits a selective and lateralized suppression of frontal cortical dopaminergic utilization in stress. *Synapse*, *32*(3), 187–197. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2396\(19990601\)32:3<187::AID-SYN5>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2396(19990601)32:3<187::AID-SYN5>3.0.CO;2-9)
- Bishop, G. A., Chang, H. T., & Kitai, S. T. (1982). Morphological and physiological properties of neostriatal neurons: An intracellular horseradish peroxidase study in the rat. *Neuroscience*, *7*(1), 179–191. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(82\)90159-2](https://doi.org/10.1016/0306-4522(82)90159-2)
- Bliss, T. V., & Collingridge, G. L. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, *361*(6407), 31–39. <https://doi.org/10.1038/361031a0>
- Blundell, J., & Adamec, R. (2007). The NMDA receptor antagonist CPP blocks the effects of predator stress on pCREB in brain regions involved in fearful and anxious behavior. *Brain Research*, *1136*(1), 59–76. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.09.078>
- Bonni, A., Brunet, A., West, A. E., Datta, S. R., Takasu, M. A., & Greenberg, M. E. (1999). Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science*, *286*(5443), 1358–1362. <https://doi.org/10.1126/science.286.5443.1358>
- Bourtchuladze, R., Frenquelli, B., Blendy, J., Cioffi, D., Schutz, G., & Silva, A. J. (1994). Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein. *Cell*, *79*(1), 59–68. <https://doi.org/10.1016/0092->

8674(94)90400-6

- Bower, G. T., & Hilgard, E. R. (1989). *Teoría del aprendizaje* (2nd ed). México D.F.: Editorial Trillas.
- Brashers-Krug, T., Shadmehr, R., & Bizzi, E. (1996). Consolidation in human motor memory. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/382252a0>
- Cajal, S. R. Y. (1894). The Croonian Lecture: La Fine Structure des Centres Nerveux. *Proceedings of the Royal Society of London*, 55(331–335), 444–468. <https://doi.org/10.1098/rspl.1894.0063>
- Cammarota, M., Bernabeu, R., Levi De Stein, M., Izquierdo, I., & Medina, J. H. (1998). Learning-specific, time-dependent increases in hippocampal Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II activity and AMPA GluR1 subunit immunoreactivity. *European Journal of Neuroscience*, 10(8), 2669–2676. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1998.00254.x>
- Cammarota, M., Bevilacqua, L., Ardenghi, P., Paratcha, G., Levi De Stein, M., Izquierdo, I., & Medina, J. H. (2000). Learning-associated activation of nuclear MAPK, CREB and Elk-1, along with Fos production, in the rat hippocampus after a one-trial avoidance learning: Abolition by NMDA receptor blockade. *Molecular Brain Research*, 76(1), 36–46. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(99\)00329-0](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(99)00329-0)
- Cammarota, M., Paratcha, G., Levi De Stein, M., Bernabeu, R., Izquierdo, I., & Medina, J. H. (1997). B-50/GAP-43 phosphorylation and PKC activity are increased in rat hippocampal synaptosomal membranes after an inhibitory avoidance training. *Neurochemical Research*, 22(4), 499–505. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9130262>
- Capper-Loup, C., & Kaelin-Lang, A. (2008). Lateralization of dynorphin gene expression in the rat striatum. *Neuroscience Letters*, 447(2–3), 106–108. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.09.071>
- Carew, T. J., & Sutton, M. A. (2001). Molecular stepping stones in memory consolidation. *Nature Neuroscience*, 4(8), 769–771. <https://doi.org/10.1038/90458>
- Carlson, J. N., Fitzgerald, L. W., Keller, R. W., & Glick, S. D. (1991). Side and region dependent changes in dopamine activation with various durations of restraint stress. *Brain Research*, 550(2), 313–318. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(91\)91333-V](https://doi.org/10.1016/0006-8993(91)91333-V)

- Carlson, J. N., Fitzgerald, L. W., Keller, R. W., & Glick, S. D. (1993). Lateralized changes in prefrontal cortical dopamine activity induced by controllable and uncontrollable stress in the rat. *Brain Research*, *630*(1–2), 178–187. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(93\)90655-7](https://doi.org/10.1016/0006-8993(93)90655-7)
- Carrasquillo, Y., & Gereau, R. W. (2008). Hemispheric lateralization of a molecular signal for pain modulation in the amygdala. *Molecular Pain*, *4*, 1–5. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-4-24>
- Casadio, A., Martin, K. C., Giustetto, M., Zhu, H., Chen, M., Bartsch, D., ... Kandel, E. R. (1999). A transient, neuron-wide form of CREB-mediated long-term facilitation can be stabilized at specific synapses by local protein synthesis. *Cell*, *99*(2), 221–237. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81653-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81653-0)
- Chen, A., Muzzio, I. A., Malleret, G., Bartsch, D., Verbitsky, M., Pavlidis, P., ... Kandel, E. R. (2003). Inducible enhancement of memory storage and synaptic plasticity in transgenic mice expressing an inhibitor of ATF4 (CREB-2) and C/EBP proteins. *Neuron*, *39*(4), 655–669. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00501-4](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00501-4)
- Christy, B. A., Lau, L. F., & Nathans, D. (1988). A gene activated in mouse 3T3 cells by serum growth factors encodes a protein with “zinc finger” sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *85*(21), 7857–61. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.21.7857>
- Chrivia, J. C., Kwok, R. P. S., Lamb, N., Hagiwara, M., Montminy, M. R., & Goodman, R. H. (1993). Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature*, *365*(6449), 855–859. <https://doi.org/10.1038/365855a0>
- Cobos-Zapíaín, 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. <https://doi.org/10.1006/nlme.1996.0024>
- Cohen, N. J., & Squire, L. R. (1980). Preserved learning and retention of pattern-analyzing skill in amnesia: dissociation of knowing how and knowing that. *Science*, *210*(4466), 207–210. <https://doi.org/10.1126/science.7414331>
- Coleman-Mesches, K., & McGaugh, J. L. (1995). Differential effects of pretraining



- inactivation of the right or left amygdala on retention of inhibitory avoidance training. *Behavioral Neuroscience*, 109(4), 642–647. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.109.4.642>
- Coleman-Mesches, K., & McGaugh, J. L. (1995). Differential involvement of the right and left amygdalae in expression of memory for aversively motivated training. *Brain Research*, 670(1), 75–81. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)01272-J](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)01272-J)
- Coleman-Mesches, K., & McGaugh, J. L. (1995). Muscimol injected into the right or left amygdaloid complex differentially affects retention performance following aversively motivated training. *Brain Research*, 676(1), 183–188. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)00108-3](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)00108-3)
- Colley, P. A., & Routtenberg, A. (1993). Long-term potentiation as synaptic dialogue. *Brain Research Reviews*, 18(1), 115–122. [https://doi.org/10.1016/0165-0173\(93\)90009-O](https://doi.org/10.1016/0165-0173(93)90009-O)
- Colombo, P. J., Brightwell, J. J., & Countryman, R. A. (2009). Cognitive strategy-specific increases in phosphorylated cAMP response element-binding protein and c-Fos in the hippocampus and dorsal striatum. *Neurochemistry International*, 54(5–6), 385–392. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2009.01.006>
- Costa-Mattioli, M., Gobert, D., Harding, H., Herdy, B., Azzi, M., Bruno, M., ... Sonenberg, N. (2005). Translational control of hippocampal synaptic plasticity and memory by the eIF2 $\alpha$  kinase GCN2. *Nature*, 436(7054), 1166–1170. <https://doi.org/10.1038/nature03897>
- Cruz-Morales, S. E., Durán-Arevalo, M., Del Guante, M. A. D., Quirarte, G. L., & Prado-Alcalá, R. A. (1992). A threshold for the protective effect of over-reinforced passive avoidance against scopolamine-induced amnesia. *Behavioral and Neural Biology*, 57(3), 256–259. [https://doi.org/10.1016/0163-1047\(92\)90248-3](https://doi.org/10.1016/0163-1047(92)90248-3)
- Dash, P. K., Hochner, B., & Kandel, E. R. (1990). Injection of the cAMP-responsive element into the nucleus of Aplysia sensory neurons blocks long-term facilitation. *Nature*, 345(6277), 718–721. <https://doi.org/10.1038/345718a0>
- Dash, P. K., Karl, K. A., Colicos, M. A., Prywes, R., & Kandel, E. R. (1991). cAMP response element-binding protein is activated by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin- as well as cAMP-dependent protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*

- United States of America*, 88(11), 5061–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.11.5061>
- Davis, H. P., & Squire, L. R. (1984). Protein synthesis and memory: a review. *Psychological Bulletin*, 96(3), 518–559.
- De Cesare, D., Jacquot, S., Hanauer, A., & Sassone-Corsi, P. (1998). Rsk-2 activity is necessary for epidermal growth factor-induced phosphorylation of CREB protein and transcription of c-fos gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(21), 12202–12207. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.21.12202>
- Denenberg, V. H. (1981). Hemispheric laterality in animals and the effects of early experience. *Behavioral Brain Science*, 4, 1–49.
- Deniau, J. M., Feger, J., & Le Guyader, C. (1976). Striatal evoked inhibition of identified nigro-thalamic neurons. *Brain Research*, 104(1), 152–156. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(76\)90656-9](https://doi.org/10.1016/0006-8993(76)90656-9)
- Devan, B. D., Hong, N. S., & McDonald, R. J. (2011). Parallel associative processing in the dorsal striatum: Segregation of stimulus-response and cognitive control subregions. *Neurobiology of Learning and Memory*, 96(2), 95–120. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2011.06.002>
- 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.
- Domjan, M. (University of T. at A. (2015). *The principles of learning and Behavior* (Seventh Ed). Stamford: Cengage Learning.
- Dudai, Y. (2004). The Neurobiology of Consolidations, Or, How Stable is the Engram? *Annual Review of Psychology*, 55(1), 51–86. <https://doi.org/10.1146/annurev.psych.55.090902.142050>
- Dudman, J. T., Eaton, M. E., Rajadhyaksha, A., Macías, W., Taher, M., Barczak, A., ... Konradi, C. (2003). Dopamine D1 receptors mediate CREB phosphorylation via phosphorylation of the NMDA receptor at Ser897-NR1. *Journal of Neurochemistry*, 87(4), 922–934. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.02067.x>
- Duncan, C. P. (1949). The retroactive effect of electroshock on learning. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 42(1), 32–44.

- 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. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(90\)90129-N](https://doi.org/10.1016/0361-9230(90)90129-N)
- Ebbinghaus, H. (1885). *Memory: A Contribution to Experimental Psychology*. New York: Teachers College/Columbia Univ.
- Flexner, J. B., Flexner, L. B., Stellar, E., Roberts, R. B., & Haba, G. D. L. (1962). Inhibition of Protein Synthesis in Brain and Learning and Memory Following Puromycin. *Journal of Neurochemistry*, *9*(NOV), 595-.
- Franklin, T. R., & Druhan, J. P. (2000). Expression of Fos-related antigens in the nucleus accumbens and associated regions following exposure to a cocaine-paired environment. *European Journal of Neuroscience*, *12*(6), 2097–2106. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2000.00071.x>
- Freeman, F. M., Rose, S. P., & Scholey, A. B. (1995). Two time windows of anisomycin-induced amnesia for passive avoidance training in the day-old chick. *Neurobiology of Learning and Memory*, *63*(3), 291–295. <https://doi.org/10.1006/nlme.1995.1034>
- Fride, E., & Weinstock, M. (1987). Increased interhemispheric coupling of the dopamine systems induced by prenatal stress. *Brain Research Bulletin*, *18*(3), 457–461. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(87\)90020-7](https://doi.org/10.1016/0361-9230(87)90020-7)
- Fukunaga, K., Soderling, T. R., & Miyamoto, E. (1992). Activation of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C by glutamate in cultured rat hippocampal neurons. *The Journal of Biological Chemistry*, *267*(31), 22527–22533.
- 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*(March), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2012.00012>
- Gerfen, C. R., & Bolam, J. P. (2017a). Neuroanatomical Organization of the Basal Ganglia. In *Handbook of Basal Ganglia Structure and Function* (Second edi, pp. 3–32).
- Gerfen, C. R., & Bolam, J. P. (2017b). *The Neuroanatomical Organization of the Basal Ganglia. Handbook of Behavioral Neuroscience* (Vol. 24). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802206-1.00001-5>
- Gerfen, C. R., Engber, T. M., Mahan, L. C., Susel, Z., Chase, T. N., Monsma, F. J., &

- Sibley, D. R. (1990). D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science*, 250(4986), 1429–32. <https://doi.org/10.1126/science.2147780>
- Gerfen, C. R., Paletzki, R., & Heintz, N. (2013). GENSAT BAC cre-recombinase driver lines to study the functional organization of cerebral cortical and basal ganglia circuits. *Neuron*, 80(6), 1368–1383. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.10.016>
- Gerfen, C. R., & Wilson, C. J. (1996). The basal ganglia. In *Handbook of Chemical Neuroanatomy. Vol 12: Intergrated Systems of the CNS. Part III* (pp. 371–468). [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0924-8196\(96\)80004-2](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0924-8196(96)80004-2)
- Giordano, M., & Prado-Alcalá, R. A. (1986). Retrograde amnesia induced by post-trial injection of atropine into the caudate-putemen. Protective effect of the negative reinforcer. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*, 24, 905–909. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(89\)90076-2](https://doi.org/10.1016/0361-9230(89)90076-2)
- Glick, S. D., Ross, D. A., & Hough, L. B. (1982). Lateral asymmetry of neurotransmitters in human brain. *Brain Research*, 234(1), 53–63. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(82\)90472-3](https://doi.org/10.1016/0006-8993(82)90472-3)
- González- Franco, D. A., Ramírez-Amaya, V., Joseph-Bravo, P., Prado-Alcalá, R. A., & Quirarte, G. L. (2017). Differential Arc protein expression in dorsal and ventral striatum after moderate and intense inhibitory avoidance training. *Neurobiology of Learning and Memory*, 140, 17–26. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2017.02.001>
- Gonzalez, G. A., & Montminy, M. R. (1989). Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell*, 59(4), 675–680. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90013-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90013-5)
- Goodman, J., & Packard, M. G. (2017). Memory systems of the basal ganglia. In *Handbook of Basal Ganglia Structure and Function* (Second edi, pp. 725–740). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802206-1.00035-0>
- Groenewegen, H. J., der Zee, E. V. V., te Kortschot, A., & Witter, M. P. (1987). Organization of the projections from the subiculum to the ventral striatum in the rat. A study using anterograde transport of Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *Neuroscience*, 23(1), 103–120. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(87\)90275-2](https://doi.org/10.1016/0306-4522(87)90275-2)
- Grofová, I. (1975). The identification of striatal and pallidal neurons projecting to

- substantia nigra . An experimental study by means of retrograde axonal transport of horseradish peroxidase. *Brain Research*, 91(2), 286–291.
- Gupta-Agarwal, S., Franklin, A. V, Deramus, T., Wheelock, M., Davis, R. L., McMahon, L. L., & Lubin, F. D. (2012). G9a/GLP Histone lysine dimethyltransferase complex activity in the hippocampus and the entorhinal cortex is required for gene activation and silencing during memory consolidation. *The Journal of Neuroscience*, 32(16), 5440–5453. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0147-12.2012>
- Hattori, T., McGeer, E. G., & McGeer, P. L. (1979). Fine structural analysis of the cortico-striatal pathway. *Journal of Comparative Neurology*, 185(2), 347–353. <https://doi.org/10.1002/cne.901850208>
- Hernandez, P. J., & Abel, T. (2008). The role of protein synthesis in memory consolidation: Progress amid decades of debate. *Neurobiology of Learning and Memory*, 89(3), 293–311. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2007.09.010>
- Hollerman, J. R., & Schultz, W. (1998). Dopamine neurons report an error in the temporal prediction of reward during learning. *Nature Neuroscience*, 1(4), 304–9. <https://doi.org/10.1038/1124>
- Igaz, L. M., Bekinschtein, P., Vianna, M. M. R., Izquierdo, I., & Medina, J. H. (2004). Gene expression during memory formation. *Neurotoxicity Research*, 6(3), 189–204. <https://doi.org/10.1007/BF03033221>
- Impey, S., Smith, D. M., Obrietan, K., Donahue, R., Wade, C., & Storm, D. R. (1998). Stimulation of cAMP response element (CRE)-mediated transcription during contextual learning. *Nature Neuroscience*, 1(May), 595–601. <https://doi.org/10.1038/2830>
- Izquierdo, I., Bevilaqua, L., Rossato, J. I., Bonini, J. S., Medina, J. H., & Cammarota, M. (2006). Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. *Trends in Neurosciences*, 29(9), 496–505. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2006.07.005>
- Izquierdo, I., Furini, C. R. G., & Myskiw, J. C. (2016). Fear Memory. *Physiological Reviews*, 96(2), 695–750. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2015>
- Izquierdo, L. A., Barros, D. M., Vianna, M. R. M., Coitinho, A., De Silva, T. D., Choi, H., ... Izquierdo, I. (2002). Molecular pharmacological dissection of short- and long-term

- memory. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 22(3), 269–287.  
<https://doi.org/10.1023/A:1020715800956>
- James, W. (1890). *Principles of psychology*. Holt, New York.
- Jarome, T. J., & Helmstetter, F. J. (2013). The ubiquitin-proteasome system as a critical regulator of synaptic plasticity and long-term memory formation. *Neurobiology of Learning and Memory*, 105, 107–116.
- Jarome, T. J., Thomas, J. S., & Lubin, F. D. (2014). The Epigenetic Basis of Memory Formation and Storage. In *Progress in Molecular Biology and Traslational Science* (Vol. 128).
- Jarvik, M. E., & Kopp, R. (1967). An improved one-trial passive avoidance learning situation. *Psychological Reports*, 21, 221–224.  
<https://doi.org/10.2466/pr0.1967.21.1.221>
- Johansen, J. P., Cain, C. K., Ostroff, L. E., & Ledoux, J. E. (2011). Molecular mechanisms of fear learning and memory. *Cell*, 147(3), 509–524.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.009>
- Kandel, E. R. (2001). The molecular biology of memory storage: A dialogue between gene and synapses. *Science*, 294(5544), 1030–1038.  
<https://doi.org/10.1126/science.1067020>
- Kandel, E. R. (2005). The molecular biology of memory storage: A dialog between genes and synapses. *Bioscience Reports*, 24(4–5), 477–522. <https://doi.org/10.1007/s10540-005-2742-7>
- Kandel, E. R., Dudai, Y., & Mayford, M. R. (2016). *Learning and Memory*. Cold Spring Harbor.
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., & Jessell, T. M. (1997). *Neurociencia y conducta*. Madrid: Prentice Hall.
- 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.
- Kawashima, T., Okuno, H., Nonaka, M., Adachi-morishima, A., Kyo, N., & Okamura, M. (2009). Synaptic activity-responsive element in the Arc/Arg3.1 promoter essential for synapse-to-nucleus signaling in activated neurons. *Proceedings of the National*

- Academy of Sciences of the United States of America*, 106(1), 316–321.
- Keefe, K. A., & Horner, K. A. (2017). Neurotransmitter Regulation of Striatal Gene Expression. In *Handbook of Basal Ganglia Structure and Function* (pp. 609–637).
- Kelley, A. E., & Domesick, V. B. (1982). The distribution of the projection from the hippocampal formation to the nucleus accumbens in the rat: An anterograde and retrograde-horseradish peroxidase study. *Neuroscience*, 7(10), 2321–2335. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(82\)90198-1](https://doi.org/10.1016/0306-4522(82)90198-1)
- 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. Series B, Biological Sciences*, 262(845), 383–401.
- Kerimoglu, C., Agis-Balboa, R. C., Kranz, A., Stilling, R., Bahari-Javan, S., Benito-Garagorri, E., ... Fischer, A. (2013). Histone-Methyltransferase MLL2 (KMT2B) Is Required for Memory Formation in Mice. *Journal of Neuroscience*, 33(8), 3452–3464. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3356-12.2013>
- Kida, S., & Serita, T. (2014). Functional roles of CREB as a positive regulator in the formation and enhancement of memory. *Brain Research Bulletin*, 105, 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2014.04.011>
- Kita, H. (1993). GABAergic circuits of the striatum. *Progress in Brain Research*, 99, 51–72. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)61338-2](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)61338-2)
- Kitai, S. T., Kocsis, J. D., Preston, R. J., & Sugimori, M. (1976). Monosynaptic inputs to caudate neurons identified by intracellular injection of horseradish peroxidase. *Brain Research*, 109, 601–606.
- Kleschevnikov, A. M., & Routtenberg, A. (2001). PKC activation rescues LTP from NMDA receptor blockade: PKC Activation Rescues LTP. *Hippocampus*, 11(2), 168–175. <https://doi.org/10.1002/hipo.1034>
- Korte, M., & Schmitz, D. (2016). Cellular and system biology of memory: timing, molecules, and beyond. *Physiological Reviews*, 96(2), 647–693. <https://doi.org/10.1152/physrev.00010.2015>
- Kreitzer, A. C. (2009). Physiology and pharmacology of striatal neurons. *Annual Review of Neuroscience*, 32, 127–47. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.051508.135422>
- Lacey, C. J., Bolam, J. P., & Magill, P. J. (2007). Novel and distinct operational principles

- of intralaminar thalamic neurons and their striatal projections. *Journal of Neuroscience*, 27(16), 4374–4384. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5519-06.2007>
- Lamprecht, R., Hazvi, S., & Dudai, Y. (1997). cAMP Response element-binding protein in the amygdala is required for long- but not short-term conditioned taste aversion memory. *The Journal of Neuroscience*, 17(21), 8443–50. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9334416>
- Le Moine, C., Svenningsson, P., Fredholm, B. B., & Bloch, B. (1997). Dopamine-adenosine interactions in the striatum and the globus pallidus: inhibition of striatopallidal neurons through either D2 or A2A receptors enhances D1 receptor-mediated effects on c-fos expression. *The Journal of Neuroscience*, 17(20), 8038–8048. Retrieved from [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9315922](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9315922)
- Lechner, H. A., Squire, L. R., & Byrne, J. H. (1999). 100 Years of consolidation-Remembering Müller and Pilzecker. *Neurobiology of Learning and Memory*, 77–87.
- Leviel, V., Chéramy, A., & Glowinski, J. (1979). Role of the dendritic release of dopamine in the reciprocal control of the two nigro-striatal dopaminergic pathways. *Nature*, 280, 236–239.
- Levine, M., & Tjian, R. (2003). Transcription regulation and animal diversity. *Nature*, 424, 147–151.
- Lobo, M. K., Zaman, S., Damez-Werno, D. M., Koo, J. W., Bagot, R. C., DiNieri, J. A., ... Nestler, E. J. (2013). [delta] FosB induction in striatal medium spiny neuron subtypes in response to chronic pharmacological, emotional, and optogenetic stimuli. *Journal of Neuroscience*, 33(47), 18381–18395. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1875-13.2013>
- Lonze, B. E., & Ginty, D. D. (2002). Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron*, 35(4), 605–623. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00828-0](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00828-0)
- Macdermott, A. B., Mayer, M. L., Westbrook, G. L., Smith, S. J., & Barker, J. L. (1986). NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurones. *Nature*, 321(6069), 519–522. <https://doi.org/10.1038/321519a0>



- Marín Juárez, T. A. (2016). *Densidad y morfología de las espinas dendríticas en la corteza insular relacionadas con el aprendizaje normal e incrementado de evitación inhibitoria*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Mayr, B., & Montminy, M. (2001). Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor creb. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(8), 599–609. <https://doi.org/10.1038/35085068>
- McDonald, R. J., & White, N. M. (1993). A triple dissociation of memory systems: Hippocampus, amygdala, and dorsal striatum. *Behavioral Neuroscience*, 1207, 3–22. <https://doi.org/10.1037/a0034883>
- McGaugh, J. L. (1966). Time-Dependent Processes in Memory Storage. *Science*, 153(3742), 1351–1358. <https://doi.org/10.1126/science.153.3742.1351>
- Mcgaugh, J. L., McIntyre, C. K., & Power, A. E. (2002). Amygdala Modulation of Memory Consolidation : Interaction with Other Brain Systems. *Neurobiology of Learning and Memory*, 78, 539–552. <https://doi.org/10.1006/nlme.2002.4082>
- Meberg, P. J., Kinney, W. R., Valcourt, E. G., & Routtenberg, A. (1996). Gene expression of the transcription factor NF- $\kappa$  B in hippocampus: regulation by synaptic activity. *Molecular Brain Research*, 38(2), 179–190. [https://doi.org/10.1016/0169-328X\(95\)00229-L](https://doi.org/10.1016/0169-328X(95)00229-L)
- Meffert, M. K., & Baltimore, D. (2005). Physiological functions for brain NF- $\kappa$ B. *Trends in Neurosciences*, 28(1), 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.11.002>
- Merlo, E., Freudenthal, R., & Romano, A. (2002). The I $\kappa$ B kinase inhibitor sulfasalazine impairs long-term memory in the crab Chasmagnathus. *Neuroscience*, 112(1), 161–172. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(02\)00049-0](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(02)00049-0)
- Milner, B. (1962). Les troubles de la memoire accompagnant des lesions hippocampiques bilaterales. In P. Passouant (Ed.), *Physiologie de l'Hippocampe* (pp. 257–272). Paris: Éditions Recherche Scientifique. Retrieved from [http://www.amazon.co.uk/Physiologie-lHippocampe-Colloques-Internationaux-1961/dp/B003LWBKNA/ref=sr\\_1\\_1?s=books&ie=UTF8&qid=1403770760&sr=1-1&keywords=physiologie+de+l%2527hippocampe](http://www.amazon.co.uk/Physiologie-lHippocampe-Colloques-Internationaux-1961/dp/B003LWBKNA/ref=sr_1_1?s=books&ie=UTF8&qid=1403770760&sr=1-1&keywords=physiologie+de+l%2527hippocampe)
- Mishkin, M., & Petri, H. L. (1984). Memories and habits: Some implications for the analysis of learning and retention. In L. R. Squire & N. Butters (Eds.),

*Neuropsychology of Memory*. New York: Guilford.

- Mizuno, M., Yamada, K., Maekawa, N., Saito, K., Seishima, M., & Nabeshima, T. (2002). CREB phosphorylation as a molecular marker of memory processing in the hippocampus for spatial learning. *Behavioural Brain Research*, *133*(2), 135–141. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(01\)00470-3](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(01)00470-3)
- Mogenson, G. J., Jones, D. L., & Yim, C. Y. (1980). From motivation to action: Functional interface between the limbic system and the motor system, 69–97.
- Molochnikov, I., & Cohen, D. (2014). Hemispheric differences in the mesostriatal dopaminergic system. *Frontiers in Systems Neuroscience*, *8*(June), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2014.00110>
- Moncada, D., & Viola, H. (2006). Phosphorylation state of CREB in the rat hippocampus: A molecular switch between spatial novelty and spatial familiarity? *Neurobiology of Learning and Memory*, *86*(1), 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2005.12.002>
- Monsma, F. J., Mahan, L. C., McVittie, L. D., Gerfen, C. R., & Sibley, D. R. (1990). Molecular cloning and expression of a D1 dopamine receptor linked to adenylyl cyclase activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *87*(17), 6723–6727.
- Montminy, M. (1997). Transcriptional Regulation By Cyclic Amp. *Annual Review of Biochemistry*, *66*(1), 807–822. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.66.1.807>
- Müller, G. E., & Pilzecker, A. (1900). *Experimentelle Beiträge zur Lehre vom Gedächtnis*. *Z. Psychol. Ergänzungsband*.
- National Research Council. (2011). *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (8th Ed.). Washington DC: National Academy of Sciences, ED.
- Nielsen, D. M., Visker, K. E., Cunningham, M. J., Keller, R. W., Glick, S. D., & Carlson, J. N. (1997). Paw preference, rotation, and dopamine function in Collins HI and LO mouse strains. *Physiology and Behavior*, *61*(4), 525–535. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(96\)00496-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(96)00496-9)
- Nieoullon, A., Cheramy, A., & Glowinski, J. (1977). Interdependence of the nigrostriatal dopaminergic systems on the two sides of the brain in the cat. *Science*, *198*(4), 416–418. Retrieved from <http://www.sciencemag.org/content/198/4315/416.short>
- Nisenbaum, L. K., Kitai, S. T., Crowley, W. R., & Gerfen, C. R. (1994). Temporal

- dissociation between changes in striatal enkephalin and substance P messenger RNAs following striatal dopamine depletion. *Neuroscience*, 60(4), 927–937.
- Orman, R., & Stewart, M. (2007). Hemispheric differences in protein kinase C  $\beta$ II levels in the rat amygdala: Baseline asymmetry and lateralized changes associated with cue and context in a classical fear conditioning paradigm. *Neuroscience*, 144(3), 797–807. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.10.017>
- 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. *Journal of Neuroscience*, 9(5), 1465–1472. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0270-89.1989>
- Packard, M. G., & Knowlton, B. J. (2002). Learning and Memory Functions of the Basal Ganglia. *Annual Review of Neuroscience*, 25(1), 563–593. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.25.1.563>
- Paratcha, G., Furman, M., Bevilacqua, L., Cammarota, M., Vianna, M. R. M., Levi De Stein, M., ... Medina, J. H. (2000). Involvement of hippocampal PKC $\beta$ 1 isoform in the early phase of memory formation of an inhibitory avoidance learning. *Brain Research*, 855(2), 199–205. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10677591>
- Parker, D., Ferreri, K., Nakajima, T., LaMorte, V. J., Evans, R., Koerber, S. C., ... Montminy, M. R. (1996). Phosphorylation of CREB at Ser-133 induces complex formation with CREB-binding protein via a direct mechanism. *Molecular and Cellular Biology*, 16(2), 694–703. <https://doi.org/10.1128/MCB.16.2.694>
- Patapoutian, A., & Reichardt, L. F. (2001). Trk receptors: Mediators of neurotrophin action. *Current Opinion in Neurobiology*, 11(3), 272–280. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(00\)00208-7](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(00)00208-7)
- Pavlov, I. P. (1927). Conditioned reflexes: an investigation of the physiological activity of the cerebral cortex. *Oxford University Press*, xv-430. <https://doi.org/10.2307/1134737>
- Pennartz, C. M. A., Groenewegen, H. J., & Lopes da Silva, F. H. (1994). The nucleus accumbens as a complex of functionally distinct neuronal ensembles: An integration of behavioural, electrophysiological and anatomical data. *Progress in Neurobiology*, 42(6), 719–761. [https://doi.org/10.1016/0304-0082\(94\)90025-6](https://doi.org/10.1016/0304-0082(94)90025-6)
- 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. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(89\)90076-2](https://doi.org/10.1016/0361-9230(89)90076-2)
- Phelps, E. A. (2007). Understanding learning: Specific challenges in merging the levels of analysis. In Y. D. and S. M. F. H.L. Roediger (Ed.), *Science of Memory: Concepts*. (pp. 45–48). New York: Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780195310443.003.0003>
- Pinna, A., Wardas, J., Cristalli, G., & Morelli, M. (1997). Adenosine A(2A) receptor agonists increase Fos-like immunoreactivity in mesolimbic areas. *Brain Research*, 759(1), 41–49. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(97\)00214-X](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(97)00214-X)
- Pistell, P. J., Nelson, C. M., Miller, M. G., Spangler, E. L., Ingram, D. K., & Devan, B. D. (2009). Striatal lesions interfere with acquisition of a complex maze task in rats. *Behavioural Brain Research*, 197(1), 138–143. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.08.015>
- Prado-Alcalá, R. A., & Bermúdez-Rattoni, F. (2001). *Memoria: dónde reside y cómo se forma* (Primera ed). México D.F.: Editorial Trillas.
- Prado-Alcalá, R. A., Bermúdez-Rattoni, F., Velázquez-Martínez, D. N., & Bacha, G. (1978). Cholinergic blockade of the caudate nucleus and spatial alternation performance in rats: Overtraining induced protection against behavioral deficits. *Life Sciences*, 23(9), 889–896. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(78\)90213-8](https://doi.org/10.1016/0024-3205(78)90213-8)
- Prado-Alcalá, R. A., Cobos-Zapíaín, G., Salado-Castillo, R., Quiroz, C., Garín-Aguilar, M. E., Díaz-Trujillo, A., ... Quirarte, G. L. (2006). El aprendizaje incrementado protege a la memoria contra tratamientos amnésicos. *Revista Mexicana de Análisis de La Conducta*, 2(Dic), 203–218.
- Prado-Alcalá, R. A., Kaufmann, P., & Moscona, R. (1980). Scopolamine and KCl injections into the caudate nucleus. Overtraining-induced protection against deficits of learning. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 12(2), 249–253. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(80\)90364-0](https://doi.org/10.1016/0091-3057(80)90364-0)
- 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. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2012-0061>

- 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. <https://doi.org/10.1007/s00221-003-1704-1>
- Reynolds, G. S. (1968). *Compendio de condicionamiento operante*. Mexico: Ciencia de la Conducta.
- Riedel, G., Platt, B., & Micheau, J. (2003). Glutamate receptor function in learning and memory. *Behavioural Brain Research*, *140*(1–2), 1–47. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(02\)00272-3](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(02)00272-3)
- Rinaldi, A., Oliverio, A., & Mele, A. (2012). Spatial memory, plasticity and nucleus accumbens. *Reviews in the Neurosciences*, *23*(5–6), 527–541. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2012-0070>
- Roberson, E. D., English, J. D., Adams, J. P., Selcher, J. C., Kondratieck, C., & Sweatt, J. D. (1999). The mitogen-activated protein kinase cascade couples PKA and PKC to cAMP response element binding protein phosphorylation in area CA1 of hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, *19*(11), 4337–4348. <https://doi.org/10341237>
- Robertson, G. S., Vincent, S. R., & Fibiger, H. C. (1992). D1 and D2 Dopamine Receptors Differentially Regulate c-fos Expression in Striatonigral and Striatopallidal Neurons. *Neuroscience*, *49*(2), 285–296.
- Roediger, H. L., Dudai, Y., & Frizpatrick, S. M. (2007). *SCIENCE OF MEMORY: CONCEPTS*. New York, New York: Oxford University Press.
- Salado-Castillo, R., Sánchez-Alavez, 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*(December), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2011.00083>
- Sassone-Corsi, P. (1995). Transcription factors responsive to cAMP. *Cell*, 355–377. Retrieved from <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.biochem.66.1.807>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., ... Cardona, A. (2012). Fiji: An open source platform for biological image analysis. *Nature Methods*, *9*(7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019.Fiji>

- Schneider, L. H., Murphy, R. B., & Coons, E. E. (1982). Lateralization of striatal dopamine (D2) receptors in normal rats. *Neuroscience Letters*, *33*(3), 281–284. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(82\)90385-8](https://doi.org/10.1016/0304-3940(82)90385-8)
- Scicli, A. P., Petrovich, G. D., Swanson, L. W., & Thompson, R. F. (2004). Contextual Fear Conditioning Is Associated with Lateralized Expression of the Immediate Early Gene c-fos in the Central and Basolateral Amygdalar Nuclei. *Behavioral Neuroscience*, *118*(1), 5–14. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.118.1.5>
- Scoville, W. B., & Milner, B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*, *20*(11), 11–21. <https://doi.org/10.1136/jnnp.20.1.11>
- Shen, W., Tian, X., Day, M., Ulrich, S., Tkatch, T., Nathanson, N. M., & Surmeier, D. J. (2007). Cholinergic modulation of Kir2 channels selectively elevates dendritic excitability in striatopallidal neurons. *Nature Neuroscience*, *10*(11), 1458–1466. <https://doi.org/10.1038/nn1972>
- Sheng, M., & Greenberg, M. E. (1990). The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron*, *4*(4), 477–485. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(90\)90106-P](https://doi.org/10.1016/0896-6273(90)90106-P)
- Sheng, M., Thompson, M. A., & Greenberg, M. E. (1989). CREB: A Ca<sup>2+</sup>-Regulated Transcription Factor Phosphorylated by Calmodulin-Dependent Kinases GAL4-B17. *Science*.
- Shieh, P. B., Hu, S.-C., Bobb, K., Timmusk, T., & Ghosh, A. (1998). Identification of a Signaling Pathway Involved in Calcium Regulation of BDNF Expression. *Neuron*, *20*(4), 727–740. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)81011-9](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)81011-9)
- Silva, A. J., Kogan, J. H., Frankland, P. W., & Kida, S. (1998). CREB and memory. *Annual Review of Neuroscience*, *21*(1), 127–148. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.21.1.127>
- Skinner, B. F. (1974). *About Behavior*. New York: Random House.
- 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. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(02\)01684-3](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(02)01684-3)

- Squire, L. R. (1992). Memory and the hippocampus : A synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychological Review*, 99(2), 195–231. <https://doi.org/10.1037/0033-295X.99.3.582>
- Squire, L. R. (2009). The legacy of patient H.M. for neuroscience. *Neuron*, 18(9), 1199–1216. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.12.023>
- Squire, L. R., & Barondes, S. H. (1974). Anisomycin, like other inhibitors of cerebral protein synthesis, impairs “Long-term” memory of discrimination task. *Brain Research*, 66, 301–308. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0006-8993\(74\)90148-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0006-8993(74)90148-6)
- Squire, L. R., & Dede, A. J. O. (2015). Conscious and unconscious memory systems. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(3), a021667. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021667>
- Squire, L. R., & Kandel, E. R. (2009). *MEMORY: From mind to molecules* (2nd ed.). Roberts and Company Publishers.
- Squire, L. R., & Zola-Morgan, S. (1988). Memory: brain systems and behavior. *Trends in Neurosciences*, 11(4), 170–175.
- Stanciu, M., Radulovic, J., & Spiess, J. (2001). Phosphorylated cAMP response element binding protein in the mouse brain after fear conditioning: relationship to Fos production. *Brain Research. Molecular Brain Research*, 94, 15–24. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(01\)00174-7](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(01)00174-7)
- Steiner, H. (2017). Psychostimulant-induced gene regulation in striatal circuits. In *Handbook of Basal Ganglia Structure and Function* (pp. 639–672).
- Sullivan, R. M., & Dufresne, M. M. (2006). Mesocortical dopamine and HPA axis regulation: Role of laterality and early environment. *Brain Research*, 1076(1), 49–59. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.12.100>
- Sullivan, R. M., & Gratton, A. (1998). Relationships between stress-induced increases in medial prefrontal cortical dopamine and plasma corticosterone levels in rats: Role of cerebral laterality. *Neuroscience*, 83(1), 81–91. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(97\)00370-9](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(97)00370-9)
- Surmeier, D. J., Ding, J., Day, M., Wang, Z., & Shen, W. (2007). D1 and D2 dopamine-receptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal medium spiny neurons. *Trends in Neurosciences*, 30(5). <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.03.008>

- Taubenfeld, S. M., Milekic, M. H., Monti, B., & Alberini, C. M. (2001). The consolidation of new but not reactivated memory requires hippocampal C/EBP $\beta$ . *Nature Neuroscience*, *4*(8), 813–818. <https://doi.org/10.1038/90520>
- Taubenfeld, S. M., Wiig, K. A., Monti, B., Dolan, B., Pollonini, G., & Alberini, C. M. (2001). Fornix-dependent induction of hippocampal CCAAT enhancer-binding protein [beta] and [delta] Co-localizes with phosphorylated cAMP response element-binding protein and accompanies long-term memory consolidation. *The Journal of Neuroscience*, *21*(1), 84–91. <https://doi.org/21/1/84> [pii]
- Teather, L. A., Packard, M. G., Smith, D. E., Ellis-Behnke, R. G., & Bazan, N. G. (2005). Differential induction of c-Jun and Fos-like proteins in rat hippocampus and dorsal striatum after training in two water maze tasks. *Neurobiology of Learning and Memory*, *84*(2), 75–84. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2005.03.006>
- Tischmeyer, W., Grimm, R., Schicknik, H., Brysch, W., & Schlingensiepen, K.-H. (1994). Sequence-specific impairment of learning by c-jun antisense oligonucleotides. *Neuroreport*, *5*(12), 1551–1504.
- Trifilieff, P., Herry, C., Vanhoutte, P., Caboche, J., Desmedt, A., Rindel, G., ... Jaques, M. (2006). Foreground contextual fear memory consolidation requires two independent phases of hippocampal ERK/CREB activation. *Learning & Memory*, *13*(3), 349–358. <https://doi.org/10.1101/lm.80206>
- Tulving, E. (1984). Precis of elements of episodic memory. *The Behavioral and Brain Sciences*. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1017/S0140525X0004440X>
- Tulving, E., & Thomson, M. D. (1973). Encondin specificity and retrieval processes in episodic memory. *Psychological Review*, *80*(5), 352–373.
- 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. <https://doi.org/22/23/10067> [pii]
- Vianna, M. R. M., Alonso, M., Viola, H., Quevedo, J., De-Paris, F., Furman, M., ... Izquierdo, I. (2000). Role of hippocampal signaling pathways in long-term memory formation of a nonassociative learning task in the rat. *Learning & Memory*, *7*(5), 333–340. <https://doi.org/10.1101/lm.34600>



- Vianna, M. R. M., Izquierdo, L. A., Barros, D. M., Ardenghi, P., Pereira, P., Rodrigues, C., ... Izquierdo, I. (2000). Differential role of hippocampal camp-dependent protein kinase in short- and long-term memory. *Neurochemical Research*, 25(5), 621–626. <https://doi.org/10.1023/A:1007502918282>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.06.006>
- Wang, J. Q., & McGinty, J. F. (1996). Scopolamine augments c-fos and zip/268 messenger RNA expression induced by the full D(1) dopamine receptor agonist SKF-82958 in the intact rat striatum. *Neuroscience*, 72(3), 601–616. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(95\)00597-8](https://doi.org/10.1016/0306-4522(95)00597-8)
- Warburton, E. C., Glover, C. P. J., Massey, P. V., Wan, H., Johnson, B., Bienemann, A., ... Brown, M. W. (2005). cAMP Responsive element-binding protein phosphorylation is necessary for perirhinal long-term potentiation and recognition memory. *Journal of Neuroscience*, 25(27), 6296–6303. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0506-05.2005>
- West, A. E., Chen, W. G., Dalva, M. B., Dolmetsch, R. E., Kornhauser, J. M., Shaywitz, A. J., ... Greenberg, M. E. (2001). Calcium regulation of neuronal gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(20), 11024–31. <https://doi.org/10.1073/pnas.191352298>
- Westphal, R. S., Tavalin, S. J., Lin, J. W., Alto, N. M., Fraser, I. D. C., Langeberg, L. K., ... Scott, J. D. (1999). Regulation of NMDA receptors by an associated phosphatase-kinase signaling complex. *Science*, 285(July), 93–96.
- Winograd, M., & Viola, H. (2004). Detection of novelty, but not memory of spatial habituation, is associated with an increase in phosphorylated cAMP response element-binding protein levels in the hippocampus. *Hippocampus*, 14(1), 117–123. <https://doi.org/10.1002/hipo.10153>
- Worley, P. F., Cole, a J., Saffen, D. W., & Baraban, J. M. (1990). Regulation of immediate early genes in brain: role of NMDA receptor activation. *Progress in Brain Research*, 86, 277–85. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1965055>
- Xing, J., Ginty, D. D., & Greenberg, M. E. (1996). Coupling of the RAS-MAPK Pathway to Gene Activation by RSK2, a Growth Factor-REgulates CREB Kinase. *Science*,

273(August), 959–963.

- Yin, H. H., & Knowlton, B. J. (2006). The role of the basal ganglia in habit formation. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(6), 464–476. <https://doi.org/10.1038/nrn1919>
- Yin, J. C. P., Del Vecchio, M., Zhou, H., & Tully, T. (1995). CREB as memory modulator: Induced Expression of dCREB2 activator isoform enhances long-term memory in drosophila. *Cell*, 81(1), 107–115. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90375-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90375-5)
- Yin, J. C. P., Wallach, J. S., Del Vecchio, M., Wilder, E. L., Zhou, H., Quinn, W. G., & Tully, T. (1994). Induction of a dominant negative CREB transgene specifically blocks long-term memory in Drosophila. *Cell*, 79(1), 49–58. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90399-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90399-9)
- Yoshida, M., & Precht, W. (1971). Monosynaptic inhibition of neurons of the substantia nigra by caudate -nigral fibers. *Brain Res.*, 32(Cd), 225–228.
- Young, E. J., & Williams, C. L. (2010). Valence dependent asymmetric release of norepinephrine in the basolateral amygdala. *Behavioral Neuroscience*, 124(5), 633–644. <https://doi.org/10.1037/a0020885>
- Young, E. J., & Williams, C. L. (2013). Differential activation of amygdala Arc expression by positive and negatively valenced emotional learning conditions. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 7(December), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2013.00191>

## **X. ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura 1 .-Diagrama de clasificación de la memoria en mamíferos.....	4
Figura 2.- Representación esquemática de la formación de una memoria de largo plazo. ....	6
Figura 3 .- Esquema de fases de la tarea de evitación inhibitoria. ....	8
Figura 4.-Efecto protector de la memoria ante un inhibidor de la síntesis de proteínas .....	10
Figura 5.-Tipo de neuronas en el estriado. ....	11
Figura 6.- Diagrama de circuitos principales en los núcleos basales en un plano sagital ....	13
Figura 7.- Representación de corte coronal de cerebro de roedores mostrando la corteza y el cuerpo estriado.....	15
Figura 8.- Sistemas de memoria en el estriado.....	16
Figura 9.- Visión general de las vías de señalización que convergen en la fosforilación de CREB.....	21
Figura 10.- Regiones del estriado seleccionadas para la captura de imágenes.....	31
Figura 11.- Criterios de selección para conteo celular .....	33
Figura 12.- Línea temporal del experimento de extinción.....	35
Figura 13.- Línea temporal del experimento de fosforilación de CREB en un entrenamiento moderado e intenso.....	36
Figura 14.- Curva de extinción de la tarea de evitación inhibitoria .....	38
Figura 15.- Entrenamiento en la tarea de evitación inhibitoria .....	39
Figura 16.- Proporción de núcleos pCREB positivos en ambos estriado izquierdo y derecho.....	40
Figura 17.- Regionalización del estriado y la activación de CREB .....	41
Figura 18.- Proporción de núcleos pCREB positivos en la región dorsal del estriado izquierdo y derecho. ....	43
Figura 19.- Proporción de núcleos pCREB positivos en el estriado ventral izquierdo y en el derecho.....	44