



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

DIFERENCIACIÓN REGIONAL DE LA EXPRESIÓN DE ARC EN EL ESTRIADO  
PROVOCADA POR UN APRENDIZAJE AVERSIVO MEDIADO POR DIFERENTES  
INTENSIDADES DE CHOQUE ELÉCTRICO

Tesis para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias (Neurobiología)

Presenta:

Diego Alexander Gonzalez Franco

Tutores:

Dra. Gina Lorena Quirarte

Dr. Víctor Ramírez Amaya

UNAM CAMPUS JURQUILLA, QUERÉTARO, QRO. AGOSTO, 2011



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

Los miembros del Comité Tutor certificamos que la tesis elaborada por: Diego Alexander Gonzalez Franco, cuyo título es: "MAPEO DE LA ACTIVIDAD NEURONAL DEL ESTRIADO EN UNA TAREA DE EVITACIÓN ENTRENADA CON DIFERENTES INTENSIDADES DE CHOQUE ELÉCTRICO" se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

**Firman**

**Presidente**

Dr. \_\_\_\_\_

**Secretario (Tutor)**

Dr. \_\_\_\_\_

**Vocal**

Dr. \_\_\_\_\_

**Suplente**

Dr. \_\_\_\_\_

**Suplente**

Dr. \_\_\_\_\_

**Aprobado por el Comité Académico**

\_\_\_\_\_  
**Coordinador del Programa**

## RESUMEN

El bloqueo de la actividad neuronal en el estriado, produce deficiencias en la memoria, sin embargo, al someter a los animales a experiencias de aprendizaje incrementado estos tratamientos se hacen inocuos. Una hipótesis es que en estas condiciones, un mayor número de circuitos neuronales son reclutados y una traza múltiple previene la pérdida de la memoria. Utilizando la detección de la proteína del gen de expresión inmediata temprana Arc como indicador de actividad neuronal se mapeó el estriado durante la adquisición y evocación de una tarea de evitación activa de un ensayo en grupos independientes de ratas, administrándoles diferentes intensidades de choque eléctrico (0.5, 1.0 o 2.0 mA), además se estudió un grupo que no recibió choque eléctrico, otro que se le aplicó el choque más alto sin entrenarlo y un grupo intacto. Se detectó la proteína de Arc, con inmunohistoquímica, en cortes coronales y se analizó el área de señal de las imágenes obtenidas. Los resultados muestran un aumento diferencial en la expresión de Arc en diferentes regiones del estriado únicamente cuando los animales son sometidos a una experiencia de aprendizaje incrementado (2.0 mA), es decir, a mayor intensidad utilizada en el entrenamiento, mayor es el número de células que expresan Arc en las regiones ventrales y no en las dorsales del estriado. Cuando se administró el choque eléctrico alto, sin entrenamiento, no se presentó esta activación. Estos datos sugieren que la experiencia de aprendizaje incrementado recluta un mayor número de unidades neuronales en la región ventral del estriado.

## SUMMARY

The blockade of neural activity in the striatum, produce memory deficiencies; however when animals are over-trained such treatments become innocuous. One hypothesis is that as a consequence of over-training, more circuits are recruited and a multiple trace prevents memory loss. In recent years Arc, an immediate early genes that is readily expressed by neuronal activity, has been used to map brain regions involved in information processing during learning acquisition and memory retrieval. To study a potential mechanism of the protective effect of enhanced learning against amnesic treatments, groups of rats were trained in a one-trial active avoidance task, using different intensities of foot-shock (0.5, 1.0 or 2.0 mA) during training. We also studied a group that was trained but did not receive foot-shock, an untrained group that received the higher foot-shock, and a caged group. Twenty-micron slices were prepared for immunohistochemistry to detect Arc protein, and a signal-area analysis was made. Our data showed a differential increase of Arc expression in different regions of striatum, when animals were submitted to the enhanced learning experience (training with 2.0 mA), but not in the low or normal learning experience, i.e., the higher the foot-shock intensity used during training, the higher the density of Arc expressing cells in the ventral but not in the dorsal striatum. Importantly, the shock alone did not produce a significant increase in Arc expression. These data suggest that the higher intensity of training recruits more neural units in the ventral striatum.

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo a mi madre María Elena Franco Hernández, quien desde el inicio de mi vida me ha dado la fuerza para seguir adelante día tras día, enseñándome que las dificultades son momentáneas, que la paciencia y la perseverancia vencen todo obstáculo, que lo que bien se aprende jamás se olvida y que todo lo hecho con amor siempre quedara bien.

También dedico mis esfuerzos a mi padre Rodrigo Gonzalez Tovar, del que aprendí su inventiva y la curiosidad científica, el carácter y la capacidad de improvisar cuando la situación lo amerita.

Dedico de igual forma esta investigación a mi hermano Fabián Andrés Gonzalez Franco el cual en gran medida es mi mayor motivo de superación, para darle todo lo que he logrado y darle ese empujón que lo lleve más cerca de sus metas.

Por ultimo quiero extender esta dedicatoria a todo el resto de mi familia quienes siempre han creído en mis capacidades, que me han brindado su apoyo incondicional y han puesto su esfuerzo y dedicación en ayudar a hacer realidad mi sueño de ser un hombre de ciencia.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a mi padre, madre y hermano por el apoyo constante y por ser el motivo principal para emprender esta lucha y darles la oportunidad de que se sientan orgullosos de mí.

A la Dra. Gina Lorena Quirarte quien me abrió las puertas de su laboratorio y confió en mí sin conocerme, convirtiéndose en mucho más que una tutora, brindándome su apoyo constante desde el inicio de esta empresa y compartiendo su conocimiento y sus consejos, que cada día me han hecho un mejor investigador.

Al Dr. Víctor Ramírez Amaya por su valiosa orientación que permitió la realización de este proyecto y por su apoyo incondicional, brindándome un espacio en su laboratorio como uno más de sus estudiantes.

A las Doctoras Teresa Morales y Sara Cruz por su atención y paciencia en cada uno de los tutorales, por sus consejos y revisiones académicas que pulieron este trabajo y por las discusiones que me enseñaron a ser permeable a las críticas y a observar los datos desde distintos puntos de vista; de igual forma a la Dra Sofia Diaz quien colaboró dándole a este escrito un estilo y presentación inmejorable.

Al Dr Roberto Agustín Prado Alcalá por su apoyo y revisiones constantes por sus amables consejos y por siempre mostrar su interés en el avance de esta investigación.

Con gran afecto y nostalgia quiero agradecer a mi gran Amigo, compañero y colega Jorge García Torres (Q.E.P.D.) del que aprendí no solamente un gran repertorio de técnicas y conocimientos científicos si no que también recibí un infinito apoyo en todo momento y una gran cantidad de enseñanzas y consejos de la vida en general; le agradeceré infinitamente por haber compartido conmigo tantas buenas experiencias.

A mis compañeros de laboratorio Cristina, Robbi, Yectivani, Yavé, Sinuhe, Sofía, Karla, Alfredo y Raúl, por sus consejos y críticas en los ensayos para tutorales y congresos, por su amistad sincera y por haber compartido conmigo gran parte de su tiempo.

A mis otros compañeros de laboratorio quienes me recibieron como uno más de los suyos, me brindaron también mucho apoyo cuando lo necesite y compartieron conmigo sus opiniones y críticas, gracias Edgar, Jimena, Rafael, Mariana, Damaris y Livia.

A mis jurados de tesis, los Doctores Martha Escobar Rodríguez, Wendy Portillo Martínez, y Víctor De Lafuente Flores, quienes por medio de sus revisiones colaboraron en la creación de este documento.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Instituto de Neurobiología, a todas las personas que hacen parte de esta enorme maquinaria de investigación les agradezco por permitirme demostrar mis capacidades dejando en alto el nombre de mi País y de mis compatriotas.

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

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (Proyecto IN214111 e IN216510), UNAM. A la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM, número de cuenta 51045015-3.

A la invaluable ayuda técnica y académica del Sr. Ángel Méndez, el Dr. Carlos Lozano y la Dra. Andrea C. Medina y en especial forma al apoyo técnico y personal de la M.V.Z. Norma Serafín quien con su amabilidad, inteligencia e infinita paciencia me prestó su ayuda en esos momentos difíciles que tiene todo estudiante durante su formación.

A las unidades de apoyo:

- Biblioteca: Dr. Francisco J. Valles, y Lic. Soledad Medina Malagón.
- Cómputo: Ing. Ramón Martínez Olvera e Ing. Omar González.
- Videoconferencia: Lic. Ma. De Lourdes Lara Ayala
- Bioterio: M.V.Z. Martín García Servín.
- Enseñanza: M. en C. Leonor Casanova Rico.

## **AGRADECIMIENTO ESPECIAL**

Generalmente existe una persona la cual aporta más que todas las demás a la creación y realización de un proyecto, en este caso debo agradecer infinitamente al amor de mi vida Paola Cristina Bello Medina, gracias por el apoyo incondicional tanto académico y personal, por la paciencia titánica y el aliento que infundiste en mí todos estos meses, gracias por compartir todas estas experiencias a mi lado, por todas esas pequeñas y grandes cosas que hiciste por mí y que en este momento olvido ... por todo eso y más, simplemente gracias.

## ÍNDICE

RESUMEN.....	II
SUMMARY .....	III
DEDICATORIA.....	IV
AGRADECIMIENTOS .....	V
AGRADECIMIENTO ESPECIAL.....	VII
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. APRENDIZAJE Y MEMORIA .....	1
1. Aprendizajes no asociativos.....	2
2. Aprendizajes asociativos .....	3
3. GENES DE EXPRESIÓN INMEDIATA.....	7
4. ARC COMO INDICADOR DE ACTIVIDAD .....	9
5. EL ESTRIADO .....	11
1. Anatomía .....	11
2. Citoarquitectura .....	15
3. Participación del estriado en el aprendizaje y la memoria .....	16
6. ANTECEDENTES RELEVANTES.....	18
1. Aprendizaje incrementado .....	18
7. JUSTIFICACIÓN .....	23
8. HIPÓTESIS.....	24
9. OBJETIVO GENERAL .....	24
10. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	24
11. SUJETOS MATERIALES Y MÉTODOS .....	25
11.1. Sujetos .....	25
11.2. Aparatos.....	25
11.3. Entrenamiento .....	26
11.4. Prueba.....	27

11.5.	Extracción y procesamiento de tejido.....	28
11.6.	Histología.....	29
11.7.	Análisis de imágenes.....	29
11.8.	Análisis estadístico.....	31
11.8.1.	Resultados conductuales .....	31
11.8.2.	Resultados histológicos .....	31
11.9.	Grupos y tratamientos .....	32
11.9.1.	Experimento 1 .....	32
11.9.2.	Experimento 2.....	32
12.	RESULTADOS .....	33
12.1.	Resultados conductuales.....	33
12.2.	Resultados histológicos.....	35
13.	DISCUSIÓN.....	41
13.1.	Modificación de la tarea de evitación .....	41
13.2.	Parámetros conductuales .....	44
13.3.	Actividad neuronal durante la adquisición .....	44
13.4.	Actividad neuronal durante la evocación .....	47
13.5.	Implicaciones teóricas.....	48
14.	CONCLUSIONES.....	49
15.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	50

## **1. INTRODUCCIÓN**

El aprendizaje y la memoria son los principales mecanismos de adaptación de los seres vivos a un medio ambiente cambiante. A la fecha se desconocen aspectos importantes de los mecanismos neurobiológicos que dan lugar a éstos procesos, sin embargo la aparición de nuevas herramientas para la investigación en el área de las neurociencias ha permitido un gran avance en este campo; de esta manera han surgido varias teorías e hipótesis sobre como el cerebro lleva a cabo estas tareas de procesamiento de información.

Estudios que utilizan las estrategias farmacológicas y de lesión, han concluido que el correcto funcionamiento de ciertas estructuras cerebrales tales como el hipocampo, el estriado y la amígdala, es necesario para la adquisición y el almacenamiento de diferentes tipos de información (Gold, 2003a; McDonald & White, 1993; Prado-Alcalá, 1985).

El estriado por su parte es la estructura implicada en el aprendizaje procedimental también conocido como de estímulo-respuesta y en el procesamiento de información de hábitos. Dicha estructura presenta una aparente homogeneidad en su citoarquitectura; pero la compartimentalización de las aferencias y eferencias así como su neuroquímica, han permitido proponer que ciertas regiones del estriado están involucradas diferencialmente en el procesamiento de información y por tanto que ciertos circuitos podrían ser reclutados según las características del aprendizaje.

## **2. APRENDIZAJE Y MEMORIA**

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

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

manejan y elaboran la información proporcionada por los sentidos.

En cuanto a la investigación de la memoria, Müller y Pilzecker (1892 y 1900) identificaron las leyes que rigen la formación y evocación de la memoria, concibiendo el concepto de consolidación e introduciéndolo a la literatura científica. Además concluyeron que la fijación de la memoria requiere de tiempo (consolidación) y que es vulnerable durante este periodo (Prado-Alcalá et al., 2006).

Sin embargo, debido a la dificultad para observar directamente los cambios ocurridos en el sistema nervioso producidos por estos procesos el investigador del aprendizaje basa siempre sus afirmaciones en la observación de conductas manifiestas, en general, de variaciones medibles en alguna función del organismo.

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

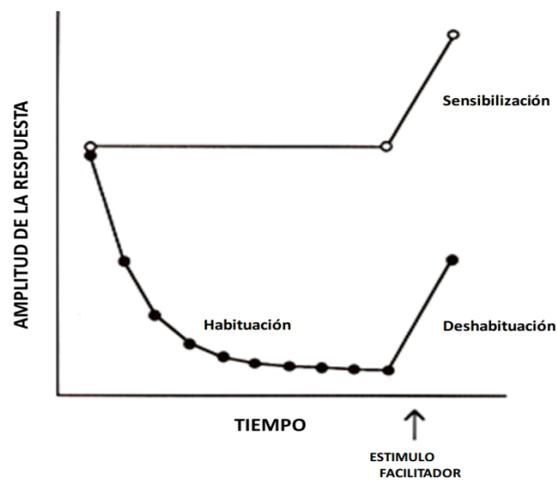
En cuanto a la medición de la memoria también se han implementado parámetros que se pueden medir conductualmente, como es el caso de las pruebas de retención en múltiples tareas conductuales, encaminadas a detectar el proceso en donde la consolidación juega un papel muy importante.

Otro aspecto del estudio del aprendizaje y la memoria es su clasificación; en cuanto al aprendizaje lo podemos diferenciar en dos categorías el aprendizaje asociativo y el aprendizaje no asociativo, que implican que el cambio conductual se debe a la experiencia repetida de dos eventos que aparecen relacionados en el tiempo (aprendizaje asociativo) o a la simple repetición de un único evento (aprendizaje no asociativo) (Anderson, Arellano, & Castañeda, 2001).

## **1. Aprendizajes no asociativos**

**La habituación** se refiere al decremento en la amplitud de la respuesta ocurrida en función de un estímulo repetido el cual debe tener la misma frecuencia e intensidad. **La deshabituación** describe la facilitación de una respuesta habituada por la presentación de un estímulo de diferente intensidad o frecuencia y la **sensibilización** se refiere a la facilitación de una respuesta, no habituada, por un

estímulo diferente, nocivo o más fuerte que el anterior (Figura 1) (Carew, Marcus, Nolen, Rankin, & Stopfer, 1990).



**Figura 1.** Tres formas de aprendizaje no asociativo: habituación, deshabituación, y sensibilización (Modificado de Carew et al., 1990).

## 2. Aprendizajes asociativos

Existen dos principales variedades en el aprendizaje asociativo las cuales son el condicionamiento pavloviano y el condicionamiento instrumental.

**Condicionamiento clásico o pavloviano:** este tipo de aprendizaje recibe este nombre porque fue inicialmente descrito y estudiado por Pavlov en sus famosos experimentos sobre la salivación en los perros. En estos estudios el sujeto es expuesto repetidamente a la asociación de dos estímulos ambientales; el sonido de una campana (E1 o estímulo condicionado) y la comida (E2 o estímulo incondicionado), esto permite a los animales aprender a anticiparse a sucesos biológicamente relevantes mediante la identificación de señales indicativas de los mismos (estímulos condicionados o EC). El conocimiento de la relación entre las señales y las consecuencias permite que conductas reflejas que inicialmente eran provocadas por un conjunto reducido de estímulos (estímulos incondicionados o EI) sean provocadas por nuevos estímulos que se convierten en estímulos condicionados, de modo que el animal actúa de forma anticipatoria, prediciendo la aparición del estímulo incondicionado (Carew et al., 1990).

**Condicionamiento instrumental:** permite al animal adquirir conductas que producen consecuencias, ya sea porque le procuran recompensas como alimento o compañía sexual o porque le permiten escapar o evitar situaciones peligrosas (Carew et al., 1990). Este aprendizaje es también conocido como condicionamiento operante, término que fue introducido por Skinner en 1938. En el condicionamiento operante las conductas se emiten espontáneamente y sus consecuencias determinan el aprendizaje. Las consecuencias agradables (reforzador) tienden a fortalecer una conducta, en cambio las consecuencias desagradables (castigo) tienden a debilitarla.

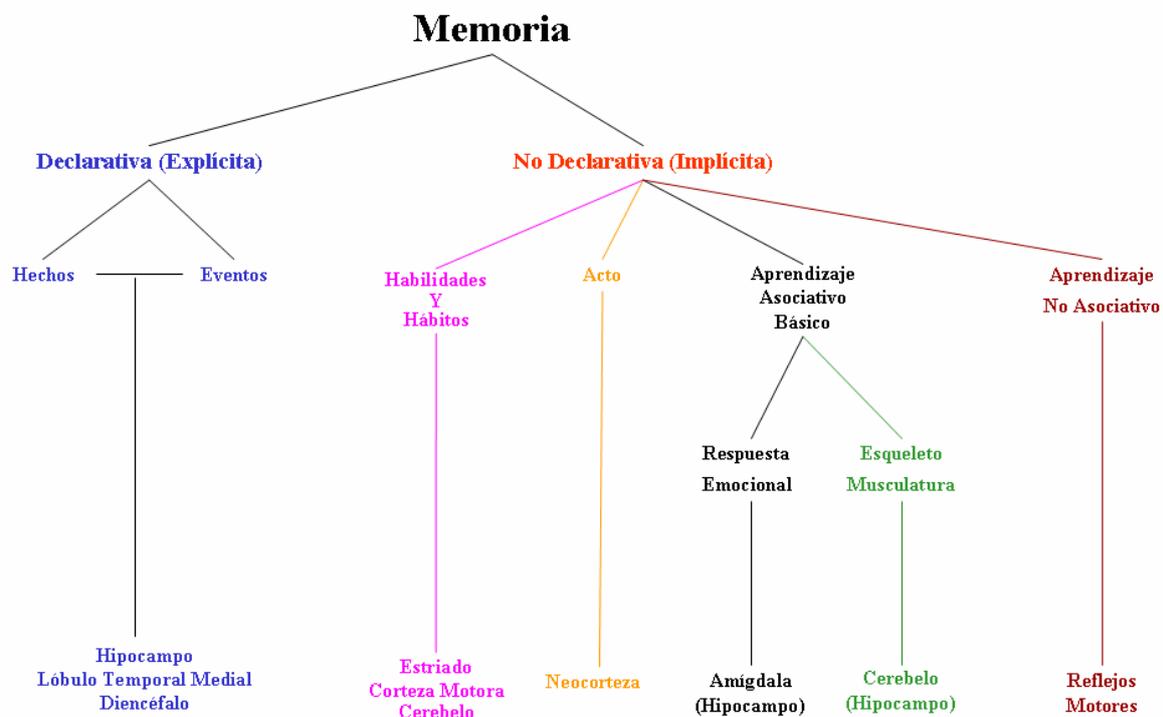
Por otro lado la memoria posee igualmente una gran variedad de clasificaciones y de autores por ejemplo: para referirse a la duración de los recuerdos, a finales del siglo XIX, William James acuñó los términos '*memoria primaria*' y '*memoria secundaria*' que son el equivalente moderno de las memorias de corto y largo plazo (citado en Prado-Alcalá et al., 2007). Por otro lado al clasificarlas según su propósito existen la memoria de trabajo y la memoria de referencia.

Otra forma de clasificar la memoria es según el tipo de información almacenada tras lo cual la podemos separar en memorias de procedimiento y memorias declarativas (según L. Squire, 1992) o también conocidas como memoria implícita y explícita (según E Tulving, 1972). Por último, podemos clasificarla según su dirección temporal en memoria retrospectiva y prospectiva.

Se han descrito estructuras específicas, cuya actividad es indispensable, como centro principal de procesamiento para que se almacenen diferentes tipos de memoria. Como ejemplo podemos señalar a la amígdala, el hipocampo, el estriado, diferentes áreas de la corteza cerebral entre otras estructuras que se encuentran reportadas en numerosos experimentos como principales responsables de la formación de los diferentes tipos de memoria (Figura 2).

Un estudio importante en este sentido, que sirve para ejemplificar la existencia de sistemas múltiples de memoria es el de McDonald y White (1993). En una elegante serie experimental, en la que utilizaron tres versiones del laberinto radial de ocho brazos, demostraron que el daño producido en el estriado impide el aprendizaje del tipo estímulo-respuesta (E-R) y por consiguiente el establecimiento de la memoria de procedimiento (aprendizaje de hábitos), mientras que las lesiones

de la amígdala o del hipocampo no interfieren con ella. Por otra parte, la lesión de la amígdala interfiere con el aprendizaje del tipo estímulo-reforzador (E-Rf) la cual impide la formación de la memoria emocional, no así la lesión del estriado o del hipocampo. Del mismo modo, la lesión del hipocampo interfiere con el aprendizaje estímulo-evento o también llamado estímulo-estímulo (E-E) impidiendo el almacenamiento de la información usada para la formación de mapas espaciales, cosa que no ocurre al lesionar el estriado o la amígdala. En otras palabras, encontraron estructuras cerebrales particulares de las que dependen aprendizajes y memorias particulares (White & McDonald, 2002).



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

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

La literatura reporta que Santiago Ramón y Cajal (1852-1934) dio el primer paso al intuir los procesos de plasticidad a partir de la forma de las neuronas y

proponer que el número y fuerza de las conexiones neuronales son la base física del aprendizaje y el soporte de la memoria. Posteriormente Donald Hebb (1949) propuso que los cambios en la eficiencia de la comunicación sináptica permitían el establecimiento de un orden en los patrones de actividad de grupos específicos de neuronas como el mecanismo mediante el cual se almacena la información en el sistema nervioso.

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

Diferentes investigaciones en el tema de la plasticidad sináptica hipocampal muestran que tanto el aprendizaje como la LTP producen cambios en la estructura de las conexiones sinápticas, y dado que este tipo de cambios tienden a persistir por más tiempo, se considera que estos pueden ser la base de la formación de la memoria de largo plazo.

Se ha demostrado que, en milisegundos, la actividad de espigas que llegan a una región presináptica glutamatérgica, promueve la liberación de este neurotransmisor al espacio sináptico, y así, se activan los receptores AMPA (por sus siglas en inglés  $\alpha$ -amino-3-hidroxy-5-metil-4-isoxazole propionic acid), causando la apertura de su poro, que permite el flujo de iones, principalmente  $\text{Na}^+$ , lo que da lugar a una despolarización postsináptica. Si la despolarización es lo suficientemente fuerte, lo que ocurre cuando se liberan altas concentraciones de neurotransmisor en respuesta a trenes de espigas de alta frecuencia, los receptores a NMDA (N-metil-D-aspartato) liberan el  $\text{Mg}^{+2}$  que los bloquean, permitiendo que el poro del receptor a NMDA se abra y permita el influjo postsináptico de  $\text{Ca}^{+2}$ . Lo que, activa cinasas que, modulando determinados sustratos, por un lado, inducen cambios en el citoesqueleto de la neurona en el plazo de minutos y, por otro, activan factores de

transcripción de ARNm y síntesis de proteínas para receptores AMPA, los cuales migran hacia los lugares modificados y en pocas horas, se insertan en la membrana y contribuyen a la estabilización de los cambios ocurridos en el citoesqueleto de la neurona postsináptica (Lamprecht & LeDoux, 2004). En todo este proceso, llama especialmente la atención la celeridad (minutos) con la que el aprendizaje es capaz de producir cambios morfológicos en el sistema nervioso (Figura 3).

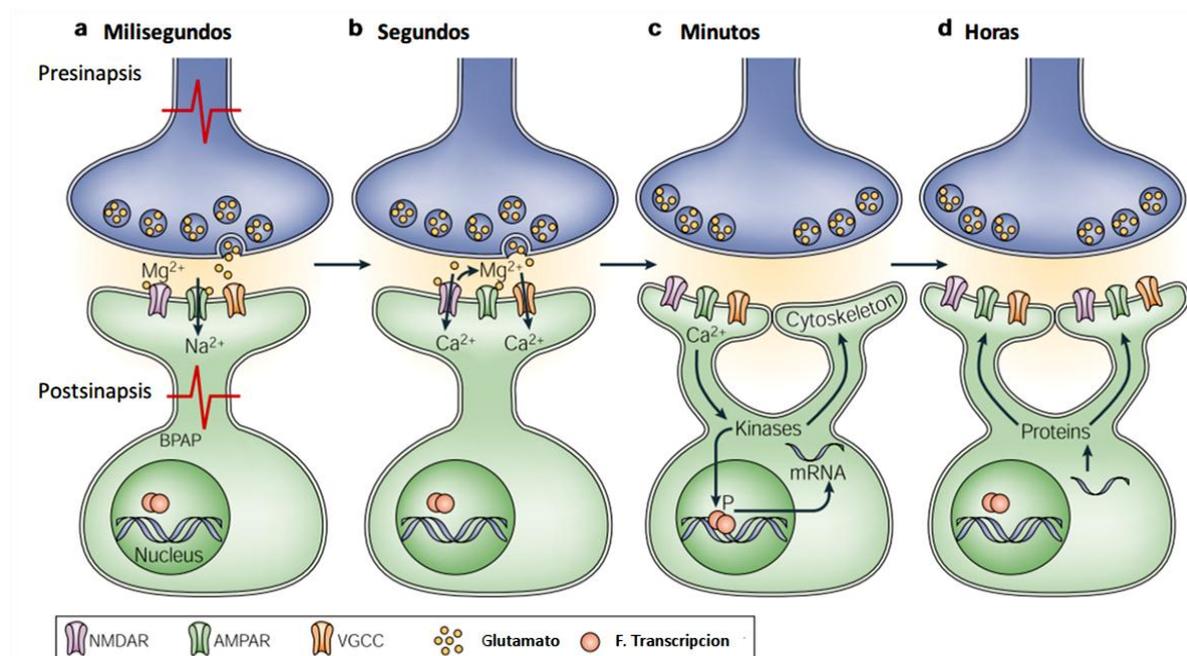
Las conexiones sinápticas pueden inducir un incremento o decremento en su eficiencia sináptica. Cuando se efectúa un incremento, como ya se dijo, se le denomina LTP; por el contrario, al decremento se le conoce como depresión a largo plazo (LTD, por sus siglas en inglés long-term depression), pues supone una disminución duradera en la magnitud de la respuesta post-sináptica excitadora (Bliss & Lomo, 1973). Tanto la LTP como la LTD dependen de la frecuencia de estimulación en la vía presináptica; una estimulación de alta frecuencia produce LTP, en cambio una de baja frecuencia produce LTD (Abbott & Nelson, 2000).

Los datos anteriores hacen que sea obvio que una de las hipótesis más aceptadas en la investigación de la consolidación de la memoria es que se requiere forzosamente de la activación de genes específicos que contienen la codificación necesaria para la síntesis de proteínas. De esta manera, la información derivada de una experiencia de aprendizaje podría quedar almacenada en virtud de cambios en la estructura y metabolismo neuronales (Bailey, Bartsch, & Kandel, 1996; Decker & McGaugh, 1991; Díaz-Trujillo et al., 2009; Rosenzweig, 1996; Stork & Welzl, 1999).

### **3. GENES DE EXPRESIÓN INMEDIATA**

Son muchos los genes que podrían estar involucrados en la consolidación de la memoria, pero entre estos destacan los genes de expresión inmediata temprana (IEG, por sus siglas en inglés immediate early gene). Estos genes tienen como principal característica que se expresan independientemente de la síntesis de nuevas proteínas por lo cual al ser activadas las células neuronales bajo la administración de inhibidores de síntesis de proteínas (por ejemplo anisomicina y cicloheximida) son los únicos en transcribirse; al mismo tiempo estos genes presentan una expresión en un tiempo muy corto, tanto en su transcripción como en su traducción, lo cual los convierte en una herramienta muy efectiva para el análisis de la activación neuronal (Worley et al., 1990).

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



**Figura 3. Mecanismos moleculares implicados en la iniciación y el mantenimiento de la plasticidad sináptica.** a) La liberación de glutamato dependiente de actividad proveniente de las neuronas presinápticas conduce a la activación de los receptores AMPA (AMPA) y a la despolarización de la neurona postsináptica. La despolarización ocurre localmente en la sinapsis y/o por la propagación inversa de potenciales de acción (BPAP). b) La despolarización de la neurona postsináptica permite la remoción del Mg<sup>2+</sup> que inhibe al receptor a NMDA (NMDAR) y así el Ca<sup>2+</sup> puede fluir a través del receptor. La despolarización también activa los canales de calcio dependientes de voltaje (VGCC), que es otra fuente de calcio para la sinapsis. c) El influjo de calcio en la sinapsis activa quinazas que a su vez, modulan la actividad de sus sustratos; estos sustratos contribuyen a los cambios locales en la sinapsis, como la alteración morfológica a través de la regulación citoesquelética, o inducen la transcripción de ARN en el núcleo mediante el control de factores de transcripción (F. transcripción). d) El transcrito de ARNm se traduce en proteínas que son capturadas por las sinapsis activadas y contribuyen a la estabilización de los cambios sinápticos. Modificado de Lamprecht y LeDoux (2004).

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

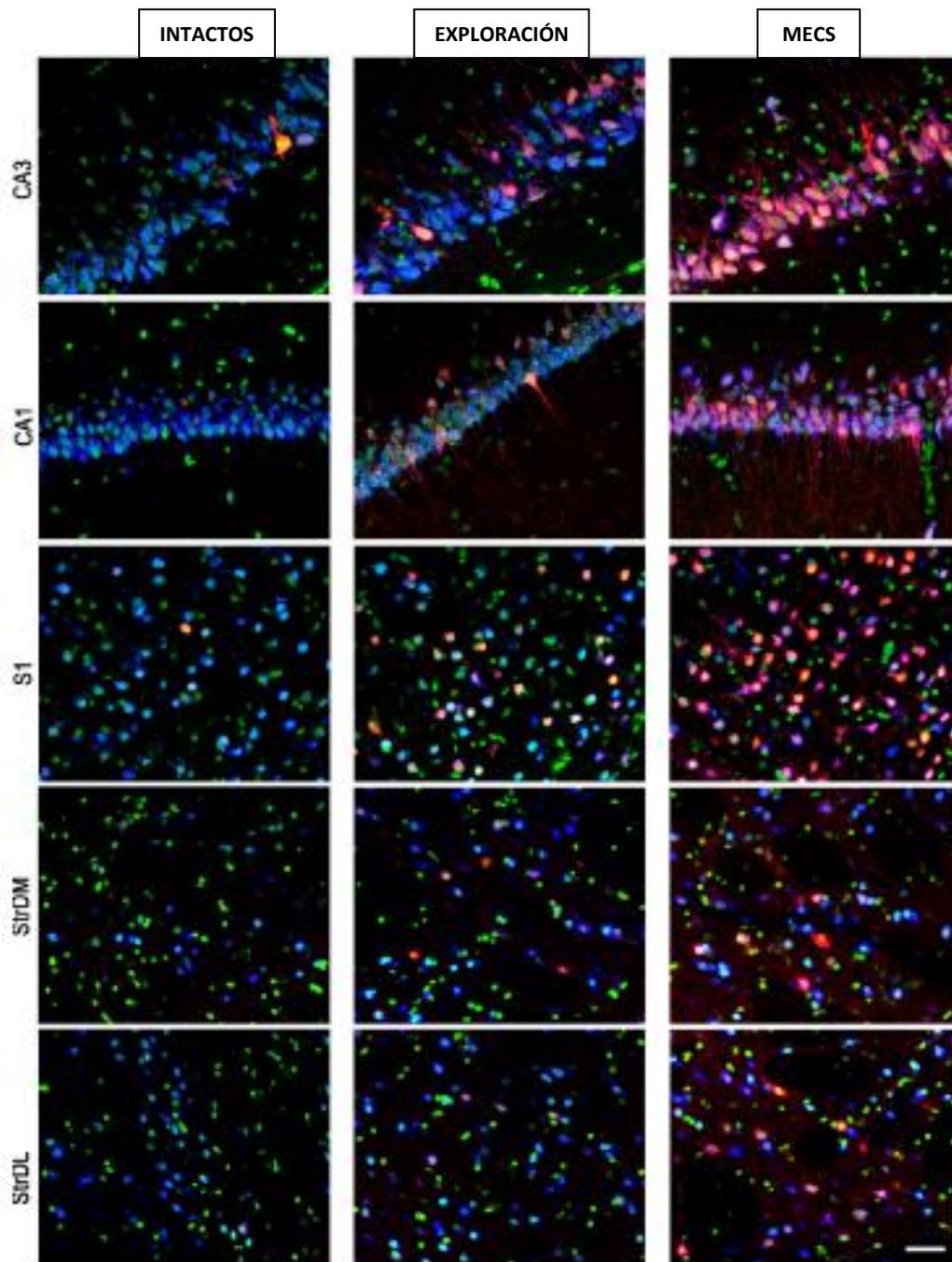
#### **4. ARC COMO INDICADOR DE ACTIVIDAD**

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

Se ha demostrado también que ante distintos estímulos estresantes la expresión de Arc en el hipocampo esta principalmente influida por el contenido espacial de la tarea y no por el tipo de estímulo, vinculando a Arc exclusivamente a la activación neuronal provocada por la conducta (Ons, Marti, & Armario, 2004).

Además, la proporción de células que expresan la proteína Arc en el hipocampo y la corteza de ratas adultas después de la exploración espacial, es la misma que las células que expresan el mRNA de este gen ante dicha experiencia conductual (Ramírez-Amaya et al., 2005). Además, se sabe que la proporción de células que expresa el mRNA de Arc en respuesta a la experiencia espacial es la

misma que las células que presentan campos receptivos espaciales monitoreados electrofisiológicamente, en las mismas condiciones conductuales.



**Figura 4.** Imágenes representativas de células doblemente marcadas para las proteínas Arc (en rojo) y NeuronN (en azul). Los núcleos celulares están en color verde, que al colocalizar con rojo y azul, aparecen de color blanco-amarillo. Es de notar que cada célula con la tinción de color rojo también tiene manchas azules (y aparece como de color magenta), lo que indica que Arc se expresa únicamente en neuronas. MECS, choques electroconvulsivos masivos (por sus siglas en inglés); CA1 y CA3, regiones del cuerno de Amón del hipocampo; S1, corteza somatosensorial primaria; StrDL, estriado dorsolateral; StrDM, estriado dorsomedial. Barra de escala = 50 micras (aplicable a todos los paneles). Modificado de Vazdarjanova y colaboradores (2006).

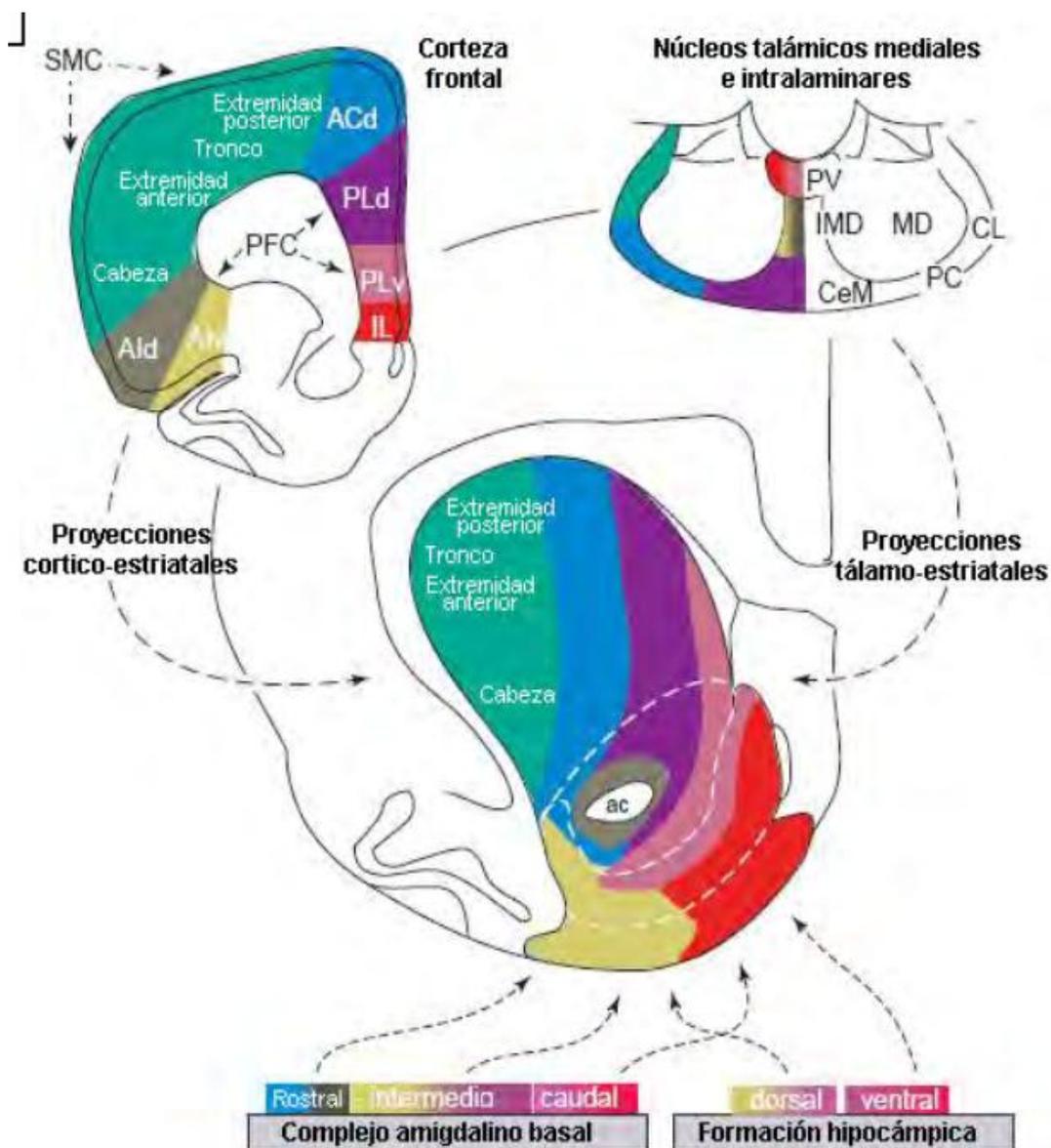
Por último, aunque la evidencia previa mostraba a Arc como una proteína que se producía únicamente en neuronas, fue hasta el 2006 que Vazdarjanova et al. demostraron que Arc es selectivamente inducido en células positivas para el marcador de la proteína nuclear específica de neuronas NeuronN (NeuN) y no en células positivas para la proteína glial fibrilar ácida (GFAP, por sus siglas en inglés glial fibrillary acidic protein) demostrando ser un gen que se expresa de forma exclusiva en neuronas. Además en este mismo trabajo se puede observar como la exploración y la administración de choques masivos electroconvulsivos (MECS, por sus siglas en inglés maximal electroconvulsive shock), aumenta significativamente la expresión de Arc el cual se sigue expresando únicamente en neuronas (Figura 4).

## **5. EL ESTRIADO**

Como se ha mencionado previamente, en la consolidación de la memoria participan varias estructuras cerebrales que funcionan como núcleos de procesamiento para que la información sea almacenada satisfactoriamente. El estriado o también llamado caudado-putamen es el componente principal de un grupo de estructuras subcorticales llamadas ganglios basales; en mamíferos dicha estructura ha sido comúnmente implicada en el componente motor de la conducta pero también diversas investigaciones aportan evidencia de que esta estructura tiene un importante papel en el aprendizaje y la memoria, particularmente en los hábitos y las asociaciones estímulo-respuesta (McDonald & White, 1993; Packard & Knowlton, 2002).

### **1. Anatomía**

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

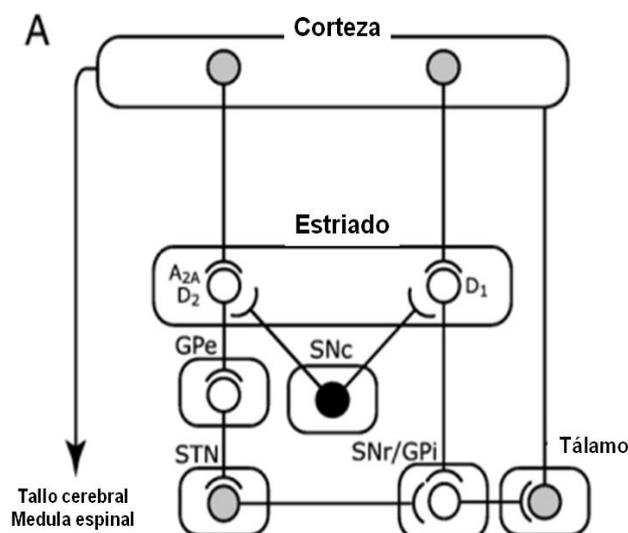


**Figura 5.** Corte coronal del estriado de la rata en el que se muestran las divisiones funcionales por criterios de conectividad. Abreviaturas: ac, comisura anterior; GPe, globo pálido externo; GPi, globo pálido interno; IL, núcleo intralaminar talámico; MD, núcleo mediodorsal talámico; MEA, área medial extrapiramidal (tallo cerebral); SNpc, sustancia nigra pars compacta; SNpr, sustancia nigra pars reticulata; STN, núcleo subtalámico; VA, núcleo ventral anterior talámico; VL, núcleo ventral lateral talámico. Modificado de Voorn, Vanderschuren, Groenewegen, Robbins y Pennartz (2004).

Los ganglios basales no poseen eferencias directas a la médula espinal, por lo cual su participación en la ejecución del movimiento se lleva a cabo principalmente a través del globo pálido interno (GPi) y en menor forma a través de la sustancia nigra pars reticulata (SNpr) a través del sistema motor extrapiramidal que proyecta al tallo cerebral y de ahí a la médula espinal a través de los tractos rubro-espinal, retículo-espinal y vestibulo-espinal (McGeorge & Faull, 1989). El estriado también posee eferencias a través del GPi a los núcleos talámicos ventral

anterior (VA), ventral lateral (VL) e intralaminares (IL) que proyectan a las áreas motoras, premotoras, motoras suplementarias y a la corteza prefrontal presentando conexiones de regreso a las mismas regiones corticales por medio de salidas palidales que posteriormente se conectan de nuevo a las diferentes regiones corticales por medio de los núcleos talámicos anteriormente mencionados (Kimura & Graybiel, 1995).

Estas eferencias estriatales (Figura 6) de neuronas de proyección (neuronas medianas espinosas) que viajan a través de dos vías: la vía directa del GPi y la SNpr, que es excitatoria y contiene GABA, sustancia P y dinorfina, y la vía indirecta a través del globo pálido externo (GPe) que es inhibitoria y contiene GABA y encefalina y viaja a través del GPe-núcleos subtalámicos-GPi-SNpr-tálamo (Packard & Knowlton, 2002).

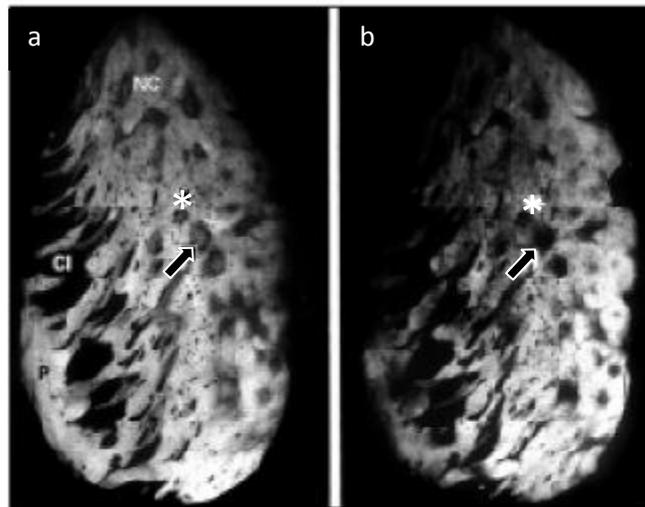


**Figura 6.** Diagramas de las eferencias estriatales directa e indirecta, GPe, globo pálido externo; GPi, globo pálido interno; SNc, substancia nigra pars compacta; SNr, substancia nigra pars reticulata; STN, núcleo subtalámico; D<sub>1</sub> células estriatales de proyección con receptores a dopamina tipo D1; D<sub>2</sub> células estriatales de proyección con receptores a dopamina tipo D2. Modificado de Kimura y Graybiel (1995).

El estriado también recibe una prominente proyección del tálamo, siendo el núcleo talámico intralaminar el origen primario de la vía talámico-estriatal (Mengual, de las Heras, Erro, Lanciego, & Gimenez-Amaya, 1999; Packard & Knowlton, 2002).

Una hipótesis muy interesante de Wise, Murray y Gerfen (1996), es que los giros fronto-córtico-estriatales son usados por el estriado para esencialmente

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



**Figura 7.** Imágenes en negativo de dos secciones adyacentes del estriado rostral a) Imagen procesada histoquímicamente para acetilcolinesterasa (AChE) b) Imagen procesada inmunohistoquímicamente para calbindina D-28k (CB). En las secciones procesadas para AChE, la matriz (asterisco en a) presenta una intensa tinción positiva mientras que los estriosomas (flecha en a) aparecen prácticamente negativos. La correspondencia entre las tinciones del estriado para AChE y CB demuestra que la matriz es positiva para CB (asterisco en b) y los estriosomas corresponden con las áreas estriatales prácticamente desprovistas de esta proteína ligadora de calcio (flecha en b). Abreviaturas: CI, cápsula interna; NC, núcleo caudado; P, putamen. Barra de calibración: 1,6 mm. Modificado de Prensa, Parent, y Gimenez-Amaya (1999).

Con respecto a la neuroquímica estriatal también se han reportado características anatómicas importantes, como son las prominentes aferencias dopaminérgicas provenientes de la sustancia nigra y el área ventral tegmental que inervan al estriado dorsal y ventral (Gerfen & Wilson, 1996; Graybiel, 1990). Las vías corticoestriatal, tálamoestriatal y las aferencias del sistema límbico incluyendo a la amígdala y al hipocampo, utilizan neurotransmisores excitatorios aminoacídicos siendo predominante el glutamato (Fonnum, Storm-Mathisen, & Divac, 1981).

Otra característica es la compartimentalización en el estriado la cual es conocida como el complejo parche-matriz que presenta características

neuroquímicas que no pueden ser observadas a simple vista en la aparente homogeneidad celular del estriado (Figura 7). El parche, también denominado estriosoma consiste en grupos de neuronas que presentan bajos niveles de acetilcolina y altos niveles de distintos opioides y sustancia p; en contraste la matriz presenta células con altos niveles de acetilcolina y somatostatina. Las aferencias dopaminérgicas se distribuyen tanto en el parche como en la matriz, sin embargo la sustancia nigra inerva preferente a la matriz, de la misma manera el área ventral tegmental inerva mayoritariamente al parche. Por otro lado las conexiones corticoestriatales y talamoestriatales están más asociadas a la matriz y las conexiones del sistema límbico (como la amígdala y el hipocampo) con el parche (Packard & Knowlton, 2002). Las investigaciones acerca de la funcionalidad del parche y la matriz en el aprendizaje y la memoria indican que la matriz es la principal responsable de las funciones mnémicas del estriado (White, 1989).

## **2. Citoarquitectura**

Los primeros indicios de una organización compartamental del estriado de los mamíferos adultos están recopilados en algunos comentarios sobre la citoarquitectura de esta estructura subcortical. Los antiguos neuroanatomistas observaron que el estriado aparece citoarquitectónicamente homogéneo comparado con la corteza cerebral, que presentaba una laminación evidente.

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

Las interneuronas estriatales, cuyos axones no proyectan fuera de los límites del estriado, aunque sólo representan un bajo porcentaje del total de neuronas,

incluyen una gran variedad de grupos celulares con propiedades neuroquímicas diferentes. La clasificación más reciente de las interneuronas estriatales se ha realizado tomando como base sus propiedades citoquímicas, fisiológicas y morfológicas (Kawaguchi, Wilson, Augood, & Emson, 1995) y distingue cuatro tipos de interneuronas:

- Neuronas colinérgicas de gran tamaño.
- Interneuronas GABAérgicas que contienen la proteína ligadora de calcio parvalbúmina
- Interneuronas GABAérgicas que contienen calretinina, otra proteína ligadora de calcio.
- Interneuronas que contienen somatostatina, neuropéptido Y, NADPH-diaforasa (u óxido nítrico sintetasa), y que posiblemente también utilicen GABA como neurotransmisor.

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

### **3. Participación del estriado en el aprendizaje y la memoria**

Numerosos estudios con animales experimentales han involucrado a los ganglios basales, especialmente al estriado, en funciones cognitivas tales como el aprendizaje y la memoria (Divac, Rosvold, & Szwarcbart, 1967). Diversos estudios han dissociado el papel de los ganglios basales en el aprendizaje estímulo-respuesta del papel en la memoria declarativa del sistema del lóbulo temporal medial que incluye al hipocampo como su principal componente. Experimentos de farmacología conductual indican un papel importante de los neurotransmisores dopamina, acetilcolina y glutamato en las funciones mnemónicas de los ganglios basales y

también varias formas de plasticidad sináptica (por ejemplo LTP y LTD) han sido identificadas en esta región cerebral (Packard & Knowlton, 2002).

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

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

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

asociadas a la dirección de la cabeza cuando el animal explora un ambiente (Mizumori et al., 2000). La información acerca de movimientos específicos o secuencias de movimientos modulan la expresión de campos de lugar estriatales, siendo más sensibles que las células hipocampales, en el reconocimiento del cambio de un lugar de recompensa en un ambiente familiar, por lo cual se les denominó como células de lugar del estriado (Mizumori et al., 2004; Yeshenko et al., 2004). Por estos resultados, se ha considerado que el estriado lleva a cabo una codificación de elementos egocéntricos que el hipocampo no realiza.

## **6. ANTECEDENTES RELEVANTES**

### **1. Aprendizaje incrementado**

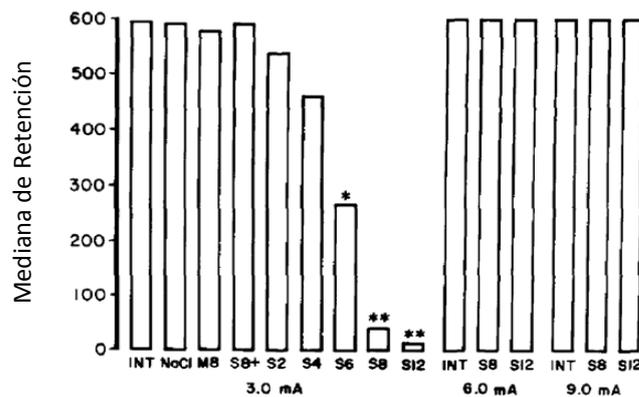
El aprendizaje incrementado es uno de los mecanismos de protección de la memoria más estudiados en las últimas décadas. La importancia de este tipo de aprendizaje radica en que diferentes tratamientos que afectan la consolidación de la memoria, resultan inocuos al momento de probar la retención en los animales. Este mecanismo ha sido estudiado en varios paradigmas conductuales; aunque en la gran mayoría de los estudios realizados en esta línea de investigación se ha utilizado la tarea de evitación inhibitoria también conocida como prevención pasiva (Prado-Alcalá et al., 2006). El término “evitación inhibitoria” es empleado para describir pruebas en las que el animal aprende a evitar un acontecimiento nocivo suprimiendo una conducta concreta es decir la inhibición de una actividad innata o de un hábito adquirido (Bures, Buresová, & Huston, 1983). A continuación se detallan algunas de las características más importantes:

- La conducta activa e inhibida debe estar bien definida, ser reproducible y de fácil medición.
- El estímulo aversivo debe ser claramente asociado con la conducta activa e inhibida.
- El hecho de que sea una situación aprendida con una gran carga emocional, como es el miedo, el dolor, y la ausencia de la conducta; hace que el proceso de adquisición de esta conducta sea muy rápido. La mayoría de las tareas de aprendizaje que se realizan en un único ensayo son tareas de evitación inhibitoria.

- La rapidez en la adquisición facilita establecer el momento exacto en el cual la información entra en el sistema nervioso.
- La retención se mide mediante la comparación de la conducta antes y después de haberse producido el aprendizaje, o bien comparando la conducta de animales no entrenados y animales que sí lo han sido.

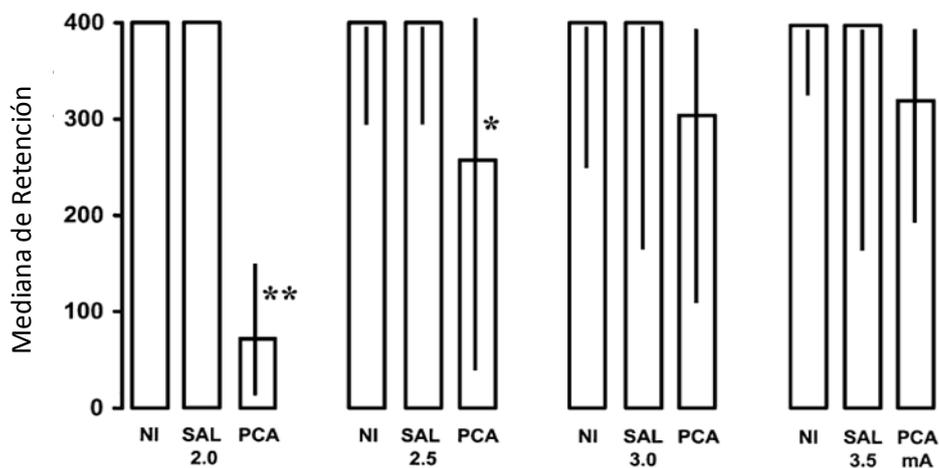
En una situación típica de evitación inhibitoria, una rata es colocada en un compartimiento iluminado (compartimiento de seguridad), separado por una puerta deslizante de otro oscuro (compartimiento de castigo). Cuando la puerta es abierta, la rata cruza al compartimiento oscuro (motivada por su fotofobia innata). Luego de que cruza, le administramos un leve choque eléctrico en las patas, cuarenta y ocho horas después se repite el procedimiento; generalmente si la rata almacenó en la memoria de largo plazo la experiencia aversiva, se observa que no pasa de nuevo al compartimiento en el que se le aplicó el choque el día anterior. En contraste, las ratas que nunca recibieron el choque durante la primera sesión, vuelven a pasar al compartimiento oscuro al día siguiente. Entre los trabajos más conocidos realizados sobre esta línea de investigación se encuentran aquellos donde el bloqueo del sistema colinérgico (mediante la administración sistémica o intracerebral de antagonistas colinérgicos), produce un marcado deterioro en el almacenamiento de varias tareas, demostrando su participación en la consolidación de la memoria (Gold, 2003b; Prado-Alcalá, 1985); sin embargo como puede observarse en la Figura 8, cuando los sujetos son sometidos a experiencias de aprendizaje incrementado los efectos amnésicos provocados por dicho tratamiento desaparecen (Durán-Arévalo, Cruz-Morales, & Prado-Alcalá, 1990).

En otros trabajos, (Figura 9) se inyectó intraperitonealmente p-cloroanfetamina (PCA), un análogo clorado de la amfetamina el cual es una potente neurotoxina que causa la depleción de la serotonina en el sistema nervioso central. En grupos independientes de ratas entrenadas con diferentes niveles de choque eléctrico, se observó que cuando el nivel de entrenamiento es moderado se produce un marcado cuadro amnésico, pero al incrementarse el estímulo aversivo la consolidación de la memoria se ve protegida demostrándose así que dicho efecto no es exclusivo del sistema colinérgico (Solana-Figueroa, Salado-Castillo, Quirarte, Galindo, & Prado-Alcalá, 2002).



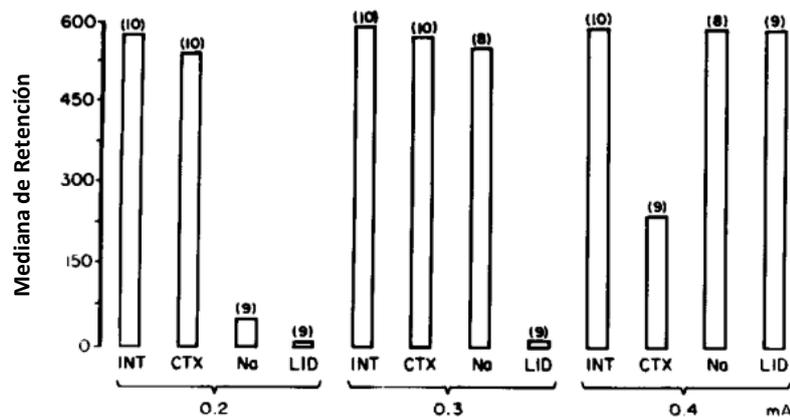
**Figura 8.** Medianas de la retención de los datos obtenidos 24 horas después del entrenamiento con 3.0, 6.0 o 9.0 miliamperios en la tarea de evitación inhibitoria. INT, grupo intacto; NaCl, grupo inyectado con solución salina isotónica; M8, grupo inyectado con 8 µg de metilescopolamina; S, grupos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

También se han realizado experimentos con la finalidad de encontrar las estructuras implicadas en el aprendizaje incrementado, por ejemplo Giordano y Prado-Alcalá (1986) administraron atropina directamente en el estriado de ratas; encontrando el mismo efecto protector en niveles altos de entrenamiento. Unos años más tarde Díaz del Guante, Rivas-Arancibia, Quirarte, y Prado-Alcalá (1990) confirmaron dicho efecto.



**Figura 9.** Medianas de la retención de los datos obtenidos de ratas no inyectadas (NI) y de ratas que fueron inyectadas con solución salina (SAL) o 2.5 mg/Kg de p-cloroanfetamina (PCA) y entrenadas con 2.0, 2.5, 3.0 y 3.5 mA. Las inyecciones fueron administradas 30 minutos antes del entrenamiento. El \* indica p < 0.02; los \*\* indican p < 0.0005. Los resultados muestran el efecto protector a la amnesia inducido por el aprendizaje incrementado. Modificado de Solana-Figueroa, et al. (2002).

Pero los efectos no se limitan a la protección de sistemas de neurotransmisión pues al bloquear completamente la actividad estriatal por medio de administraciones directas de lidocaína (fármaco que impide la propagación del potencial de acción bloqueando la actividad de los canales de sodio), se bloqueo la comunicación neuronal y por ende el almacenamiento de la memoria (Figura 10). Dicho efecto fue únicamente visto en las ratas sometidas a aprendizajes moderados siendo el tratamiento inocuo en los animales entrenados con estímulos incrementados (Pérez-Ruíz & Prado-Alcalá, 1989).



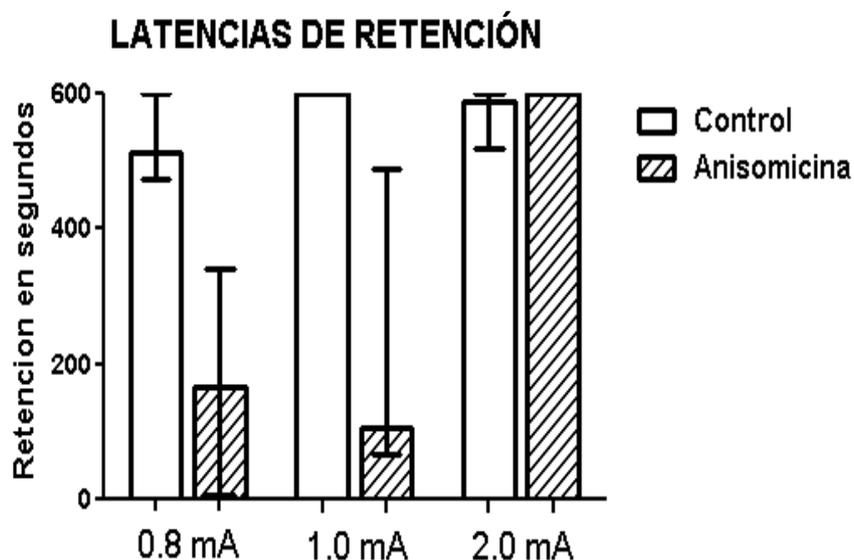
**Figura 10.** Medianas de la retención de los datos obtenidos 24 horas después del entrenamiento. INT, grupo intacto; CTX, grupo inyectado con lidocaína en la corteza; Na, grupo inyectado con solución salina isotónica en el estriado; LID, grupo inyectado con lidocaína en el estriado. Las intensidades de choque eléctrico fueron 0.2, 0.3, y 0.4 miliamperios; los números en paréntesis corresponden al número de animales para cada grupo. Modificado de Pérez-Ruíz y Prado-Alcalá, (1989).

Otra de las estructuras que se ha explorado es la sustancia nigra en donde se administró bicuculina y picrotoxina, fármacos que bloquean el sistema GABAérgico, encontrando de nuevo los mismos resultados, amnesia en las ratas que fueron entrenadas de forma moderada y ningún efecto en las sometidas a experiencias de aprendizaje incrementado (Cobos-Zapíaín et al., 1996).

En la línea de investigación del aprendizaje incrementado también se han estudiado otras estructuras involucradas en el almacenamiento de la memoria como son la amígdala y el hipocampo, encontrándose que al ser lesionadas no se producen efectos sobre la memoria en ratas sobrerreforzadas (Martínez, Quirarte, Díaz-Cintra, Quiroz, & Prado-Alcalá, 2002; Salado-Castillo, Sánchez-Alavez, Quirarte, & Prado-Alcalá, 1995).

El efecto protector descrito anteriormente en ratas fue también observado en otros mamíferos, Prado-Alcalá y Cobos-Zapíaín en 1979 lesionaron en forma reversible el caudado en gatos por medio de inyecciones de cloruro de potasio a altas concentraciones (KCl 3M) lo cual induce una despolarización aguda y sostenida de las membranas neuronales produciendo un bloqueo en la estructura afectada; estos animales fueron entrenados a presionar una palanca para obtener leche como recompensa. Las lesiones como era de esperarse, produjeron amnesia en los grupos que fueron entrenados en forma moderada pero en los grupos con un nivel de entrenamiento alto se observó una retención equivalente al grupo control.

Estudios recientes han demostrado que incluso cuando se administran bloqueadores de la síntesis de proteínas como cicloheximida inyectada sistémicamente (Díaz-Trujillo et al., 2009) o cuando se inyecta anisomicina directamente en el estriado dorsal (Gonzalez-Franco, García-Torres, Serafín, Prado-Alcalá, & Quirarte, en preparación), no se producen efectos amnésicos (Figura 11).



**Figura 11.** Medianas de la retención de los datos obtenidos 48 horas después del entrenamiento. Se administró 30 minutos antes del entrenamiento 62.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de anisomicina directamente en el estriado dorsal de ratas que fueron entrenadas con diferentes niveles de choque eléctrico. Tomado de Gonzalez-Franco (2009).

## 7. JUSTIFICACIÓN

Se sabe que la consolidación de la información generada por aprendizajes motivados por un reforzador o un castigo puede ser bloqueada por medio de la administración de fármacos que bloquean la actividad neuronal cerebral o por lesiones que dañan las estructuras relacionadas con el procesamiento de esta información. Sin embargo si el reforzador o el castigo se incrementan en magnitud el bloqueo de la consolidación es decir la amnesia normalmente encontrada no se produce.

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

Para confirmar esto, determinamos la localización de la actividad neuronal mediante la identificación de la proteína del IEG Arc, con lo que observamos las variaciones en la cantidad de unidades neuronales y/o áreas en el estriado que respondieron a la conducta durante la adquisición y la evocación de este tipo de aprendizaje.

Como se ha comentado en párrafos anteriores la gran mayoría de los estudios sobre aprendizaje incrementado se han realizado en la tarea de evitación inhibitoria (Prado-Alcalá, 2006), por lo que se decidió hacer este estudio con esta misma tarea, pero debido a la alta probabilidad que los animales entrenados con intensidades altas de choque eléctrico no entren de nuevo al compartimento de castigo lo que implica que una cantidad considerable de células de lugar estriatales antes mencionadas (Yeshenko et al., 2004), no se activen y por consiguiente la señal observada pertenecería a una respuesta no específica en varios de los grupos produciendo una variabilidad en el análisis de los resultados. Se decidió hacer algunas modificaciones a la tarea de evitación inhibitoria con el fin de que todos los animales exploren ambos compartimentos durante la prueba de retención. El entrenamiento de la tarea se realizó exactamente como se ha reportado en la literatura (Prado-Alcalá et al., 2006) pero durante la prueba de retención la rata fue colocada en el compartimento de castigo (oscuro) en lugar de ser colocada en el compartimento de seguridad (iluminado), como se realiza comúnmente. Por

consiguiente los animales en lugar de presentar una respuesta inhibitoria, presentan una respuesta activa de evitación cruzando al compartimento de seguridad y permaneciendo en este por más tiempo (ver sección de método).

## **8. HIPÓTESIS**

1. El entrenamiento en la tarea de evitación con distintas intensidades de choque eléctrico producirá diferentes grados de retención.
2. Durante la adquisición la expresión de Arc en el estriado de ratas tendrá una relación directa con la intensidad (amperaje) del estímulo utilizado durante el entrenamiento de una tarea de evitación.
3. Durante la evocación la expresión de Arc en el estriado de ratas será directamente proporcional al estímulo utilizado durante el entrenamiento de una tarea de evitación.
4. La expresión de Arc en diferentes regiones del estriado será heterogénea en ratas entrenadas en una tarea de evitación durante la adquisición y la evocación.

## **9. OBJETIVO GENERAL**

Determinar la diferenciación regional de la expresión de Arc en el estriado durante la adquisición y la evocación, provocada por el entrenamiento con diferentes intensidades de choque eléctrico en una tarea de evitación.

## **10. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Evaluar el grado de retención de ratas entrenadas con diferentes intensidades de choque eléctrico en una tarea de evitación.
2. Determinar la expresión de Arc en diferentes regiones del estriado (dorsolateral, dorsomedial, ventrolateral y ventromedial) de ratas entrenadas con diferentes intensidades de choque eléctrico durante la adquisición de una tarea de evitación.
3. Determinar la expresión de Arc en diferentes regiones del estriado (dorsolateral, dorsomedial, ventrolateral y ventromedial) de ratas entrenadas

con diferentes intensidades de choque eléctrico durante la evocación de una tarea de evitación.

## **11. SUJETOS MATERIALES Y MÉTODOS**

El protocolo experimental de la presente tesis fue aprobado por el Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología, UNAM. Los procedimientos experimentales se realizaron acorde a la NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, especificaciones para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio y a las normas estipuladas en la "Guide for Care and Use of Laboratory Animals del NIH (ILAR, 1996).

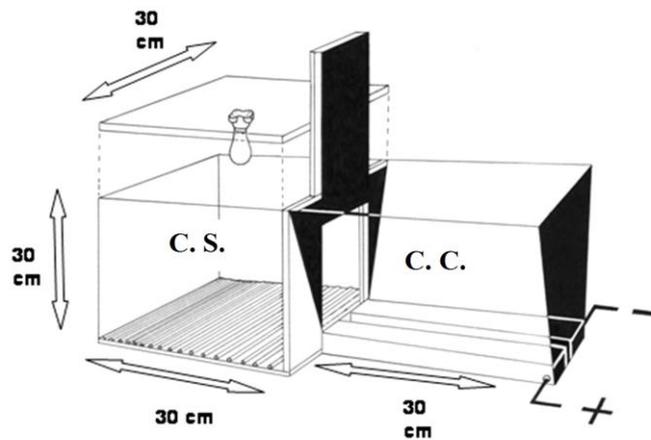
### **11.1. Sujetos**

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

### **11.2. Aparatos**

El entrenamiento (aprendizaje) y la prueba de retención (memoria) se realizaron en una caja de condicionamiento constituida por dos compartimientos de 30x30x30 cm separados por una puerta deslizable tipo guillotina (Figura 12). El piso del compartimiento de seguridad está compuesto por barras de aluminio de 6 mm de diámetro separadas entre sí por 1.5 cm. Las paredes del compartimiento de castigo están formadas por dos placas de acero inoxidable, separadas en la mitad del piso por una ranura de 1 cm., lo cual permite que los animales hagan contacto todo el tiempo con ambas placas y puedan recibir un choque eléctrico. El compartimiento de castigo se puede electrificar por medio de un estimulador de pulsos cuadrados

(Grass Instruments Co., modelo S48) conectado en serie con una unidad de corriente constante (Grass Instruments Co., modelo CCU-1). La cámara de condicionamiento está ubicada en un cuarto sonoamortiguado, con baja iluminación, provista de un enmascarador de ruido (BRS/LVE, modelo AU-902).



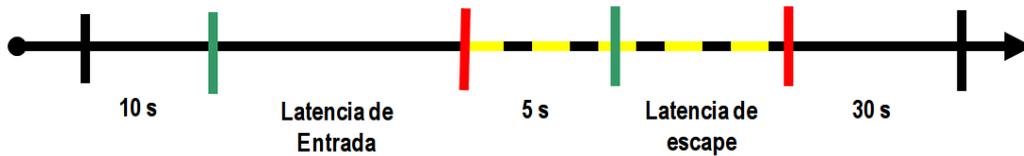
**Figura 12.** Cámara de condicionamiento de evitación. Compartimiento de seguridad (C.S.), compartimiento de castigo (C.C.).

### 11.3. Entrenamiento

En el primer y único día de entrenamiento (sesión de adquisición), cada sujeto se introdujo en el compartimiento de seguridad; 10 s después se abrió la puerta y se midió el tiempo (latencia de adquisición) que tardó en cruzar con las cuatro patas al compartimiento de castigo. En ese momento se cerró la puerta y se administró un choque eléctrico durante 5 s luego de los cuales se abrió la puerta permitiéndole al sujeto escapar; el choque se mantuvo hasta que el animal escapó al compartimiento de seguridad, midiéndose la latencia de escape. En este momento, se cerró la puerta y 30 s después se retornó al animal a su jaula individual dando por terminada la sesión (Figura 13). Las intensidades del choque fueron de 0.0 mA (sin choque), 0.5 mA (entrenamiento bajo), 1.0 mA (entrenamiento moderado), 2.0 mA (entrenamiento incrementado) dependiendo de la situación experimental particular.

Con el fin de observar si la activación neuronal era generada por el entrenamiento o por la administración del choque eléctrico se anexó un grupo control el cual fue sometido a la máxima intensidad de choque (2.0 mA) pero sin el

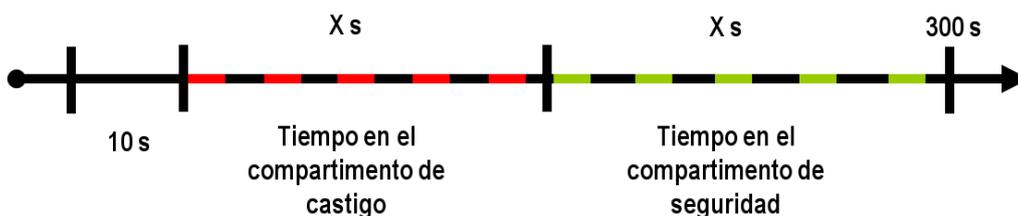
entrenamiento en la tarea. Todos los estímulos eléctricos tuvieron los siguientes parámetros: 100 volts, pulsos de 50 ms de duración y una frecuencia de pulsos de 10/s.



**Figura 13.** Diagrama de los pasos seguidos para el entrenamiento. Las líneas verticales verdes y rojas indican la apertura y el cierre respectivamente de la compuerta que separa a ambos compartimentos; la línea amarilla con negro indica el momento en que se administró el choque eléctrico.

#### 11.4. Prueba

La prueba de retención (memoria), se realizó 48 hrs después del entrenamiento; se ubicó esta vez a la rata en el compartimento de castigo y pasados 10 s se abrió la compuerta y se midió la latencia de cruce al compartimento de seguridad (tiempo que demoró el animal en salir del compartimento de castigo); luego se le permitió al animal el libre desplazamiento entre los dos compartimentos, contabilizando el tiempo que permaneció el animal en el compartimento de seguridad y el número de cruces hacia el compartimento de castigo, de esta manera se garantizó que todos los animales exploraran ambos compartimentos. Al cabo de 300 segundos desde el inicio de la prueba se retiró al animal de la caja dando la prueba por concluida (Figura 14).



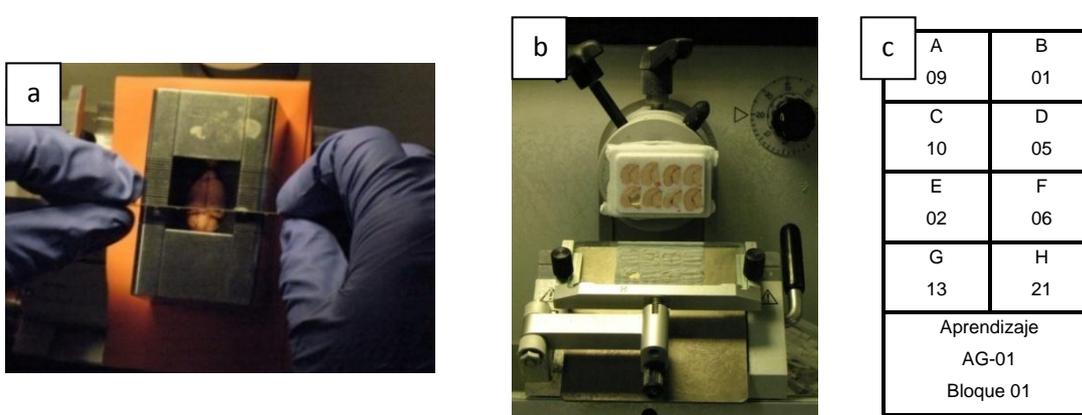
**Figura 14.** Diagrama de los pasos seguidos para la prueba de retención. Las líneas verdes con negro y rojas con negro, indican la estancia del animal en el compartimento de seguridad o el compartimento de castigo respectivamente.

## 11.5. Extracción y procesamiento de tejido

Para los grupos de adquisición, al término de la sesión de entrenamiento, se permitió que la rata permaneciera durante 45 min en su caja habitación con el fin de permitir que la proteína Arc alcanzara su pico máximo de expresión, pasado este tiempo la rata fue sacrificada por decapitación. Para los grupos de evocación la decapitación se realizó 45 min después de la prueba de retención.

Inmediatamente después de la decapitación se extrajo el cerebro y se congeló sumergiéndolo en un recipiente con isopentano enfriado a  $-30^{\circ}\text{C}$  aproximadamente, al ser inmerso en una solución de hielo seco y etanol; posteriormente los cerebros fueron almacenados en un congelador a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Para su criosección los tejidos fueron seleccionados teniendo en cuenta que fueran ratas cuyos resultados conductuales estuvieran cercanos a la mediana de desempeño del parámetro estudiado en el grupo al que correspondían. Posteriormente los cerebros fueron seccionados con el uso de una matriz de sección para tejido de  $2.7 \times 2.5$  cm de área interior (Electrón Microscope Sciences<sup>®</sup>); se utilizó como referencia el límite entre la corteza y el cerebelo (Figura 15a), de tal manera que todas las secciones de cada uno de los animales presentaran una altura semejante de corte ( $\pm 0.5$  mm). Además, para garantizar la equidistancia en la altura antero-posterior se colocaron los cerebros en el molde de plástico con la parte posterior en la base del molde.



**Figura 15.** Fotografías ilustrativas de los procesos de bloqueo y corte de los cerebros seleccionados para la inmunotinción. a) corte de los cerebros entre la corteza y el cerebelo. b) criosección de los hemisferios embebidos y bloqueados en OCT<sup>®</sup>. c) diagrama que ejemplifica la distribución aleatoria de los cerebros en la laminilla.

De esta manera, los tejidos fueron distribuidos en bloques de hemisferios izquierdos; distribuyéndolos de manera aleatoria, de tal forma que hubiera al menos un control intacto por cada bloque como medida estereológica. Luego se cubrió con “Tissue tek OCT<sup>®</sup>” y se congeló rápidamente con hielo seco para generar un bloque sólido (el resto de los tejidos fueron almacenados a -70°C). Se realizaron cortes coronales de 20 µm de espesor (Figura 15b) que fueron dispuestos en laminillas portaobjetos previamente silanizadas (Figura 15c).

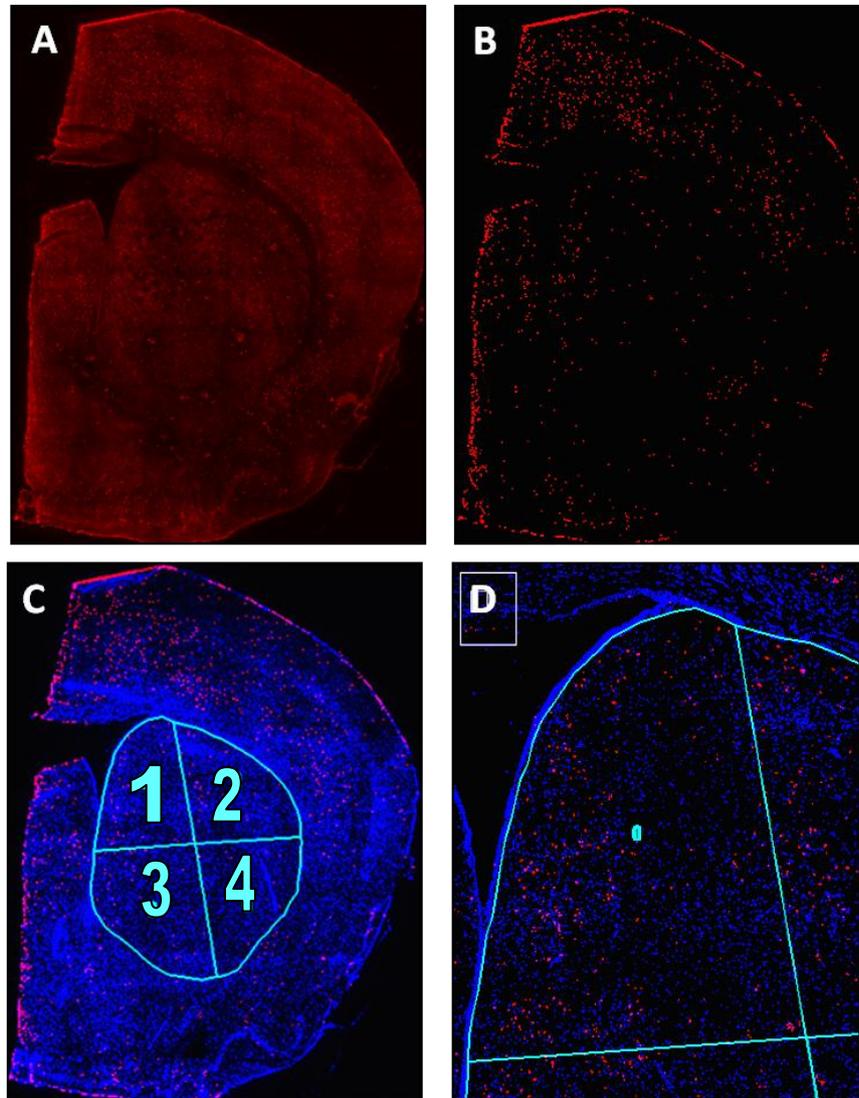
### **11.6. Histología**

Seis laminillas de cada bloque se seleccionaron a partir de la porción medial del estriado Bregma 0.0 (Paxinos & Watson, 2005). Los tejidos se fijaron en una solución al 2% de paraformaldehído a 7.4 pH, durante 5 min y se lavaron en 2xSSC, (30 mM cloruro de sodio, 30 mM citrato de sodio, pH 7.0), seguido de 50:50% de acetona/metanol a 4°C, durante 5 minutos. Posteriormente se lavaron en 2xSSC + 0.05% de Tween 20 y se eliminó la autofluorescencia con 2xSSC + 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 15 min. Tras el bloqueo con el kit de amplificación de señal de tiramida (TSA) buffer de bloqueo (Perkin Elmer Life Sciences, Emeryville, CA, EUA.). Las laminillas fueron incubadas 48 horas a 4°C en anticuerpo policlonal de conejo anti-Arc (1:800) provisto por el laboratorio del Dr. Worley. Se colocaron posteriormente en incubación con el anticuerpo secundario anti-conejo biotinilado (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA.) durante 2 horas a temperatura ambiente, seguido por el sistema de amplificación avidina-biotina (Vector Laboratories) por 45 min. La tinción fue visualizada usando el sistema de fluorescencia cianina3 (Cy3) + TSA (Perkin Elmer Life Sciences); los núcleos fueron contrateñidos con SYTOXgreen (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA.). Ninguna tinción se detectó en la ausencia de los anticuerpos primarios o secundarios.

### **11.7. Análisis de imágenes**

Se obtuvieron imágenes en mosaico de los tejidos teñidos por inmunofluorescencia para la proteína Arc y para la contrateñición de SYTOX, usando un objetivo apocromático de 10X/0.45 con el software de imágenes para Mosaico X en el sistema Apotome (Zeiss<sup>®</sup> Standort Göttinga - Vertrieb Deutschland) como se muestra en la Figura 16 A. Los parámetros de imagen (brillo, contraste etc.) se

ajustaron con el fin de eliminar el ruido de fondo y observar únicamente la señal de las neuronas activadas; para esto se utilizó la señal de la tinción observada en el animal control para cada laminilla y se mantuvieron los mismos valores para los parámetros de imagen utilizados en el resto de los tejidos de la laminilla (Figura 16 B), esto como medida estereológica con el fin de controlar la variación en la señal producida por el proceso de marcaje.



**Figura 16.** Las imágenes de los cerebros fueron tomadas por medio de un microscopio de fluorescencia Apotome en el cual se fotografiaron mosaicos de la señal de Arc y de la contratinción de SYTOX para marcar núcleos las imágenes obtenidas fueron montadas en pilas y analizadas por medio del programa ImageJ, (software de licencia libre). A) Imagen original sin modificar, B) Imagen modificada en su brillo y contraste para eliminar el ruido de fondo, C) Pila de las imágenes de la señal de Arc mas la contratinción de núcleos y la demarcación de las regiones de interés( 1. Dorsomedial, 2. Dorsolateral, 3. Ventromedial, 4. Ventrolateral), D) Zoom a la región de interés 1 donde se observa las células Arc positivas.

De las imágenes adquiridas, se analizaron seis por medio del programa **Image-J** de licencia libre con el cual se delimitaron en el estriado las regiones de interés (ROI por sus sigla en inglés Region of Interest) denominadas dorsolateral, dorsomedial, ventrolateral y ventromedial, usando como guía el atlas de coordenadas estereotáxicas del cerebro de rata de Paxinos y Watson (2005). (Figura 16 C) Una vez que los ROI's fueron señalados, se estableció un umbral (threshold) en la imagen del animal control correspondiente a una laminilla y una vez establecidos los parámetros de detección, fueron utilizados para el resto de las imágenes de los otros animales de la misma laminilla. Por último el programa arrojó el área de la señal de Arc detectada, en micras cuadradas ( $\mu\text{m}^2$ ).

## **11.8. Análisis estadístico**

### **11.8.1. Resultados conductuales**

Los datos obtenidos como resultado del entrenamiento en la tarea de evitación (latencias de entrada y de escape) y de la prueba (latencia de cruce al compartimento de seguridad, tiempo en el compartimento seguridad, tiempo en el compartimento de castigo y número de cruces) fueron analizados mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis; dicha prueba fue seleccionada debido al corte arbitrario de 300 segundos en la duración de la prueba. Este análisis nos permitió determinar si las mediciones realizadas fueron o no significativamente diferentes; en caso de encontrarse diferencias significativas se utilizó la prueba de U de Mann-Whitney para comparar pares de grupos. Las hipótesis fueron evaluadas con un nivel de significancia menor o igual a 0.05.

### **11.8.2. Resultados histológicos**

Los datos obtenidos del análisis de imágenes (área de señal de Arc sobre el área de la región de interés ROI) fueron analizados utilizando la prueba paramétrica de análisis de varianzas (ANOVA) de una vía para cada región del estriado; cuando se encontraron diferencias significativas se realizó la prueba de Fisher para comparaciones entre grupos. Las hipótesis fueron evaluadas con un nivel de significancia menor o igual a 0.05.

## **11.9. Grupos y tratamientos**

### **11.9.1. Experimento 1**

Este experimento se diseñó con el fin de estudiar la expresión de Arc durante el aprendizaje. De acuerdo con la segunda hipótesis que se ha planteado al inicio de este documento se formaron 6 grupos de 10 ratas cada uno (exceptuando a los grupos control que tuvieron 4 ratas cada uno). De los cuales se seleccionaron 4 ratas para el análisis histológico.

**Grupo 1.** Entrenados con 0.0 mA

**Grupo 2.** Entrenados con 0.5 mA

**Grupo 3.** Entrenados con 1.0 mA

**Grupo 4.** Entrenados con 2.0 mA

Adicionalmente también se estudiaron dos grupos control:

**Grupo 5.** Intacto, los sujetos permanecieron en su caja-habitación sin contacto con la tarea y sin ser sometidos a ningún tipo de entrenamiento.

**Grupo 6.** Solo choque 2.0 mA, las ratas recibieron el choque eléctrico sin ser sometidos a ningún procedimiento de entrenamiento.

### **11.9.2. Experimento 2**

Este experimento se diseñó con el fin de estudiar la expresión de Arc durante la evocación de la tarea (memoria). Con este experimento se sometió a la prueba experimental las hipótesis uno y tres; para esto se conformaron 5 grupos de 10 ratas cada uno (exceptuando al grupo control que tuvo 4 ratas) de los cuales se seleccionaron 4 ratas para el análisis histológico.

Grupo 1. Entrenados con 0.0 mA

Grupo 2. Entrenados con 0.5 mA

Grupo 3. Entrenados con 1.0 mA

Grupo 4. Entrenados con 2.0 mA

Grupo 5. Intacto, los sujetos permanecieron en su caja-habitación sin contacto con la tarea y sin ser sometidos a ningún tipo de entrenamiento.

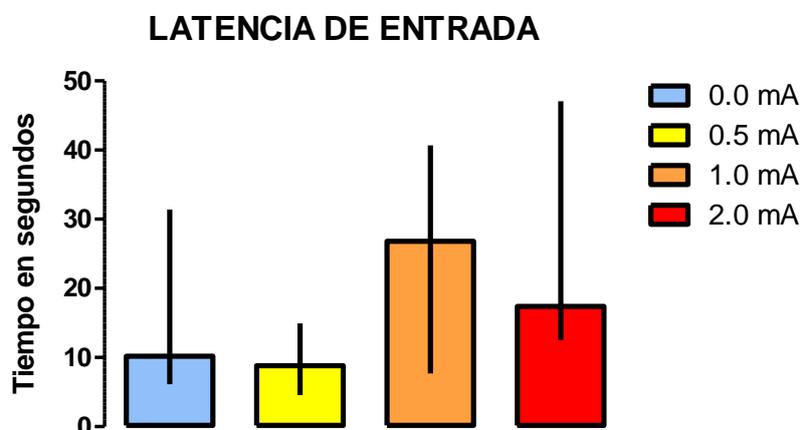
Los grupos se entrenaron en la tarea de evitación con diferentes intensidades de choque eléctrico, pasadas 48 horas se les sometió a una prueba de retención (memoria).

## 12. RESULTADOS

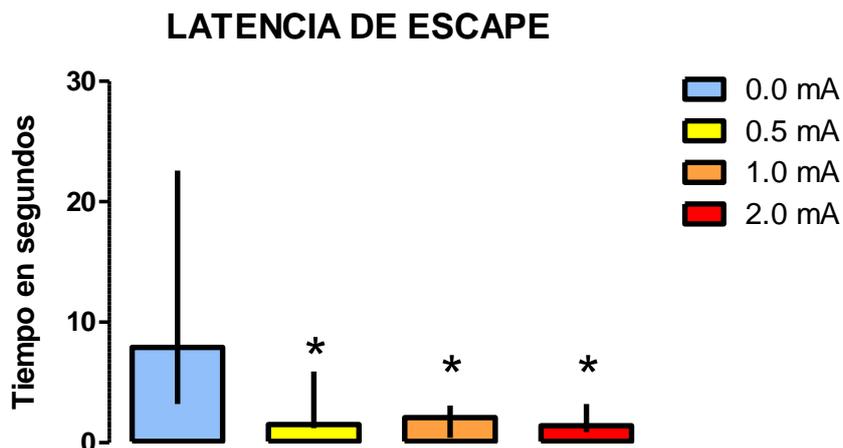
### 12.1. Resultados conductuales

Analizando los datos obtenidos del entrenamiento en la tarea de evitación encontramos que no existieron diferencias significativas entre los grupos en la latencia de entrada (Kruskal-Wallis,  $H=5.247$ ;  $p=0.1546$ ). Por otro lado al analizar los datos de la latencia de escape se observaron diferencias significativas (Kruskal-Wallis,  $H=9.042$ ;  $p=0.0287$ ), únicamente en los grupos que recibieron choque eléctrico. (U de Mann-Whitney para 0.5, 1.0 y 2.0 mA ( $U=3.0$ ;  $p=0.0076$  para todos los casos) con respecto al grupo control de 0.0 mA (Figuras 17 y 18).

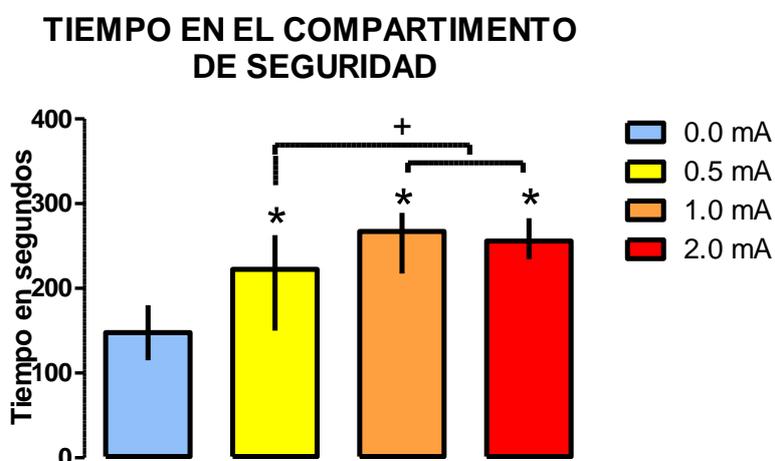
Posterior a esto se analizaron los datos obtenidos de los grupos de evocación, en los cuales, encontramos diferencias significativas en el tiempo que permanecieron los animales en el compartimento de seguridad (Kruskal-Wallis,  $H=17.88$ ;  $p=0.0005$ ), tras lo cual se realizó una prueba post hoc de U de Mann-Whitney encontrándose diferencias significativas entre el grupo de 0.0 mA y las demás intensidades de choque ( $U=23.0$ ;  $p=0.0452$ ,  $U=16.00$ ;  $p=0.0113$  y  $U=0.00$ ;  $p=0.0003$  contra 0.5, 1.0 y 2.0 mA respectivamente). Al mismo tiempo se encontraron diferencias entre los grupos de 0.5 vs 1.0 mA y 0.5 vs 2.0 mA ( $U=21.00$ ;  $p=0.0267$  y  $U=23.00$ ;  $p=0.0394$  respectivamente), lo cual se puede apreciar en la Figura 19.



**Figura 17.** Las barras representan las medianas con rangos intercuartiles de la latencia de entrada al compartimento de castigo de los grupos independientes, de ratas entrenadas en una tarea de evitación ( $n=10$ ). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

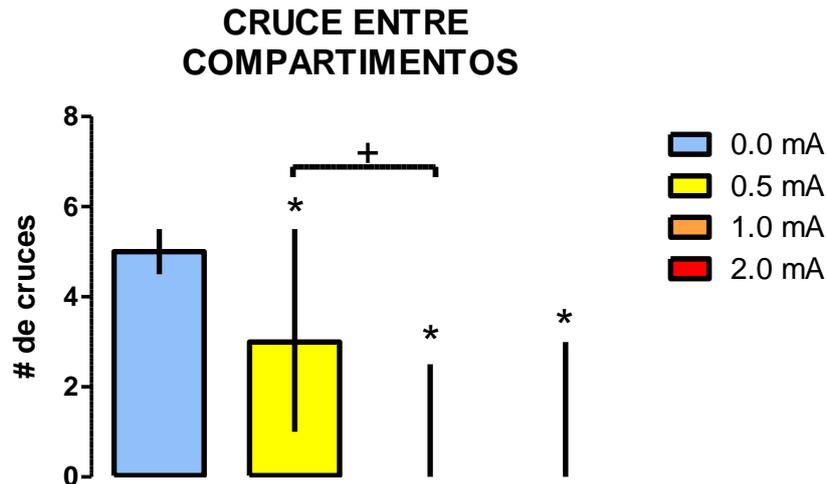


**Figura 18.** Las barras representan las medianas con rangos intercuartiles de la latencia de escape durante el entrenamiento. El \* indica que estos grupos son estadísticamente diferentes del grupo que no recibió choque eléctrico durante el entrenamiento \*  $p < 0.05$ .



**Figura 19.** Las barras indican las medianas con rangos intercuartiles del tiempo que permanecieron las ratas en el compartimento de seguridad se marcan las diferencias significativas con el símbolo \* ( $p < 0.05$ ) para comparaciones con el grupo control y + ( $p < 0.05$ ) para comparaciones entre grupos que recibieron choque eléctrico.

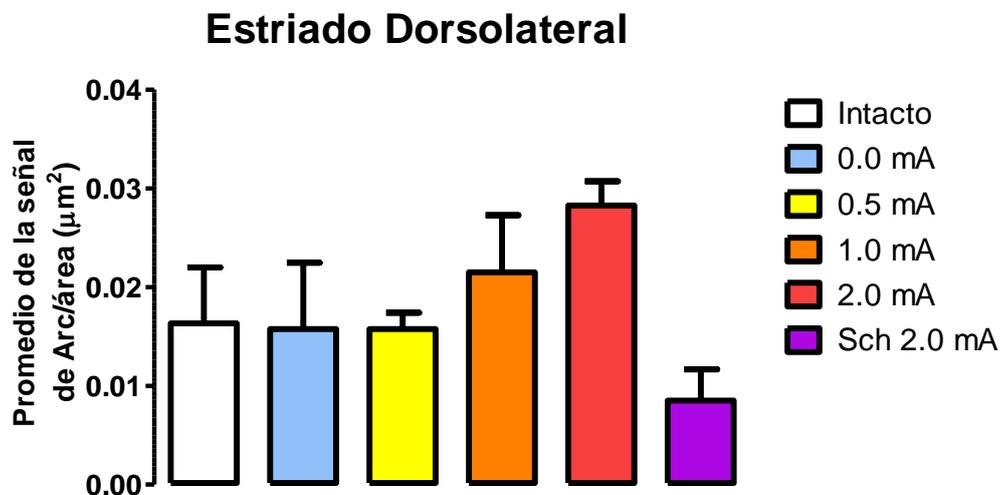
Quando se analizó el número de cruces del compartimento de seguridad al compartimento de castigo se observaron diferencias significativas (Kruskal-Wallis,  $H=14.54$ ;  $p=0.0023$ ), se realizó una prueba post hoc de U de Mann-Whitney encontrándose diferencias significativas entre el grupo de 0.0 mA y los de 1.0 y 2.0 mA ( $U=6.0$ ;  $p= 0.0007$ . y  $U=6.0$ ;  $p=0.012$ . respectivamente), al mismo tiempo se encontraron diferencias entre los grupos de 0.5 y 1.0 mA ( $U=23.00$ ;  $p=0.0379$ ) las cuales pueden ser observadas en la Figura 20.



**Figura 20.** Medianas con rangos intercuartiles de los cruces realizados por los sujetos del compartimento de seguridad al compartimento de castigo. Se marcan las diferencias significativas con los símbolos. \* ( $p < 0.05$ ) para comparaciones con el grupo control y + ( $p < 0.05$ ) para comparaciones entre grupos estimulados con choque eléctrico.

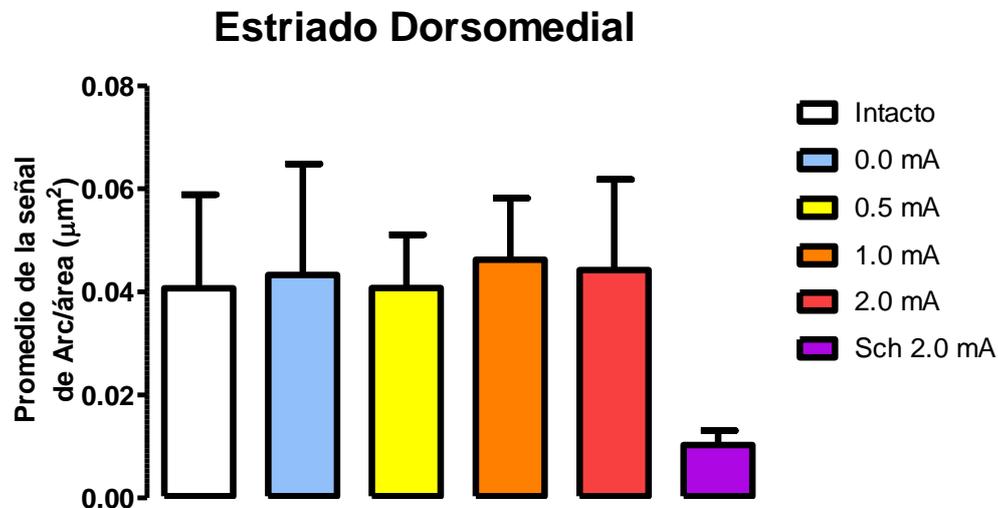
## 12.2. Resultados histológicos

El análisis del área de la señal de la proteína Arc con respecto al área ( $\mu\text{m}^2$ ) de la región del estriado dorsolateral (Figura 21) no mostró diferencias significativas en los diferentes tratamientos a los cuales fueron sometidos los sujetos experimentales (ANOVA,  $F_{5,17}=0.869$ ;  $p=0.522$ ).

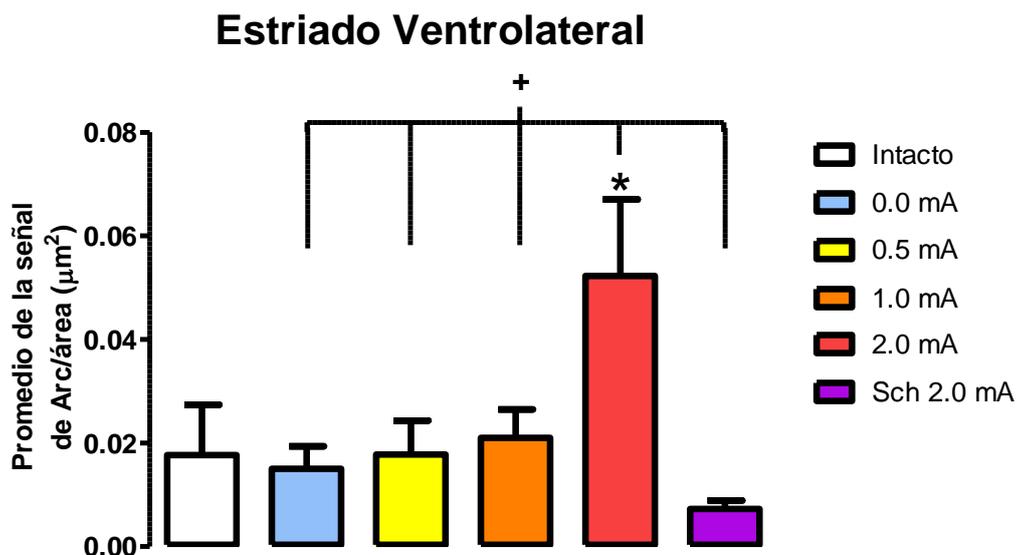


**Figura 21.** Promedio de la señal de Arc/Área ( $\mu\text{m}^2$ ) del estriado dorsolateral, durante la adquisición. No se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ). Intacto, grupo sin tratamiento; **0.0 mA**, grupo de animales entrenado sin choque eléctrico; **0.5 mA**, grupo entrenado con intensidad baja de choque eléctrico; **1.0 mA**, grupo entrenado con intensidad moderada de choque eléctrico; **2.0 mA**, grupo entrenado con intensidad alta de choque eléctrico; **Sch 2.0**, grupo estimulado con 2.0 mA pero sin entrenamiento (control choque).

Posteriormente al analizar la actividad del estriado dorsomedial no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos a los cuales fueron sometidos los sujetos experimentales (ANOVA,  $F_{5, 17}=0.869$ ;  $p=0.522$ ). Como se puede observar en la Figura 22.



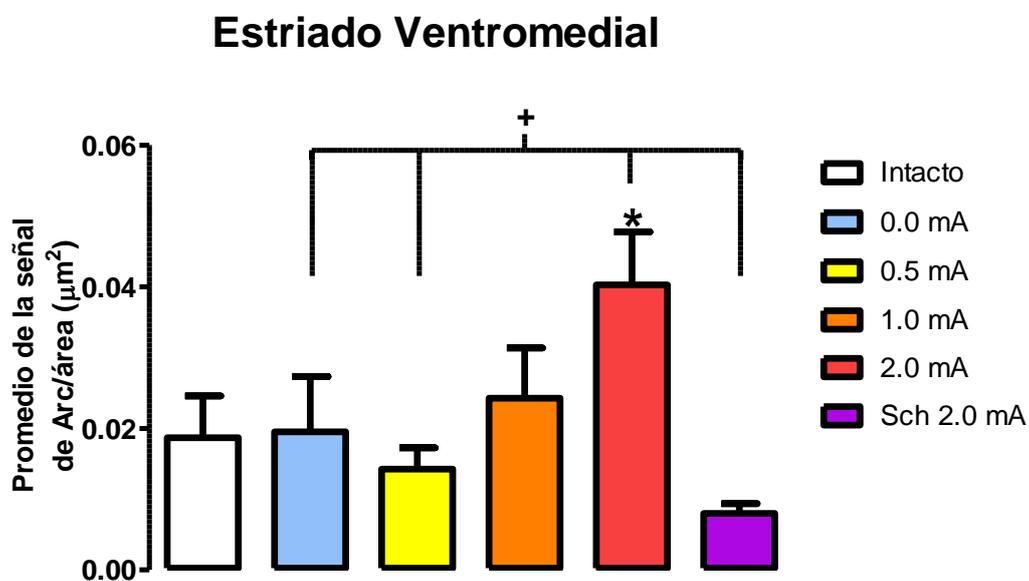
**Figura 22.** Promedio de la señal de Arc/Área ( $\mu\text{m}^2$ ) del estriado dorsomedial durante la adquisición. No se encontraron diferencias significativas ( $p>0.05$ ). Intacto, grupo sin tratamiento; **0.0 mA**, grupo de animales entrenado sin choque eléctrico; **0.5 mA**, grupo entrenado con intensidad baja de choque eléctrico; **1.0 mA**, grupo entrenado con intensidad moderada de choque eléctrico; **2.0 mA**, grupo entrenado con intensidad alta de choque eléctrico; **Sch 2.0**, grupo estimulado con 2.0 mA pero sin entrenamiento (control choque).



**Figura 23.** Promedio de la señal de Arc/Área ( $\mu\text{m}^2$ ) del estriado ventrolateral; se marcan las diferencias significativas con los símbolos. \* ( $p<0.05$ ) para comparaciones con el grupo control intacto y + ( $p<0.05$ ) para comparaciones entre grupos experimentales. Intacto, grupo sin tratamiento; **0.0 mA**, grupo de animales entrenado sin choque eléctrico; **0.5 mA**, grupo entrenado con intensidad baja de choque eléctrico; **1.0 mA**, grupo entrenado con intensidad moderada de choque eléctrico; **2.0 mA**, grupo entrenado con intensidad alta de choque eléctrico; **Sch 2.0**, grupo estimulado con 2.0 mA pero sin entrenamiento (control choque).

A diferencia de las regiones anteriormente nombradas se encontraron diferencias significativas (ANOVA,  $F_{5, 17}=3.839$ ;  $p=0.0164$ ) en el área ventrolateral del estriado (Figura 23), por lo cual se realizó una prueba post hoc de Fisher para las comparaciones entre grupos; que arrojó diferencias significativas entre los animales entrenados con el choque alto y el resto de los tratamientos. ( $p= 0.0113, 0.0041, 0.0070, 0.0138$  y  $0.0009$  para  $0.0 \text{ mA vs } 2.0 \text{ mA}$ ,  $0.5 \text{ mA vs } 2.0 \text{ mA}$ ,  $1.0 \text{ mA vs } 2.0 \text{ mA}$  y  $\text{SSK } 2.0 \text{ mA vs } 2.0 \text{ mA}$ , respectivamente).

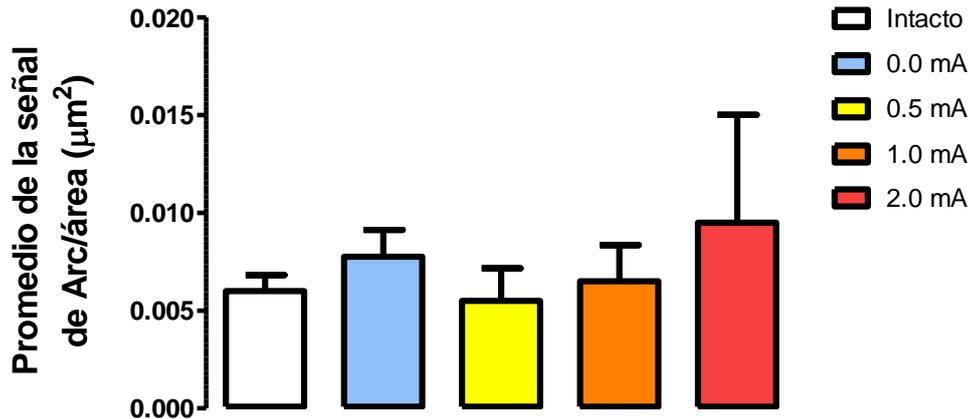
Resultados similares fueron encontrados al analizar la región ventromedial del estriado (Figura 24), hallando diferencias significativas (ANOVA,  $F_{5,17}=3.520$ ;  $p=0.0229$ ). Al realizar la comparación entre pares de grupos con la prueba de Fisher, se encontraron diferencias entre AEI 0.0 vs AEI 2.0, AEI 0.5 vs AEI 2.0 y SSK 2.0 vs AEI 2.0 ( $p= 0.0266, 0.0213, 0.0060$  y  $0.0011$  respectivamente).



**Figura 24.** Promedio de la señal de Arc/Área ( $\mu\text{m}^2$ ) del estriado ventrolateral; se marcan las diferencias significativas con los símbolos. \* ( $p<0.05$ ) para comparaciones con el grupo control intacto y + ( $p<0.05$ ) para comparaciones entre grupos experimentales. Intacto, grupo sin tratamiento; **0.0 mA**, grupo de animales entrenado sin choque eléctrico; **0.5 mA**, grupo entrenado con intensidad baja de choque eléctrico; **1.0 mA**, grupo entrenado con intensidad moderada de choque eléctrico; **2.0 mA**, grupo entrenado con intensidad alta de choque eléctrico; **Sch 2.0**, grupo estimulado con 2.0 mA pero sin entrenamiento (control choque).

Al analizar la expresión de Arc durante la evocación no se encontraron diferencias significativas en ninguna de las regiones del estriado con respecto a los distintos tratamientos (Figuras 25, 26, 27 y 28).

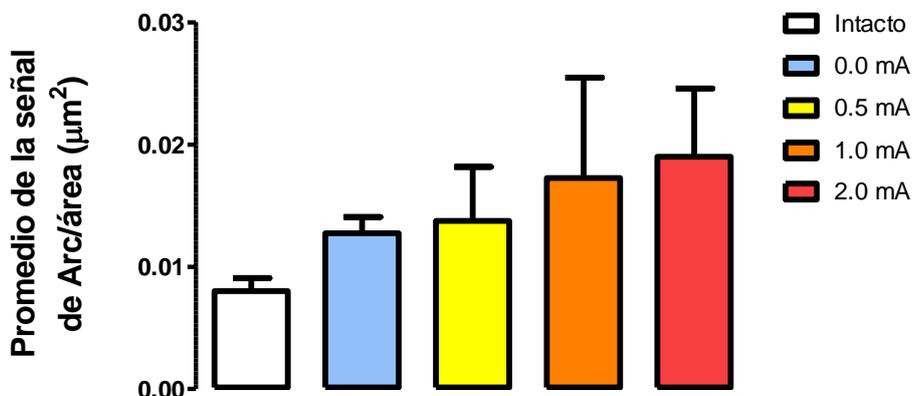
## Estriado Dorsolateral



**Figura 25.** Promedio de la señal de Arc/Área ( $\mu\text{m}^2$ ) del estriado dorsolateral, durante la evocación de la tarea de evitación. No se encontraron diferencias significativas ( $p>0.05$ ). Intacto, grupo sin tratamiento; **0.0 mA**, grupo de animales entrenado sin choque eléctrico; **0.5 mA**, grupo entrenado con intensidad baja de choque eléctrico; **1.0 mA**, grupo entrenado con intensidad moderada de choque eléctrico; **2.0 mA**, grupo entrenado con intensidad alta de choque eléctrico; **Sch 2.0**, grupo estimulado con 2.0 mA pero sin entrenamiento (control choque).

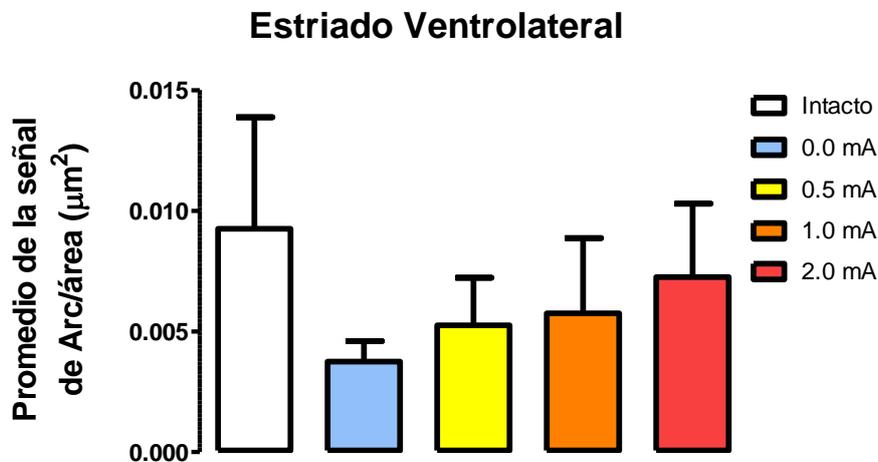
En el estriado dorsomedial se puede observar un aumento continuo de la expresión de la proteína Arc durante la evocación, conforme se aumentó la intensidad de la estimulación en el entrenamiento (Figura 26). La alta variabilidad de la señal no permitió encontrar diferencias significativas entre los tratamientos aplicados.

## Estriado Dorsomedial

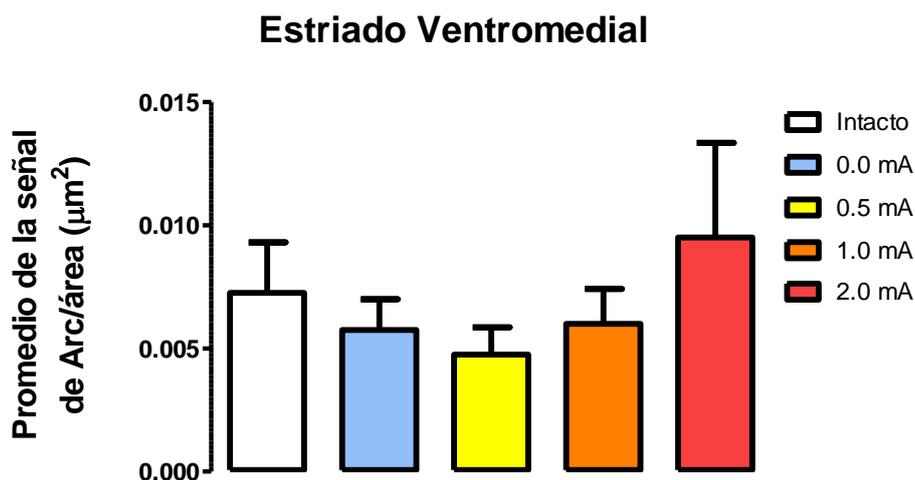


**Figura 26.** Promedio de la señal de Arc/Área ( $\mu\text{m}^2$ ) del estriado dorsomedial durante la adquisición. No se encontraron diferencias significativas ( $p>0.05$ ). Intacto, grupo sin tratamiento; **0.0 mA**, grupo de animales entrenado sin choque eléctrico; **0.5 mA**, grupo entrenado con intensidad baja de choque eléctrico; **1.0 mA**, grupo entrenado con intensidad moderada de choque eléctrico; **2.0 mA**, grupo entrenado con intensidad alta de choque eléctrico; **Sch 2.0**, grupo estimulado con 2.0 mA pero sin entrenamiento (control choque).

A diferencia de la adquisición las regiones ventrales del estriado no presentaron una activación particular para ninguno de los tratamientos mostrando también una gran variabilidad de los datos. En el estriado ventrolateral se puede observar una dinámica similar a la mostrada en la región dorsomedial (Figura 27).



**Figura 27.** Promedio de la señal de Arc/Área ( $\mu\text{m}^2$ ) del estriado ventrolateral durante la adquisición. No se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ). Intacto, grupo sin tratamiento; **0.0 mA**, grupo de animales entrenado sin choque eléctrico; **0.5 mA**, grupo entrenado con intensidad baja de choque eléctrico; **1.0 mA**, grupo entrenado con intensidad moderada de choque eléctrico; **2.0 mA**, grupo entrenado con intensidad alta de choque eléctrico; **Sch 2.0**, grupo estimulado con 2.0 mA pero sin entrenamiento (control choque).



**Figura 28.** Promedio de la señal de Arc/Área ( $\mu\text{m}^2$ ) del estriado ventromedial durante la adquisición. No se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ). Intacto, grupo sin tratamiento; **0.0 mA**, grupo de animales entrenado sin choque eléctrico; **0.5 mA**, grupo entrenado con intensidad baja de choque eléctrico; **1.0 mA**, grupo entrenado con intensidad moderada de choque eléctrico; **2.0 mA**, grupo entrenado con intensidad alta de choque eléctrico; **Sch 2.0**, grupo estimulado con 2.0 mA pero sin entrenamiento (control choque).

En el estriado ventromedial se observa tendencia a un efecto en forma de U conforme se aumenta la intensidad del entrenamiento (Figura 28), encontrándose el valle en los animales entrenados con 0.5 mA y el pico más alto en los animales entrenados con el choque de 2.0 mA; sin embargo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

## **13. DISCUSIÓN**

Las principales contribuciones del presente trabajo son:

1. Se obtuvo evidencia que durante la prueba de evitación, los choques eléctricos de 1.0 y 2.0 mA inducen una ejecución conductual que demuestra un mayor índice de aprendizaje, en contraste con el inducido por el choque eléctrico más bajo.
2. En el estriado ventral (tanto medial como lateral) se activa una población de mayor tamaño de células durante el aprendizaje utilizando el choque eléctrico más alto, en comparación con el resto de las condiciones. Esta activación no se observa en los animales sin entrenamiento que recibieron el choque eléctrico de la misma intensidad. No se observaron diferencias en el estriado dorsal.
3. En la evocación no se encontraron diferencias entre los grupos en cuanto al número de células activas, solo tendencias, pero la variabilidad se debe de reducir para obtener resultados concluyentes, lo que se lograra mediante la inclusión en el análisis de un mayor número de imágenes.

### **13.1. Modificación de la tarea de evitación**

El entrenamiento de la tarea de evitación utilizada en la presente tesis, se llevó a cabo de la misma forma como se ha reportado en experimentos previos donde se utilizó la tarea de evitación inhibitoria (Prado-Alcalá, 2006). Sin embargo, en este estudio con el propósito de controlar que los animales visitaran ambos compartimentos, lo que definitivamente incide sobre el número de células de lugar estriatales activas (Mizumori et al., 2000; Yeshenko et al., 2004), decidimos ubicar al animal durante el inicio de la prueba de evocación, en el compartimento de castigo. De esta manera se garantizó que todos los animales exploraran ambos compartimentos y por lo tanto la homogeneidad en la activación de las células de lugar del estriado (Yeshenko et al., 2004).

Debido a que en la literatura no hemos encontrado reportes de este tipo de tarea, consideramos relevante medir diferentes variables con el fin de recabar la mayor cantidad de información y así evaluar la retención del aprendizaje durante la prueba de memoria:

1. Pasados 10 segundos de que el sujeto se ubicó en el compartimento de castigo, se abrió la compuerta y se midió el tiempo que demoró el animal en escapar del compartimento de castigo; parámetro al cual se le denominó “latencia de cruce al compartimento de seguridad”.
2. Posteriormente se le permitió al animal el libre desplazamiento entre los dos compartimentos, contabilizando el tiempo que permaneció en el compartimento de seguridad y en el de castigo; parámetro al cual se le denominó “tiempo en el compartimento” de castigo o de seguridad según el caso.
3. Otro parámetro a considerar fue el número de veces que el animal cruzó al compartimento de castigo, este último parámetro se le denominó “Cruce entre compartimentos”.

Al cabo de 300 segundos desde el inicio de la prueba se retiró al animal de la caja dando la prueba por concluida.

De los parámetros observados la latencia de cruce al compartimento de seguridad fue el único que no presentó diferencias significativas mostrando que los animales que fueron sometidos a un choque eléctrico presentaron latencias de cruce estadísticamente iguales a los animales que no recibieron dicho estímulo por lo cual no se puede inferir que los animales hubieran evitado el choque eléctrico mudándose al compartimento de seguridad.

Debido a que el día de la prueba no se administró el choque eléctrico a los animales no es posible afirmar que la tarea realizada pueda ser clasificada como un paradigma de escape puesto que por definición el aprendizaje de escape se realiza únicamente cuando el estímulo aversivo está presente (Brush, 2004). También se podría discutir que los animales no hayan aprendido una asociación entre el contexto del compartimento oscuro y la aplicación del estímulo aversivo sin embargo las otras mediciones realizadas nos permiten concluir lo contrario.

Los parámetros de “tiempo en el compartimento” y “cruce entre compartimentos” mostraron diferencias significativas en los grupos que fueron sometidos a las diferentes intensidades de choque eléctrico en comparación con el grupo que no recibió choque.

En el segundo parámetro, al comparar la conducta de los animales que recibieron choque eléctrico con los que no lo recibieron, pudimos observar una clara respuesta instrumental que previene la exposición al estímulo aversivo. Esta

conducta ha sido descrita como parte de un procedimiento de evitación típico (Declercq & De Houwer, 2011; Solomon, Kamin, & Wynne, 1953), en el cual, un estímulo de alerta (en nuestro caso el contexto del compartimento oscuro) es seguido por un estímulo incondicionado (choque eléctrico) el cual es evitado por medio de la aparición de una respuesta de evitación la cual en este experimento se observa como la permanencia del animal en el compartimento de seguridad.

El tercer parámetro “número de cruces”, fue significativamente más bajo en los animales que recibieron choque eléctrico que en los animales sin choque, además de que el número de cruces fue menor en las intensidades más altas.

Esta medida fue previamente establecida como parámetro de medición de ansiedad (Crawley & Goodwin, 1980), y aunque existen variaciones, los animales generalmente son colocados en alguno de los dos compartimientos y se mide el número de cruces y tiempo de latencia de salida de la caja. Las drogas tranquilizantes aumentan el número de cruces que realizan los animales entre los dos compartimientos, mientras que el tiempo que permanecen en el lugar luminoso y la actividad general no manifiesta cambios. Los agentes ansiogénicos, en cambio, provocan menos tiempo de permanencia en el lugar luminoso y menor cantidad de traslados en función del lugar donde colocan al animal, a mayor ansiedad mayor latencia en salir del lugar oscuro o menor latencia de entrar al iluminado (Mustaca & Kamenetzky, 2006).

Sin embargo la conducta de ansiedad produce comúnmente las respuestas de evitación, congelamiento y reducción de la exploración que son generalmente utilizadas como indicadores de miedo condicionado en todas las tareas de evitación, tanto inhibitoria como activa. Lo cual indica que los animales realizaron correctamente la asociación entre el contexto y el estímulo aversivo, además de la asociación entre la conducta el reforzador negativo.

Para concluir con este aporte y teniendo en cuenta los cambios ocurridos en la conducta de los animales expuestos a los distintos niveles de choque eléctrico, podemos proponer a los parámetros de medición “tiempo en el compartimento” y “cruce entre compartimentos” como indicadores del nivel de retención alcanzado por los animales.

Lo anterior deja claro que en estas condiciones en las que se llevó a cabo la tarea de evitación, los animales establecieron una relación de predictibilidad entre la

representación del contexto que se genera por la experiencia en el compartimento oscuro y el choque eléctrico, esta relación de predictibilidad incide directamente sobre la variable conductual y es en sí misma un aprendizaje asociativo.

### **13.2. Parámetros conductuales**

Teniendo en cuenta los parámetros de medición conductual de “tiempo en el compartimento” y “numero de cruces” logramos determinar que los animales aprendieron diferencialmente la tarea aversiva lo cual se puede observar en las Figuras 19 y 20; que muestran como las intensidades de choque moderada y alta (1.0 y 2.0 mA) generaron respuestas de miedo condicionado (como son la disminución de la actividad de exploración, disminución de la permanencia del sujeto en el contexto al cual se le sometió al estímulo aversivo), superiores a las respuestas inducidas en los animales entrenados con las intensidades bajas o a los que no se les administro ningún choque eléctrico.

### **13.3. Actividad neuronal durante la adquisición**

El mapeo mostró que la actividad neuronal durante la adquisición no cambió en las regiones dorsales pero si en las regiones ventrales del estriado, mostrando una marcada regionalización de la actividad únicamente cuando los animales fueron entrenados con el choque alto (2.0 mA), es importante mencionar que los animales que fueron sometidos a la misma intensidad de choque eléctrico pero sin entrenamiento no presentaron una activación similar en ninguna de las regiones del estriado.

Numerosos experimentos han establecido que en condiciones de sobrerreforzamiento se produce un efecto protector en el almacenamiento de la información incluso ante bloqueadores de la actividad neuronal como la tetrodotoxina y los inhibidores de la síntesis de proteínas; han sido diversos los estudios encaminados a dilucidar el funcionamiento de este efecto protector y de sus alcances (Díaz-Trujillo et al., 2009; Prado-Alcalá et al., 2006; Quiroz et al., 2003).

Una de las hipótesis más aceptadas es la del procesamiento en paralelo en la cual varias estructuras o circuitos son reclutados sumándose al circuito o estructura preferente para el procesamiento de dicha información. De tal manera que al ser disminuida o inhibida la funcionalidad de este circuito preferente, circuitos extras

tienen la capacidad de procesar y almacenar esta información permitiendo su evocación cuando sea necesaria (Prado-Alcalá et al., 2006).

Los estudios sobre el aprendizaje incrementado utilizando lesiones en el estriado han sido realizados causando bloqueos de la actividad colinérgica o de la actividad general de esta estructura (Díaz del Guante et al., 1990; Pérez-Ruíz & Prado-Alcalá, 1989). Sin embargo las lesiones realizadas en estos estudios se ubicaron únicamente en la región dorsal del estriado dejando intacta a la región ventral.

Considerando nuestros resultados, podemos sugerir que la activación del estriado ventral, la cual ocurre de manera exclusiva en los animales entrenados con choques eléctricos altos (2.0 mA), podría ser en parte la explicación acerca del almacenamiento de la información que se presenta en los animales que han sido tratados con agentes amnésicos como en los trabajos citados en el párrafo anterior.

Esto no significa que la actividad neuronal redundante en el estriado ventral sea suficiente para explicar e identificar a los circuitos neuronales que participan en el aprendizaje incrementado y que explican la protección, sino que puede representar un ejemplo de los mecanismos que explican este fenómeno de aprendizaje.

En este orden de ideas es importante la realización de un estudio más amplio en donde se observe la actividad neuronal en otras estructuras cerebrales implicadas en el procesamiento y el almacenamiento de información de aprendizajes incrementados.

Otro aspecto a tener en cuenta es la conectividad tanto aferente como eferente del estriado ventral, la cual es diferente de la conectividad observada en la región dorsal. Con respecto a las aferencias de la región ventrolateral, encontramos conexiones provenientes de las cortezas somatosensoriales de la región frontal (Voorn et al., 2004) las cuales están somatotípicamente organizadas enviando información sensoriomotora a esta región, siendo la información de la cabeza del animal la correspondiente a la región ventral (Brown, Smith, & Goldbloom, 1998). Otra aferencia cortical proviene de la corteza cingulada dorsal anterior (Voorn et al., 2004), la cual se relaciona con los procesos mnémicos generados por tareas aversivas (Holloway & McIntyre, 2011).

Por último también se han descrito aferencias provenientes del tálamo las cuales provienen de un grupo lateral que comprende los núcleos paracentral, central lateral y la parte anterior del núcleo central medial las cuales se ha descrito que participan en funciones cognitivas (Van der Werf, Witter, & Groenewegen, 2002; Voorn et al., 2004).

Con respecto a la región ventromedial del estriado, las conexiones corticales provienen de la corteza cingulada dorsal anterior y la corteza prelímbica dorsal y ventral (Voorn et al., 2004), las cuales se han determinado como áreas corticales superiores de asociación y se sabe envían al estriado información asociativa de alto orden (Berendse, Groenewegen, & Lohman, 1992; McGeorge & Faull, 1989). Además también se han encontrado conexiones con los núcleos amigdalinos basales caudales (Wright, Beijer, & Groenewegen, 1996).

Por otro lado las aferencias talámicas provienen del núcleo paracentral, la parte anterior del núcleo central medial y el núcleo paraventricular que han sido asociados a funciones cognitivas, al procesamiento de la información visceral, a las relaciones de ajuste de estado y a las situaciones de estrés (Van der Werf et al., 2002; Voorn et al., 2004).

Teniendo en cuenta el gran tamaño, la variada conectividad que posee el estriado y su capacidad de recibir, integrar y procesar un variado repertorio de señales de otras estructuras, no resulta difícil inferir que exista un proceso de reclutamiento de nuevos circuitos que estén procesando diversos tipos de información en el momento en que el animal es sometido a una experiencia de aprendizaje incrementado (McDonald & White, 1993; Packard & Knowlton, 2002). Estas conexiones aferentes de las regiones ventrales del estriado podrían explicar el tipo de información multimodal que se está procesando y como el aumento en la intensidad de la experiencia aversiva podría estar regulando vía tálamo-estriatal y cortico-estriatal la activación diferencial en el estriado y su participación en el efecto protector que produce el aprendizaje incrementado.

En este orden de ideas los resultados obtenidos abren la posibilidad de ver al estriado como un sistema integrador y reclutador de nueva circuitería en el momento en que se dé una experiencia de sobrerreforzamiento. Claro está que este trabajo es solo una aproximación y como mencionamos anteriormente aún faltan muchos experimentos que puedan sostener dicha afirmación.

Debido a que los dos tipos de vías eferentes del estriado se encuentran homogéneamente distribuidas y a que desafortunadamente las herramientas utilizadas en este estudio no permitieron observar a que regiones del cerebro proyectan las células que se activaron en el estriado; no se pudo determinar exactamente que estructuras están siendo activadas en respuesta a la actividad estriatal asociada al aprendizaje incrementado. Una posibilidad es utilizar un marcador que señalice a alguno de los dos tipos de receptores a dopamina (D1 y D2) y de esta forma lograr dilucidar cuál de las dos vías está siendo activada mayoritariamente.

#### **13.4. Actividad neuronal durante la evocación**

Una historia muy distinta hay que contar acerca de la participación del estriado en la evocación de la información que se procesó 48 horas antes. Los resultados observados en este trabajo no dejan clara la contribución que realiza el estriado; es muy posible que esta estructura este funcionando como sistema de integración y de procesamiento de la información pero no sea precisamente la estructura encargada de su almacenamiento y/o evocación.

Siendo así esta sería una razón por la que no se visualice un cambio en la actividad neuronal durante la evocación. Otra posibilidad es que una de las propiedades de los circuitos neuronales que participan en el procesamiento y almacenamiento de la información, llamada refinamiento o codificación escasa (la cual sugiere que un ensamble conforme se consolida debe disminuir la mayor cantidad posible de neuronas para evitar la saturación y aumentar la capacidad mnémica del sistema) (Hebb, 1949), logre disminuir la cantidad de neuronas activadas de tal manera que no sean detectables las diferencias por medio de la técnica utilizada en este trabajo. Sería recomendable aumentar la resolución del análisis por medio de un conteo celular el cual posiblemente esclarecería de manera más fina si existen diferencias significativas en la activación de neuronas asociadas a la evocación de la tarea entrenada con diferentes niveles de choque eléctrico.

### **13.5. Implicaciones teóricas**

Por último, las implicaciones teóricas de este estudio conllevan a verificar la hipótesis de Prado-Alcalá et al. (2006) sobre el reclutamiento de otras estructuras o en este caso de regiones de la misma estructura, que podrían estar participando en el procesamiento de la información, el cual permite que los animales sometidos al aprendizaje incrementado logren evocar la información a pesar de ser sometidos a tratamientos amnésicos.

Teniendo en cuenta esta afirmación, este estudio nos permite sugerir un mecanismo de activación de circuitos en al menos una estructura cerebral; tras el cual empezar la búsqueda del sustrato neuronal del aprendizaje incrementado; lo cual aunque es muy precipitado y tiene repercusiones teóricas bastante fuertes, nos invita a la realización de un variado repertorio de experimentos que son necesarios no solo para comprobarlo si no para estudiarlo y comprender su funcionamiento.

## 14. CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta las hipótesis planteadas, los resultados obtenidos y la discusión de estos se llegó a las siguientes conclusiones:

Se observó un aumento en la retención de los animales conforme se aumentó la intensidad del choque eléctrico, lo cual nos permitió aceptar la hipótesis 1.

Debido a que no se observó un aumento gradual en la expresión de la proteína del IEG Arc durante la adquisición y solo se observó dicho aumento en el choque eléctrico más alto (2.0 mA) se rechazó la hipótesis 2

Igualmente se rechaza la hipótesis 3 debido a que no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de la proteína del IEG Arc durante la evocación.

Por otro lado la expresión de la proteína del IEG Arc presentó un aumento solo en algunas de las regiones del estriado por lo cual se aceptó la hipótesis 4.

Teniendo en cuenta las conclusiones anteriores se logró demostrar la participación del estriado en el reclutamiento de distintos circuitos neuronales, en diferentes regiones del mismo, cuando los animales son sometidos a experiencias con diferentes niveles de aprendizaje.

Gracias a la técnica de análisis por área de señal se logró realizar un mapeo rápido de una gran cantidad de territorio encontrando diferencias en la regionalización del estriado y permitiendo el enfoque en la búsqueda de zonas en donde se puedan realizar estudios más detallados como el conteo celular; que permitirán encontrar con una mayor exactitud la diferenciación en el reclutamiento regionalizado de circuitos neuronales y quizá dilucidar algunos de los mecanismos implicados en el aprendizaje incrementado.

Finalmente el presente trabajo permitió el diseño de una tarea de evitación en la cual todos los sujetos entrenados estuvieran sometidos a las mismas condiciones de contexto sin que la evocación de la misma pudiera impedir que los animales exploraran o no alguno de los compartimentos. De esta manera se garantizó que todos los animales estuvieran bajo los mismos estímulos y así homogenizar en todos los grupos la activación de las células de lugar del estriado.

## 15. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott, L. F., & Nelson, S. B. (2000). Synaptic plasticity: taming the beast. *Nature Neuroscience*, 3 Suppl, 1178-1183.
- Aguado-Aguilar, L. (2001). Aprendizaje y memoria. *Revista de Neurología*, 32, 373-381.
- Anderson, J. R., Arellano, J. A. V., & Castañeda, Á. I. (2001). Aprendizaje y memoria: Un enfoque integral. *Revista de Neurología*, 32, 373-381.
- Bailey, C. H., Bartsch, D., & Kandel, E. R. (1996). Toward a molecular definition of long-term memory storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 13445-13452.
- Berendse, H., Groenewegen, H., & Lohman, A. (1992). Compartmental distribution of ventral striatal neurons projecting to the mesencephalon in the rat. *The Journal of Neuroscience*, 12, 2079-2103.
- Bliss, T. V., & Lomo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of Physiology*, 232, 331-356.
- Brown, L. L., Smith, D. M., & Goldbloom, L. M. (1998). Organizing principles of cortical integration in the rat neostriatum: corticostriate map of the body surface is an ordered lattice of curved laminae and radial points. *The Journal of Comparative Neurology*, 392, 468-488.
- Bures, J., Buresová, C., & Huston, J. P. (1983). *Techniques and basic experiments for the study of brain and behaviour*. Amsterdam: Elsevier.
- Carew, T. J., Marcus, E. A., Nolen, T. G., Rankin, C. H., & Stopfer, M. (1990). Development of learning and memory in *Aplysia*. En J. C. McGaugh, N. Weinberger & G. Lynch (Eds.), *Brain organization and memory: Cells, systems and circuits* (pp. 27-51). New York: Oxford University Press.
- Cobos-Zapíaín, G. G., Salado-Castillo, R., Sánchez-Alavez, M., Quirarte, G. L., Roldán-Roldán, G., Díaz del Guante, M. A., & Prado-Alcalá, R. A. (1996). High level of footshock during inhibitory avoidance training prevents amnesia induced by intranigral injection of GABA antagonists. *Neurobiology of Learning and Memory*, 65, 202-206.
- Crawley, J., & Goodwin, F. K. (1980). Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 167-170
- Decker, M. W., & McGaugh, J. L. (1991). The role of interactions between the cholinergic system and other neuromodulatory systems in learning and memory. *Synapse* 7, 151-168.
- Declercq, M., & De Houwer, J. (2011). Evidence against an occasion setting account of avoidance learning. *Learning and Motivation*, 42, 46-52.
- Díaz-Trujillo, A., Contreras, J., Medina, A. C., Silveyra-Leon, G. A., Antaramian, A., Quirarte, G. L., & Prado-Alcalá, R. A. (2009). Enhanced inhibitory avoidance learning prevents the long-term memory-impairing effects of cycloheximide, a protein synthesis inhibitor. *Neurobiology of Learning and Memory*, 91, 310-314.
- Díaz del Guante, M. A., Rivas-Arancibia, S., Quirarte, G., & Prado-Alcalá, R. A. (1990). Over-reinforcement protects against memory deficits induced by muscarinic blockade of the striatum. *Boletín de Estudios Médicos y Biológicos*,

38, 49-53.

- Divac, I., Rosvold, H. E., & Szwarcbart, M. K. (1967). Behavioral effects of selective ablation of the caudate nucleus. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 63, 183-190.
- 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, 725-727.
- Fonnum, F., Storm-Mathisen, J., & Divac, I. (1981). Biochemical evidence for glutamate as neurotransmitter in corticostriatal and corticothalamic fibres in rat brain. *Neuroscience*, 6, 863-873.
- Gerfen, C. R., & Wilson, C. J. (1996). The basal ganglia. En L. W. Swanson, A. Bjorklund & T. Hökfelt (Eds.), *Handbook of chemical neuroanatomy* (Vol. 12, pp. 371-468). Amsterdam: Science BV.
- Giordano, M., & Prado-Alcalá, R. A. (1986). Retrograde amnesia induced by post-trial injection of atropine into the caudate-putamen Protective effect of the negative reinforcer. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 24, 905-909.
- Gold, P. E. (2003a). Acetylcholine modulation of neural systems involved in learning and memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, 80, 194-210.
- Gold, P. E. (2003b). Acetylcholine: Cognitive and brain functions. *Neurobiology of Learning and Memory*, 80, 177.
- Gonzalez-Franco, D. A. (2009). *Inhibición de la síntesis de proteínas en el estriado dorsal sobre un aprendizaje mediado por niveles bajos y altos de reforzamiento*. Programa de Biología. Sin publicar, Universidad del Tolima.
- Graybiel, A. M. (1990). Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia. *Trends in Neurosciences*, 13, 244-254.
- Guzowski, J. F., Lyford, G. L., Stevenson, G. D., Houston, F. P., McGaugh, J. L., Worley, P. F., & Barnes, C. A. (2000). Inhibition of activity-dependent arc protein expression in the rat hippocampus impairs the maintenance of long-term potentiation and the consolidation of long-term memory. *The Journal of Neuroscience*, 20, 3993-4001.
- Guzowski, J. F., Setlow, B., Wagner, E. K., & McGaugh, J. L. (2001). Experience-dependent gene expression in the rat hippocampus after spatial learning: A comparison of the immediate-early genes Arc, c-fos, and zif268. *The Journal of Neuroscience*, 21, 5089-5098.
- Hebb, D. O. (1949). *The Organization of behavior: A neuropsychological theory*. New York: John Wiley & Sons Inc.
- Hilgard, E. R., & Bower, G. H. (1987). *Teorías del aprendizaje* (10<sup>ma</sup> ed.). México: Trillas.
- Holloway, C. M., & McIntyre, C. K. (2011). Post-training disruption of Arc protein expression in the anterior cingulate cortex impairs long-term memory for inhibitory avoidance training. *Neurobiology of Learning and Memory*, 95, 425-432.
- ILAR. (1996). *Guide for the care and use of laboratory animals*. Washington, DC: National Academy Press.
- Kawaguchi, Y., Wilson, C. J., Augood, S. J., & Emson, P. C. (1995). Striatal interneurons: Chemical, physiological and morphological characterization. *Trends in Neurosciences*, 18, 527-535.
- Kemp, J. M., & Powell, T. P. (1971). The structure of the caudate nucleus of the cat: Light and electron microscopy. *Philosophical Transactions of the Royal*

- Society of London. Series B: Biological Sciences*, 262, 383-401.
- Kimura, M., & Graybiel, A. M. (1995). *Functions of cortico-basal ganglia loop USA*: Springer.
- Kovacs, K. J. (1998). c-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map. *Neurochemistry International*, 33, 287-297.
- Lamprecht, R., & LeDoux, J. (2004). Structural plasticity and memory. *Nature Reviews Neuroscience*, 5, 45-54.
- Link, W., Konietzko, U., Kauselmann, G., Krug, M., Schwanke, B., Frey, U., & Kuhl, D. (1995). Somatodendritic expression of an immediate early gene is regulated by synaptic activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 5734-5738.
- Lyford, G. L., Yamagata, K., Kaufmann, W. E., Barnes, C. A., Sanders, L. K., Copeland, N. G., ...Worley, P. F. (1995). Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites. *Neuron*, 14, 433-445.
- Martínez, I., Quirarte, G. L., Díaz-Cintra, S., Quiroz, C., & Prado-Alcalá, R. A. (2002). Effects of lesions of hippocampal fields CA1 and CA3 on acquisition of inhibitory avoidance. *Neuropsychobiology*, 46, 97-103.
- McDonald, R. J., & White, N. M. (1993). A triple dissociation of memory systems: Hippocampus, amygdala, and dorsal striatum. *Behavioral Neuroscience*, 107, 3-22.
- McGeorge, A. J., & Faull, R. L. (1989). The organization of the projection from the cerebral cortex to the striatum in the rat. *Neuroscience*, 29, 503-537.
- Mengual, E., de las Heras, S., Erro, E., Lanciego, J. L., & Gimenez-Amaya, J. M. (1999). Thalamic interaction between the input and the output systems of the basal ganglia. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 16, 187-200.
- Mizumori, S. J., Cooper, B. G., Leutgeb, S., & Pratt, W. E. (2000). A neural systems analysis of adaptive navigation. *Molecular Neurobiology*, 21, 57-82.
- Mizumori, S. J., Puryear, C. B., & Martig, A. K. (2009). Basal ganglia contributions to adaptive navigation. *Behavioural Brain Research*, 199, 32-42.
- Mizumori, S. J. Y., Yeshenko, O., Gill, K. M., & Davis, D. M. (2004). Parallel processing across neural systems: Implications for a multiple memory system hypothesis. *Neurobiology of Learning and Memory*, 82, 278-298.
- Morgado, I. (2005). Psicobiología del aprendizaje y la memoria: fundamentos y avances recientes. *Revista de Neurología*, 40, 289-297.
- Mustaca, A., & Kamenetzky, G. V. (2006). Alcoholismo y ansiedad: Modelos animales. *International Journal of Psychology & Psychological Therapy*, 6, 343-364.
- Ons, S., Marti, O., & Armario, A. (2004). Stress-induced activation of the immediate early gene Arc (activity-regulated cytoskeleton-associated protein) is restricted to telencephalic areas in the rat brain: relationship to c-fos mRNA. *Journal of Neurochemistry*, 89, 1111-1118.
- Packard, M. G., & Knowlton, B. J. (2002). Learning and memory functions of the basal ganglia. *Annual Review of Neuroscience*, 25, 563-593.
- Paxinos, G., & Watson, C. (2005). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego.
- Pérez-Ruíz, C., & Prado-Alcalá, R. A. (1989). Retrograde amnesia induced by lidocaine injection into the striatum: Protective effect of the negative reinforcer. *Brain Research Bulletin*, 22, 599-603.

- Poldrack, R. A., & Packard, M. G. (2003). Competition among multiple memory systems: Converging evidence from animal and human brain studies. *Neuropsychologia*, *41*, 245-251.
- Prado-Alcalá, R. A. (1985). Is cholinergic activity of the caudate nucleus involved in memory? *Life Sciences*, *37*, 2135-2142.
- Prado-Alcalá, R. A., Cobos-Zapiaín, G., Salado-Castillo, R., Quiroz Molina, C. R., Garín-Aguilar, M. E., Díaz, A. (2006). El aprendizaje incrementado protege a la memoria contra tratamientos amnésicos. *Revista Mexicana de Análisis de la Conducta*, *32*, 203-218.
- Prado-Alcalá, R. A., & Cobos-Zapiaín, G. G. (1979). Interference with caudate nucleus activity by potassium chloride Evidence for a 'moving' engram. *Brain Research*, *172*, 577-583.
- Prado-Alcalá, R. A., Díaz del Guante, M. A., Garín-Aguilar, M. E., Díaz-Trujillo, A., Martínez-García, M. I., & Quirarte, G. L. (2007). Reorganización cerebral inducida por la experiencia incrementada de aprendizaje en Investigación en Neurociencias. En R. de Celis (Ed.), *Homenaje al Dr. Alfredo Feria Velasco* (pp. 221-224). Guadalajara: Bios-Médica Editores y Diseño, S.A. de C.V.
- Prensa, L., Parent, A., & Gimenez-Amaya, J. M. (1999). La organización compartimental del estriado humano. *Revista de Neurología*, *28*, 512-519.
- Quiroz, C., Martínez, I., Quirarte, G. L., Morales, T., Díaz-Cintra, S., & Prado-Alcalá, R. A. (2003). Enhanced inhibitory avoidance learning prevents the memory-impairing effects of post-training hippocampal inactivation. *Experimental Brain Research*, *153*, 400-402.
- Ramírez-Amaya, V., Vazdarjanova, A., Mikhael, D., Rosi, S., Worley, P. F., & Barnes, C. A. (2005). Spatial exploration-induced Arc mRNA and protein expression: evidence for selective, network-specific reactivation. *The Journal of Neuroscience* *25*, 1761-1768.
- Roberts, R. C., Gaither, L. A., Peretti, F. J., Lapidus, B., & Chute, D. J. (1996). Synaptic organization of the human striatum: a postmortem ultrastructural study. *The Journal of Comparative Neurology*, *374*, 523-534.
- Rosenzweig, M. R. (1996). Aspects of the search for neural mechanisms of memory. *Annual Review of Psychology*, *47*, 1-32.
- Salado-Castillo, R., Sánchez-Alavez, M., Quirarte, G. L., & Prado-Alcalá, R. A. (1995). *Reversible lesions of striatum, amygdala, and substantia nigra after inhibitory avoidance: Differential effects of high and low footshock intensity*. Resumen presentado en 25<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Neuroscience, San Diego.
- Senba, E., & Ueyama, T. (1997). Stress-induced expression of immediate early genes in the brain and peripheral organs of the rat. *Neuroscience Research*, *29*, 183-207.
- Skinner, B. F. (1938). *The behavior of organisms: An experimental analysis* New York: Appleton-Century
- 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*, 391-399.
- Solomon, R. L., Kamin, L. J., & Wynne, L. C. (1953). Traumatic avoidance learning: the outcomes of several extinction procedures with dogs. *Journal of Abnormal Psychology*, *48*, 291-302.
- Squire, L. R. (1992). Memory and the hippocampus: A synthesis from findings with

- rats, monkeys, and humans. *Psychological Review*, 99, 195-231.
- Steward, O., Wallace, C. S., Lyford, G. L., & Worley, P. F. (1998). Synaptic activation causes the mRNA for the IEG Arc to localize selectively near activated postsynaptic sites on dendrites. *Neuron*, 21, 741-751.
- Steward, O., & Worley, P. F. (2001). Selective targeting of newly synthesized Arc mRNA to active synapses requires NMDA receptor activation. *Neuron*, 30, 227-240.
- Stork, O., & Welzl, H. (1999). Memory formation and the regulation of gene expression. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 55, 575-592.
- Tulving, E. (1972). Episodic and semantic memory. *Organization of Memory*. New York, NY: Academic Press, Inc. 382-402
- Van der Werf, Y. D., Witter, M. P., & Groenewegen, H. J. (2002). The intralaminar and midline nuclei of the thalamus. Anatomical and functional evidence for participation in processes of arousal and awareness. *Brain Research*, 39, 107-140.
- Vazdarjanova, A., Ramirez-Amaya, V., Insel, N., Plummer, T. K., Rosi, S., Chowdhury, S., ...Barnes C. A. (2006). Spatial exploration induces ARC, a plasticity-related immediate-early gene, only in calcium/calmodulin-dependent protein kinase II-positive principal excitatory and inhibitory neurons of the rat forebrain. *The Journal of Comparative Neurology*, 498, 317-329.
- Voorn, P., Vanderschuren, L., Groenewegen, H. J., Robbins, T. W., & Pennartz, C. M. A. (2004). Putting a spin on the dorsal-ventral divide of the striatum. *Trends in Neurosciences*, 27, 468-474.
- White, N. M. (1989). A functional hypothesis concerning the striatal matrix and patches: mediation of S-R memory and reward. *Life Sciences*, 45, 1943-1957.
- White, N. M., & McDonald, R. J. (2002). Multiple parallel memory systems in the brain of the rat. *Neurobiology of Learning and Memory*, 77, 125-184.
- Wickens, J. R., Budd, C. S., Hyland, B. I., & Arbuthnott, G. W. (2007). Striatal contributions to reward and decision making: making sense of regional variations in a reiterated processing matrix. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1104, 192-212.
- Wise, S. P., Murray, E. A., & Gerfen, C. R. (1996). The frontal cortex-basal ganglia system in primates. *Critical Reviews in Neurobiology*, 10, 317-356.
- Worley, P. F., Cole, A. J., Murphy, T. H., Christy, B. A., Nakabeppu, Y., & Baraban, J. M. (1990). Synaptic regulation of immediate-early genes in brain. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 55, 213-223.
- Wright, C., Beijer, A., & Groenewegen, H. (1996). Basal amygdaloid complex afferents to the rat nucleus accumbens are compartmentally organized. *The Journal of Neuroscience*, 16, 1877-1893.
- Yeshenko, O., Guazzelli, A., & Mizumori, S. J. Y. (2004). Context-dependent reorganization of spatial and movement representations by simultaneously recorded hippocampal and striatal neurons during performance of allocentric and egocentric tasks. *Behavioral Neuroscience*, 118, 751-769.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.....	3
Figura 2.....	5
Figura 3.....	8
Figura 4.....	10
Figura 5.....	12
Figura 6.....	13
Figura 7.....	14
Figura 8.....	20
Figura 9.....	20
Figura 10.....	21
Figura 11.....	22
Figura 12.....	26
Figura 13.....	27
Figura 14.....	27
Figura 15.....	28
Figura 16.....	30
Figura 17.....	33
Figura 18.....	34
Figura 19.....	34
Figura 20.....	35
Figura 21.....	35
Figura 22.....	36
Figura 23.....	36
Figura 24.....	37
Figura 25.....	38
Figura 26.....	38
Figura 27.....	39
Figura 28.....	39