



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

**EFFECTO DE LA INACTIVACIÓN REVERSIBLE DEL HIPOCAMPO DORSAL  
SOBRE LA RETENCIÓN DE UNA TAREA DE EVITACIÓN INHIBITORIA  
SOBRERREFORZADA**

**T E S I S**

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

**PRESENTA**

**MTRA. MARÍA EUGENIA GARÍN AGUILAR**

**DIRECTOR DE TESIS:  
DR. ROBERTO AGUSTÍN PRADO ALCALÁ  
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

Campus Juriquilla, Querétaro. Enero 2014



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## **AGRADECIMIENTOS**

**Hago explícito mi reconocimiento a las siguientes Instituciones y Unidades por el apoyo que me brindaron para la realización de este trabajo:**

Laboratorio de Aprendizaje y Memoria del Departamento de Neurobiología Conductual y Cognitiva. Instituto de Neurobiología. Campus Juriquilla, UNAM.

Unidad de Computo. Instituto de Neurobiología. Campus Juriquilla, UNAM. Ing. Ramón Martínez, Ing. Alberto Lara Ruvalcaba e Ing. Omar González Hernández.

Unidad de Videoconferencia. Instituto de Neurobiología. Campus Juriquilla, UNAM. Lic. Lourdes Lara Ayala.

Unidad de Enseñanza. Instituto de Neurobiología. Campus Juriquilla, UNAM. M. en C. Leonor Casanova Rico, Sra. Ma. del Carmen Vázquez Rodríguez y Srita. María Leticia Segovia López.

Unidad de Análisis de Imágenes. Instituto de Neurobiología. Campus Juriquilla, UNAM. M. en C. Leopoldo González Santos e Ing. Nidia E. Ríos Hernández.

Biblioteca. Instituto de Neurobiología, Campus Juriquilla, UNAM. Dr. Francisco Javier Valles Velenzuela, Lic. Soledad Medina Aragón y Lic. Ma. del Pilar Galarza Barrios.

Bioterio. Instituto de Neurobiología, Campus Juriquilla, UNAM. M.V.Z. José Martín García Servín.

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Beca de Posgrado No. 171434.

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Proyectos 128259.

Dirección General de Asuntos del Personal Académico. Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica. Proyectos IN201712.

Dirección General de Asuntos del Personal Académico y a la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, quienes a través del Programa de Apoyos para la Superación del Personal Académico de la UNAM permitieron que realizara mis estudios de doctorado en el Instituto de Neurobiología, Campus Juriquilla-UNAM.

## AGRADECIMIENTOS

También quiero expresar mi más sincero agradecimiento:

A la Dra. Andrea Cristina Medina Fragoso por su generosa amistad y su valioso apoyo en todas las etapas del trabajo.

M. en C. Azucena Ruth Aguilar Vázquez por su amistad sincera y el apoyo brindado durante mi estancia de trabajo en el Laboratorio de Neuromorfometría y Desarrollo.

A la M.V.Z. Norma Serafín López, por su amistad y participación cuidadosa en la edición de las referencias.

Al Sr. Ángel Méndez Olalde, por la atención y cuidado brindados a los animales de experimentación.

A la Dra. Sofía Díaz Miranda por el apoyo y asesoría brindados durante mi estancia en su laboratorio y por su amena conversación y compañía en esos largos viajes a Ciudad Universitaria.

A la Dra. Gina L. Quirarte por su apoyo durante mi estancia en el laboratorio de Aprendizaje y Memoria, sus observaciones al manuscrito, su retroalimentación durante los seminarios y permanente motivación para que concluyera este trabajo.

Al Dr. Roberto A. Prado Alcalá por su generosidad al permitirme realizar con él esta travesía. Con él he aprendido que hacer ciencia es una experiencia maravillosa, pero todavía más, compartirla a los demás.

Al Dr. James L. McGaugh por sus aportaciones al manuscrito y porque es un honor tenerlo como co-autor del artículo.

A la Dra. Magda Giordano Loyola y a la Dra. Selva Rivas Arancibia quienes formaron parte de mi Comité Tutorial y cada semestre hicieron sus valiosas aportaciones para enriquecer esta investigación.

A las Integrantes del Jurado: Dra. María Teresa Morales Guzmán, Dra. Beatriz Vázquez Cruz, Dra. Martha Lilia Escobar Rodríguez, Dra. Isabel Miranda Saucedo por su revisión del trabajo y atinadas sugerencias para mejorarlo.

A la Dra. Aurea Orozco Rivas por su apoyo al brindar todas las facilidades para concretar esta meta.

A mis compañeros Isabel, César, Cris, Oscar, Sofi, Erika y Arnulfo con quien compartí conocimientos y agradables momentos en el laboratorio de Aprendizaje y Memoria.

A Clyo por este inimaginable y emotivo reencuentro en el Instituto de Neurobiología.

A los chicos que hoy son parte del equipo de trabajo en el laboratorio de Aprendizaje y Memoria: América, Viridiana, Sofía, Evelina, Cristina Siller Araceli, Jazmín, Gema y Penélope, quienes me recibieron con amabilidad y a mi sobrino Edgar por su apoyo.

## **DEDICATORIA**

**A mis abuelos:**

**Amalita y Francisco, Emiliana y Juan**

**A quienes hoy la memoria trae para agradecerles su valioso legado de amor, trabajo y unión familiar.**

**A mis padres:**

**Dr. Francisco Garín Camacho y**

**Profra. Margarita Aguilar Avellaneda**

**Con amor, profundo agradecimiento y comprensión.**

**A mi hermanita Francisca:**

**Quien me dejó una tarea difícil pero de mucho aprendizaje y crecimiento personal. Espero no haberte defraudado.**

**A mis hermanos:**

**Margarita, Norma, Nadia, Rosalba, Gina, Mireya, Diana, Ariadna y Francisco**

**A quienes estoy unida por el lazo maravilloso e indisoluble del amor fraterno.**

**A todos mis cuñados y sobrinos:**

**Por su cariño y ternura sinceros.**

**A la familia Valencia del Toro:**

**Con quien he compartido momentos inolvidables.**

**A mi esposo:**

**Gustavo**

**A quien admiro y amo profundamente  
Gracias por tu apoyo constante.**

**A mis hijos:**

**Amílcar Ulises y Mara Itzel**

**Quienes constituyen el regalo más bello de la vida  
Gracias por ser individuos virtuosos.**

**A Miguelito y a todos los Miguelitos del mundo:**

**Gracias por haber venido a este plano material a dejar  
tu mensaje de amor y piedad, despertando mi conciencia.**

**A todos mis alumnos:**

**Quienes me inspiran siempre para ser mejor ser humano.**

# Í N D I C E

<b>RESUMEN</b> .....	vii
<b>ABSTRACT</b> .....	viii
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>II. APRENDIZAJE Y MEMORIA</b> .....	4
II.1. Aprendizaje.....	4
II.1.1. Aprendizaje no asociativo.....	4
II.1.2. Aprendizaje asociativo.....	4
a) Condicionamiento clásico o pavloviano.....	5
b) Condicionamiento operante o instrumental.....	6
II.1.3. Reforzador positivo.....	7
II.1.4. Reforzador negativo.....	7
II.1.5. El paradigma de evitación o prevención.....	8
II.2. Memoria.....	10
II.2.1. Etapas, mecanismos o procesos de la memoria.....	10
II.2.2. Memoria sensorial.....	11
II.2.3. Memoria de corto plazo.....	11
II.2.4. Memoria de largo plazo.....	12
II.2.5. Consolidación de la memoria.....	13
II.2.6. La memoria no es unitaria.....	14
II.2.7. Relaciones entre los diferentes sistemas de memoria.....	17
<b>III. ANTECEDENTES</b> .....	20
III.1. Protección del sobrerreforzamiento contra la amnesia producida por tratamientos sistémicos.....	20
III.2. Protección del sobrerreforzamiento contra la amnesia producida por tratamientos intracerebrales.....	23
III.3. Espinas dendríticas y memoria.....	25
III.4. Formación hipocámpica.....	26
III.4.1. Ubicación y anatomía.....	26
III.4.2. Desarrollo sináptico.....	31
III.4.3. Conexiones.....	31
III.4.4. Circuito trisináptico.....	32
III.4.5. Función.....	32
III.4.6. El hipocampo y la memoria.....	33
III.5. Técnica de lesión en el estudio de los procesos mnemónicos.....	35
III.6. Inactivación reversible con tetrodotoxina (TTX).....	35
III.6.1. TTX y el bloqueo de canales de sodio dependientes de voltaje..	36
III.6.2. Estructura del canal de sodio.....	37
III.6.3. Sitios de unión de toxinas en el canal de sodio.....	40

III.6.4. Selectividad del canal por el ión sodio y la TTX.....	40
<b>IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>42</b>
<b>V. HIPÓTESIS.....</b>	<b>42</b>
<b>VI. OBJETIVOS.....</b>	<b>42</b>
VI.1. Objetivos generales.....	42
VI.2. Objetivos particulares.....	43
<b>VII. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>44</b>
VII.1. Animales.....	44
VII.2. Cirugía.....	44
VII.3. Manipulación.....	44
VII.4. Microinyección.....	45
VII.5. Aparatos.....	45
VII.6. Entrenamiento y pruebas de extinción.....	46
VII.7. Actividad motora horizontal.....	46
VII.8. Verificación de la ubicación de las cánulas.....	47
VII.9. Impregnación rápida de Golgi.....	47
VII.10. Análisis morfométrico.....	48
VII.11. Análisis estadístico.....	48
<b>VIII. RESULTADOS.....</b>	<b>50</b>
VIII.1. Verificación de la ubicación de las cánulas.....	50
VIII.2. Experimento 1. Definición de reforzamiento alto y bajo a través de las pruebas de extinción.....	52
VIII.3. Experimento 2. Efecto protector del sobrerreforzamiento.....	55
VIII.4. Experimento 3. Dependencia de estado.....	58
VIII.5. Experimento 4. Evaluación de las memorias de corto y largo plazo..	60
VIII.6. Experimento 5. Efecto de la TTX sobre la Actividad Motora horizontal y la habituación.....	62
VIII.7. Experimento 6. Número de espinas en las neuronas piramidales del área CA1 del hipocampo y su relación con la magnitud del choque eléctrico.....	65
<b>IX. DISCUSIÓN GENERAL.....</b>	<b>70</b>
<b>X. RESUMEN DE RESULTADOS.....</b>	<b>89</b>
<b>XI. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....</b>	<b>90</b>
<b>XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>92</b>
<b>XIII. ANEXOS.....</b>	<b>103</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Modelo de Atkinson y Shiffrin sobre el almacenamiento de la memoria.....	10
<b>Figura 2.</b>	Clasificación de sistemas de memoria de largo plazo en mamíferos.....	17
<b>Figura 3.</b>	Posición de la formación hipocámpica en el cerebro de rata.....	27
<b>Figura 4.</b>	Principales regiones citoarquitectónicas de la formación hipocámpica en el cerebro de rata.....	28
<b>Figura 5.</b>	Organización tridimensional de la formación hipocámpica.....	30
<b>Figura 6.</b>	Estructura química de la TTX.....	37
<b>Figura 7.</b>	Representación esquemática de la subunidad $\alpha$ del canal de $\text{Na}^+$ ...	39
<b>Figura 8.</b>	Micrografías de cortes coronales de cerebros de rata teñidos con la técnica de Nissl.....	50
<b>Figura 9.</b>	Representación de las regiones del hipocampo dorsal del cerebro de rata en las que se encontraron las puntas de los inyectores.....	51
<b>Figura 10.</b>	Extinción de la conducta de evitación inhibitoria entrenada con diferente intensidad de choque eléctrico.....	54
<b>Figura 11.</b>	Latencias de entrenamiento, escape y retención de una tarea de evitación inhibitoria de un ensayo entrenada con diferentes intensidades de choque eléctrico. Papel del sobrerreforzamiento...	56
<b>Figura 12.</b>	Mediana de las latencias de adquisición, escape y retención de una tarea de evitación inhibitoria en un estudio de aprendizaje ligado a estado.....	59
<b>Figura 13.</b>	Efecto de la administración de TTX pre-entrenamiento en la memoria de corto y largo plazo de una respuesta de evitación inhibitoria.....	61
<b>Figura 14.</b>	Efecto de TTX sobre la actividad motora de ratas y el aprendizaje de habituación.....	63
<b>Figura 15.</b>	Neurona piramidal de CA1 del hipocampo de rata y segmentos distal (D), medial (M) y proximal (P) de la dendrita apical.....	67
<b>Figura 16.</b>	Media de los valores de densidad de espinas en los segmentos proximal, medial y distal de las neuronas piramidales del CA1 del hipocampo de ratas entrenadas en evitación inhibitoria con diferente intensidad de choque eléctrico.....	68
<b>Figura 17.</b>	Porcentaje de cambio en la densidad de espinas en las neuronas piramidales del CA1 del hipocampo de ratas después de seis sesiones de extinción de la respuesta de evitación.....	69



## RESUMEN

Existe evidencia de que los tratamientos amnésicos que interfieren con la actividad de distintas regiones del cerebro, incluyendo al hipocampo, amígdala, cuerpo estriado y la sustancia nigra de sujetos entrenados en evitación inhibitoria, son menos eficaces o ineficaces cuando se administran a sujetos que han sido sometidos a sobreentrenamiento o a altas intensidades de choque eléctrico. Estos resultados se han interpretado en el sentido de que las regiones cerebrales inactivadas no son sitios críticos para los procesos de memoria inducidos por este tipo de entrenamiento. Debido a que en esos experimentos los tratamientos amnésicos se administraron después del entrenamiento, se ha propuesto que la amnesia se indujo porque el entrenamiento incrementado aceleró la consolidación de la memoria y en consecuencia, el efecto amnésico máximo del tratamiento ocurrió después de que la memoria del aprendizaje fue consolidada. Para investigar esta idea, en el presente estudio el hipocampo de ratas se inactivó inyectando bilateralmente tetrodotoxina (TTX) (10 ng/hemisferio) 30 minutos antes del entrenamiento de evitación inhibitoria entrenada con intensidades de choque relativamente baja (1.0 mA), media (2.0 mA) o alta (3.0 mA). La retención de la tarea se midió 48 h después del entrenamiento. Por otro lado, hay evidencias que muestran que el aprendizaje y la memoria de una variedad de tareas, incluyendo la de evitación inhibitoria, inducen el desarrollo de espinas dendríticas en el hipocampo; en este trabajo también se investigó si la extinción de una respuesta de evitación inhibitoria, que ha sido adquirida con niveles de choque bajo, medio y alto (aprendizaje incrementado), promueve espinogénesis en la región proximal, medial y distal de las neuronas piramidales del área CA1 del hipocampo. Los resultados indican que la TTX produjo un deterioro profundo o un deterioro leve en los grupos entrenados con 1.0 ó 2.0 mA respectivamente, y no hubo deterioro de la retención con el entrenamiento de 3.0 mA; estos datos confirman el efecto protector del sobreentrenamiento contra la amnesia inducida experimentalmente, y sugiere que esta protección no es debida a consolidación acelerada, sino más bien que el entrenamiento incrementado activa otros sistemas cerebrales distintos a los que típicamente están implicados en la mediación de la consolidación de la memoria. Además, el entrenamiento de evitación inhibitoria con intensidades de choque eléctrico relativamente bajas, indujo poda de las espinas dendríticas a lo largo de la longitud de las dendritas apicales de las neuronas de CA1 del hipocampo. Cuando los animales se entrenaron con una intensidad relativamente alta de choque se presentó una elevada resistencia a la extinción, y se observó poda en los segmentos proximal y medial de la dendrita apical, mientras que la cantidad de espinas en la dendrita distal permaneció normal. Estos resultados indican que la poda está implicada en la extinción de la conducta, mientras que el mantenimiento de las espinas es un probable mecanismo que media el efecto protector producido por el entrenamiento incrementado contra tratamientos amnésicos.

## ABSTRACT

There is extensive evidence that amnesic treatments are less effective, or ineffective when administered to subjects that have been overtrained or subjected to high foot-shock intensities in aversively-motivated learning. This protective effect has been found with a variety of learning tasks and with treatments that disrupt activity in several regions of the brain, including the hippocampus, amygdala, striatum, and substantia nigra. Such findings have been interpreted as suggesting that the brain regions disrupted are not critical sites for the memory processes induced by these types of training. In most experiments investigating this issue the amnesic treatments were administered after training. Thus, it might be less amnesia was induced because the training accelerated memory consolidation and, thus, the maximum effect of the amnesic treatment occurred after memory of the learning experience was consolidated. The present study investigated this issue by inactivating the hippocampus of rats bilaterally with tetrodotoxin (TTX) (10 ng/side) 30 min before one-trial inhibitory avoidance training using relatively low (1.0 mA), medium (2.0 mA), or high (3.0 mA) foot-shock intensities. Retention of the task was measured 48 h after training. TTX produced a profound retention deficit, a mild deficit, and no deficit at all in the 1.0, 2.0, and 3.0 mA groups, respectively. These data confirm the protective effect of training with relatively high foot-shock intensity against experimentally induced amnesia, and suggests that this protection is not due to accelerated consolidation. Rather, the findings suggest that strong training activates brain systems other than those typically involved in mediating memory consolidation. Numerous reports indicate that learning and memory of conditioned responses are accompanied by genesis of dendritic spines in the hippocampus, although there is a conspicuous lack of information regarding spine modifications after behavioral extinction. There is ample evidence that treatments that typically produce amnesia become innocuous when animals are submitted to a procedure of enhanced training. We now report that extinction of inhibitory avoidance, trained with relatively low foot-shock intensities, induces pruning of dendritic spines along the length of the apical dendrites of hippocampal CA1 neurons. When animals are trained with a relatively high foot-shock there is a high resistance to extinction, and pruning in the proximal and medial segments of the apical dendrite are seen, while spine count in the distal dendrite remains normal. These results indicate that pruning is involved in behavioral extinction, while maintenance of spines is a probable mechanism that mediates the protecting effect against amnesic treatments produced by enhanced training.

## I. INTRODUCCIÓN

El establecimiento de las bases neurobiológicas que sustentan a la memoria, facultad de retener y recordar experiencias pasadas o bien, la persistencia del aprendizaje en un estado que puede ser revelado más tarde (Bower y Hilgard, 1981; Squire, 1987), es motivo de estudio de muchos grupos de investigación.

En 1900 Müller y Pilzecker describieron experimentos tendientes a identificar las leyes que rigen la formación y evocación de la memoria y establecieron que la memoria es un proceso que requiere del paso del tiempo y que es muy frágil durante su formación. A este periodo de fragilidad le denominaron consolidación. En otras palabras, las memorias de largo plazo no se realizan de forma espontánea ellas se consolidan con el tiempo después del aprendizaje; por lo tanto, la consolidación se refiere a los procesos dependientes del tiempo por los cuales la información derivada de una experiencia de aprendizaje puede ser transferida desde un almacén de memoria a corto plazo, lábil a un almacén de memoria a largo plazo estable. La evidencia clínica y datos experimentales en animales han dado un fuerte apoyo a esta hipótesis, ya que constantemente se ha encontrado que la interferencia con la actividad cerebral poco después de una experiencia de aprendizaje produce incapacidad para recordar esa experiencia, pero aumentando el intervalo entre el aprendizaje y tal interferencia la memoria se consolida.

La mayor parte de la evidencia que apoya la teoría de la consolidación ha sido proporcionada por experimentos en los que los sujetos son entrenados para realizar una tarea después de un número relativamente pequeño de ensayos o sesiones de entrenamiento, o están sometidos a niveles relativamente bajos de estimulación aversiva. Aunque las influencias amnésicas rara vez se han estudiado en experimentos con entrenamiento intensivo, los hallazgos disponibles han indicado reiteradamente que los tratamientos amnésicos llegan a ser ineficaces o menos eficaces cuando los animales están entrenados extensamente (sobrentrenamiento) o se les dieron relativamente altas intensidades de choque eléctrico (sobrerreforzamiento) durante el entrenamiento (Prado-Alcalá et al., 2012). Este efecto se ha observado tras la administración sistémica de los tratamientos

amnésicos (Durán-Arévalo et al., 1990; Cruz -Morales et al., 1992; Solana-Figueroa et al., 2002; Díaz-Trujillo et al., 2009), así como tratamientos localizados que afectan el cuerpo estriado (STR), la amígdala (AMY), sustancia negra (SN) y el hipocampo, entre otras estructuras cerebrales (Thatcher y Kimble, 1966; Prado-Alcalá y Cobos-Zapiain, 1977, 1979; Prado-Alcalá et al., 1980; Parent et al., 1992, 1994; Cobos-Zapiaín et al., 1996; Lázaro-Muñoz et al., 2010). Estos encuentros se han interpretado como sugerentes de que las estructuras afectadas no son sitios críticos para los cambios que median asociaciones basadas en el sobreentrenamiento o fuerte estimulación aversiva (sobrerreforzamiento), lo que implica que otras regiones del cerebro favorecen o apoyan el procesamiento de la memoria.

Otras investigaciones han demostrado que incrementando la magnitud de la estimulación aversiva utilizada durante el entrenamiento de evitación inhibitoria (IA) se atenúa el efecto amnésico producido usualmente por la inactivación del hipocampo post-entrenamiento (Quiroz et al., 2003), lo que sugiere que el funcionamiento del hipocampo no es esencial para la consolidación de información de gran intensidad emocional. El reclutamiento de otros sistemas cerebrales parece permitir el almacenamiento de dicha información (Ambrogio Lorenzini et al., 1999).

Considerando que en los protocolos anteriores los tratamientos amnésicos intracerebrales se han aplicado después del entrenamiento, se ha hecho otra propuesta para explicar el efecto protector del incremento en la magnitud del reforzador: la información se almacena a pesar del tratamiento amnésico, porque el choque eléctrico de mayor intensidad aplicado durante el entrenamiento (sobreentrenamiento) induce la aceleración del proceso de consolidación de la memoria, que se llevaría a cabo en el corto intervalo que hay entre el entrenamiento y la aplicación del tratamiento amnésico (Parent y McGaugh, 1994). Recientemente, se encontró que los efectos amnésicos típicos de cicloheximida, un inhibidor de la síntesis de proteínas, fueron prevenidos por el entrenamiento incrementado de evitación inhibitoria (Díaz-Trujillo et al., 2009). A pesar de esta evidencia, los mecanismos neurobiológicos del efecto protector de la mejora del aprendizaje frente a los tratamientos amnésicos siguen siendo completamente desconocidos.

Un cambio estructural neuronal que ha sido propuesto como un sustrato de memoria a largo plazo está relacionado con los cambios en la densidad de las espinas dendríticas (Horner, 1993; O'Malley et al., 2000; Leuner et al., 2003).

También hay un creciente cuerpo de evidencia que sugiere fuertemente que la adquisición de nueva información induce el desarrollo de las espinas dendríticas en el hipocampo en una variedad de tareas de aprendizaje (Mahajan y Desiraju, 1988; Horner, 1993; Moser et al., 1994; Rusakov et al., 1997; O'Malley et al., 2000; Leuner et al., 2003; Restivo et al., 2009), incluyendo la tarea de IA utilizada en el presente estudio (O'Malley et al., 1998). Sin embargo, hay una evidente falta de información con respecto a la formación de espinas en condiciones de aprendizaje incrementado.

Por tal motivo en esta tesis se pretende 1) investigar si el choque eléctrico de mayor intensidad aplicado durante el entrenamiento (sobrerreforzamiento) de evitación inhibitoria induce la aceleración del proceso de consolidación de la memoria y 2) investigar si la extinción de una respuesta de evitación inhibitoria que ha sido adquirida con niveles bajo, medio y alto (aprendizaje incrementado) de choque eléctrico promueve espinogénesis en las neuronas piramidales del CA1 del hipocampo.

## II. APRENDIZAJE Y MEMORIA

### II.1. Aprendizaje

La mayoría de los individuos del reino animal cuenta con un importante avance evolutivo que les ha ayudado a adaptarse mejor a su medio: el *aprendizaje*.

Los animales filogenéticamente menos desarrollados poseen un repertorio conductual limitado y responden reflejamente ante los cambios de la estimulación circundante. Aquellos que han logrado un mayor avance evolutivo cuentan, además, con respuestas instintivas más complejas que las reflejas; pero aun así, sus patrones de respuesta son restringidos y difícilmente pueden ser modificados. Los organismos cuyo sistema nervioso es más complejo, son capaces de modificar sus reacciones de un momento a otro en una situación determinada, dependiendo del resultado de sus experiencias en la misma situación o ante circunstancias similares (Prado-Alcalá, 1991).

Las diversas definiciones de *aprendizaje* coinciden en que este proceso es un cambio, relativamente permanente, en la conducta de un sujeto, que resulta de la experiencia. Al limitar el aprendizaje a cambios relativamente permanentes, se excluyen modificaciones de la conducta debidas a factores de motivación, a la adaptación sensorial o a la fatiga. Al señalar que la práctica, el entrenamiento o la experiencia son las condiciones esenciales del aprendizaje, se excluyen cambios de la conducta que son resultado de la maduración, la senectud o de variables fisiológicas (Bower y Hilgard, 2011).

#### II.1.1. Aprendizaje no asociativo

La forma más simple de aprendizaje es el *no asociativo*, este se caracteriza porque para presentarse no es necesario que se establezca una asociación entre un estímulo y una respuesta, o entre dos estímulos; a este tipo de aprendizaje corresponden la habituación y la sensibilización.

#### II.1.2. Aprendizaje asociativo

El aprendizaje *asociativo* implica el establecimiento de una asociación entre un estímulo y una respuesta, o entre dos estímulos. Los principales tipos de

aprendizaje asociativo son el condicionamiento clásico y el condicionamiento operante o instrumental.

### **a) Condicionamiento Clásico o Pavloviano**

También llamado reflejo condicionado Tipo I o condicionamiento respondiente. Este tipo de aprendizaje se establece apareando (asociando) un estímulo neutro que no produce respuestas reflejas específicas con un estímulo incondicionado que puede producir una respuesta refleja específica. Después de cierto número de asociaciones el estímulo antes neutro, es capaz de producir por sí solo, la respuesta refleja. Después de que el estímulo ha adquirido el poder para evocar la respuesta, recibe el nombre de estímulo condicionado y la respuesta evocada por este estímulo recibe el nombre de respuesta condicionada. En sus experimentos clásicos, Pavlov estudió en perros la salivación inducida por la presentación de estímulos incondicionados como comida. Una campana se tocaba justamente antes de la presentación del estímulo incondicionado y esto se repetía cierto número de veces hasta que el animal producía saliva cuando se tocaba la campana aunque no se colocara carne en la boca. En este experimento, la carne que se colocaba en la boca era el estímulo incondicionado (**EI**), el estímulo que normalmente produce una respuesta incondicionada particular. El estímulo condicionado (**EC**), era el toque de la campana. Después de que el **EC** y el **EI** habían sido apareados el número suficiente de veces, el **EC** producía la respuesta originalmente evocada sólo por el **EI**.

Si el **EC** se presenta repetidas veces sin el **EI**, llega un momento en que el reflejo condicionado desaparece, esto se llama extinción o inhibición interna. Sin embargo, si el reflejo condicionado es reforzado de tiempo en tiempo, apareando de nuevo el **EC** y el **EI**, la respuesta condicionada persiste indefinidamente (Klein, 2012; Pavlov, 1927). En el condicionamiento clásico, el **EC** y el **EI** ocurren dentro de una secuencia regular, sin importar lo que el organismo esté haciendo. La relación temporal precisa entre el **EC** y el **EI** puede variar. Esa relación temporal diferente entre el **EC** y el **EI** ha permitido que el condicionamiento clásico sea clasificado en cinco procedimientos diferentes: a) condicionamiento simultáneo, b) demorado, c)

huella, d) hacia atrás e) temporal. Durante el desarrollo del condicionamiento clásico, pueden estudiarse varias etapas; adquisición, mantenimiento, generalización y discriminación de estímulos, extinción y recuperación espontánea (Reynolds, 1973).

### ***b) Condicionamiento Operante o Instrumental***

Otro tipo de aprendizaje asociativo es el condicionamiento operante (también llamado instrumental o aprendizaje por ensayo y error o condicionamiento Tipo II). Los procedimientos de este tipo de entrenamiento derivan de la obra de Bechterev y Thorndike y se caracterizan porque **la conducta del sujeto es el instrumento para la producción de recompensa o para evitar un estímulo aversivo.**

En contraste con el condicionamiento clásico, en el que un estímulo determinado (**EI**) provoca una respuesta específica (**RI**), en el aprendizaje instrumental u operante, los organismos pueden estar emitiendo, espontáneamente un número determinado de respuestas que forman parte de su repertorio (operantes); conductas que al alterar el ambiente ocasionan consecuencias sobre el sujeto, de esta manera se llega a modificar la conducta del organismo. Si una de esas respuestas es seguida por algún evento o estímulo favorable para el organismo, entonces esa conducta tenderá a repetirse, por lo tanto, la frecuencia de la conducta operante básicamente está determinada por el efecto que produce el evento ambiental que va después de ella. Es evidente que en el condicionamiento operante, el experimentador tiene que esperar que la respuesta ocurra naturalmente antes de que pueda aumentar su probabilidad de ocurrencia por medio de una recompensa.

Las distinciones entre una gran variedad de procedimientos de condicionamiento instrumental, se basan fundamentalmente en la distinción efectuada por Thorndike entre satisfactores y perturbadores, que en términos contemporáneos corresponden a reforzadores positivos o negativos. Entendiendo “por estado satisfactorio [reforzador positivo] aquel que el animal no trata de evitar, y que a menudo trata de obtener y preservar”. “Por estado de cosas molesto o perturbador designamos aquel que comúnmente el animal evita y abandona [reforzador negativo]” (Thorndike, 1911 en Klein 2012).



El condicionamiento instrumental también es referido como condicionamiento operante. Este término fue introducido por Skinner quien también desarrolló el aparato de entrenamiento conocido como caja de Skinner, en la cual los animales recibían una pequeña recompensa o reforzador, por presionar una palanca (Skinner, 1938 en McGaugh, 1973). Esta técnica permitió estudiar los efectos de varias recompensas y otras influencias sobre la tasa de respuesta y ha proporcionado un medio para investigar cosas tales como procesos sensoriales en animales. Por ejemplo, un animal puede ser enseñado a presionar una palanca sólo en la presencia de un estímulo particular, y por una variación de la intensidad del estímulo, su umbral sensorial para ese estímulo se puede medir. Estudios de condicionamiento instrumental u operante, también han revelado una serie de fenómenos interesantes que no se observan en el condicionamiento clásico. Por ejemplo, los patrones de respuesta están influidos por la frecuencia y el patrón de recompensas. Las recompensas se pueden dar después de cada respuesta, o se les puede dar forma intermitente, es decir, después de un número fijo o aleatorio de respuestas o bien después de un intervalo fijo o aleatorio de respuestas (McGaugh, 1973).

A los efectos, estímulos o consecuencias que siguen a la respuesta o conducta se les llama reforzadores. Un reforzador es cualquier estímulo o evento que incrementa la probabilidad de que una conducta se repita (Skinner, 1953 en Bower y Hilgard, 2011) y como se indicó en el párrafo anterior, estos pueden ser positivos o negativos.

### **II.1.3. Reforzador positivo**

Si la aparición de un estímulo como consecuencia de una respuesta incrementa la probabilidad de que la respuesta ocurra en el futuro, el estímulo recibe el nombre de ***estímulo reforzante positivo o reforzador positivo***.

### **II.1.4. Reforzador negativo**

Si la desaparición de un estímulo aversivo como consecuencia de una respuesta ocasiona que la respuesta ocurra en el futuro con una mayor probabilidad, el estímulo recibe el nombre de ***estímulo aversivo o reforzador negativo***. El reforzamiento negativo implica la eliminación de un estímulo aversivo.

El **escape** y la **evitación** son los dos paradigmas en que los estímulos aversivos incrementan o mantienen la acción de responder. En la evitación, una respuesta le permite al organismo posponer o evitar el comienzo de un estímulo aversivo, mientras que en el escape, la respuesta da término a un estímulo aversivo después de que se ha iniciado su presentación; el organismo no puede evitar la aparición del estímulo aversivo (Reynolds, 1973).

### **II.1.5. El paradigma de evitación o prevención**

Ya se indicó que en la evitación una respuesta le permite al sujeto evitar o posponer el comienzo de un estímulo aversivo. El procedimiento de evitación presenta dos variantes: el entrenamiento de evitación activa, y el de evitación pasiva.

En el procedimiento de **evitación activa** el sujeto termina con un estímulo aversivo cuando emite una respuesta operante explícita, como presionar una palanca o evitar un lugar particular en el espacio experimental. Las pruebas de evitación activa pueden ser de dos sentidos y un sentido. En la evitación activa de un sentido el animal se coloca en un lado de la caja (castigo) y después de una demora de 10 segundos recibe un choque eléctrico en las patas, el choque puede ser evitado por el desplazamiento del animal de un lado a otro (seguro) de la caja. Posteriormente el animal es removido del lado seguro de la caja y después de un intervalo inter-ensayo se coloca de nuevo en el lado de castigo y se le da un choque eléctrico al final del período de demora; la latencia para realizar la respuesta de desplazamiento al lado seguro se considera como índice de aprendizaje. En la evitación activa de dos sentidos, el animal no es removido del lugar seguro durante el primer ensayo, en lugar de esto, transcurrido el período de demora se presenta un tono (señal) indicando que el choque ocurrirá en este compartimento, obligando al sujeto a desplazarse al lado contrario de la caja (Beninger, 1989). Las respuestas que pueden ser medidas con el procedimiento de evitación activa en un sentido son la latencia de escape, el número de evitaciones, etc.; en el procedimiento de evitación activa en dos sentidos las respuestas a determinar son la respuesta de evitación condicionada, el número de escapes, la latencia de evitación etc.

En el procedimiento de **evitación pasiva o inhibitoria**, generalmente se han utilizado dos tipos: la latencia de bajada (Step-down) y el pasar al otro lado (Step-through); esta última, fue desarrollada por Jarvick y Koop (1967). Se sabe que los roedores evitan la luz intensa, por lo que cuando se les coloca en un compartimiento iluminado comunicado con uno oscuro, prefieren permanecer en el lugar más oscuro. El procedimiento consta de dos sesiones: durante la primera, también llamada de **entrenamiento** el animal se coloca en el compartimiento bien iluminado (lugar seguro de la cámara); poco tiempo después se abre una compuerta y se le permite la entrada al compartimiento oscuro y cerrando la puerta se le administrará un choque eléctrico. Se esperaría que durante esa sesión de entrenamiento el animal asocie el compartimiento oscuro con el choque; de tal manera que al colocarlo nuevamente en el compartimiento seguro de la cámara durante la sesión de **prueba**, el animal evite recibir el choque, inhibiendo la respuesta de entrada al compartimiento oscuro. La medida de retención usada en esta tarea es la latencia de la respuesta de entrada al compartimiento en donde el animal recibió el choque. Las latencias de retención cortas son consideradas como evidencia de amnesia, y las latencias de retención largas como evidencia de retención y aprendizaje. Este procedimiento de Step-through presenta dos variantes: **la evitación pasiva de un ensayo y la evitación pasiva de ensayo múltiple**. La **evitación pasiva de un ensayo** permitirá el registro de respuestas como la latencia de retención; en la **evitación pasiva en ensayo múltiple** se pueden medir además de las latencias, el número de ensayos requeridos para alcanzar el criterio de aprendizaje arbitrariamente elegido, el número de aciertos y errores.

Puede precisarse que **la respuesta de evitación** constituye tanto un **condicionamiento clásico como instrumental**, ya que para que el animal evite es necesario que asocie primero el **EC** (una luz) con el **EI** (choque eléctrico) y luego asocie la respuesta efectiva (**R**) cruzar al otro lado, con el reforzador negativo (terminación del choque eléctrico). En cambio, **la respuesta de escape** es **sólo instrumental**, pues el sujeto aquí sólo necesita asociar la respuesta efectiva (**R**) con el reforzador negativo (**EI**) (Klein, 2012).

## II.2. La Memoria

Para que un sujeto aprenda, se requiere que las experiencias del pasado se almacenen de alguna forma, de manera que cuando se encuentren otra vez los mismos estímulos, la reacción a éstos está determinada por lo que sucedió antes; a esta capacidad de recordar se le ha llamado memoria. Los estudios sobre aprendizaje hacen énfasis en la adquisición de conocimiento y desarrollo de nuevas conductas, y los de memoria subrayan el papel de la retención o recuerdo de las conductas y otros eventos. La memoria se refiere a la persistencia del aprendizaje en un estado que puede ser revelado un tiempo después (Squire, 1987); la memoria es la prueba de haber aprendido, es el conocimiento de una experiencia pasada.

### II.2.1. Etapas, mecanismos o procesos de la memoria

La memoria ha sido considerada como un proceso que implica las siguientes etapas: registro o codificación, que corresponde a la entrada de la información que es recibida por el sistema nervioso central; consolidación o almacenamiento de la información; y evocación, recuperación o decodificación de la información (Baddeley, 1997).

Atkinson & Shiffrin (1971) sugirieron que hay tres etapas en el almacenamiento de la información o almacén de memoria: registro sensorial o memoria sensorial, memoria a corto plazo y memoria a largo plazo (Figura 1).

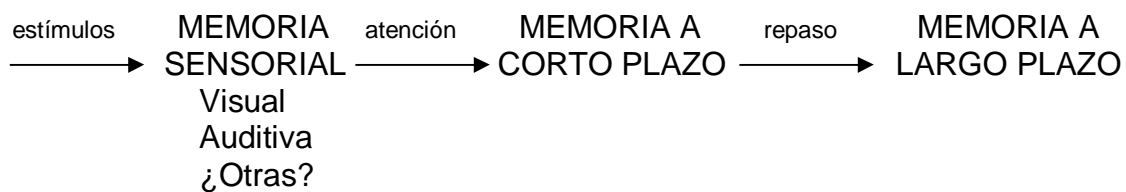


Figura 1. Diagrama simplificado que ilustra el modelo de Atkinson y Shiffrin (1971) sobre el almacenamiento de la memoria en tres etapas. La interpretación y organización de las experiencias se lleva a cabo durante la segunda etapa, o memoria de corto plazo. La etapa final, o memoria de largo plazo, constituye el lugar de almacenamiento permanente o casi permanente en la memoria.

### **II.2.2. Memoria sensorial**

La investigación sobre las características del almacén sensorial ha analizado dos sistemas sensoriales: el sistema visual y el sistema auditivo. La copia visual que contiene el registro sensorial se denomina *ícono* y se almacena en la **memoria icónica**. La **memoria ecoica** contiene una réplica de una experiencia auditiva, y el eco se almacena en el registro sensorial.

La investigación clásica de Sperling (1963) examinando el almacenamiento de información visual en el registro sensorial mostró que: 1) un ícono es una copia exacta de una experiencia visual, y 2) la memoria icónica dura sólo un breve período de tiempo tras el evento. El trabajo de Sperling sugiere que las imágenes visuales se almacenan en el registro sensorial durante 0.25 segundos. Sin embargo dependiendo de las condiciones, los íconos pueden permanecer hasta 1 segundo o menos de 0.25 segundos. La intensidad de los acontecimientos visuales parece influir en la duración de un ícono.

En el registro sensorial se puede almacenar también un duplicado exacto de una experiencia auditiva. Neisser (1967 en Klein, 2012) denominó memoria ecoica, o eco de un evento reciente, al recuerdo de una experiencia auditiva almacenado en el registro sensorial. Aunque podría pensarse que un eco tiene la misma duración que un ícono, se sugiere que la duración usual de un eco es de dos segundos.

Los términos icónica o ecoica representan mecanismos de almacenamiento preliminar y transitorio de información. Este tipo de memoria también se conoce con el nombre de memoria inmediata y engloba los recuerdos que duran segundos, sólo mientras la persona continúa pensando en ellos.

### **II.2.3. Memoria de Corto Plazo**

La información almacenada en el registro sensorial es transferida a la memoria a corto plazo, donde se retiene durante un breve período de tiempo antes de ser almacenada permanentemente (o casi permanentemente) en la memoria a largo plazo. La duración de un recuerdo en la memoria a corto plazo normalmente es de unos 15 a 20 segundos. El tiempo de permanencia depende de dos procesos: primero del repaso; sin el repaso la información puede desaparecer de la memoria a

corto plazo antes de que sea almacenada en una forma significativa ya que el repaso también permite organizar la información; segundo, del desplazamiento de información anterior cuando entra nueva información, puesto que sólo se puede retener una cantidad limitada de información en la memoria a corto plazo. La memoria de corto plazo se refiere a un sistema que retiene información de manera temporal en un estado especial mientras llega a ser incorporada o transferida, dentro del almacén de memoria de largo plazo más estable y potencialmente permanente (Squire, 1987).

#### **II.2.4. Memoria de Largo Plazo**

Es un sistema de memoria más estable y potencialmente permanente; el almacenamiento de la información perdura por días, meses o incluso años; parece tener una capacidad ilimitada de almacenamiento de información (Squire, 1987). Por lo general, se considera que la memoria a largo plazo es el resultado de cambios estructurales reales en las sinapsis que aumentan o suprimen la conducción de señales. Dos procesos pueden dificultar la recuperación de la información de la memoria a largo plazo, la *interferencia* de otros recuerdos o bien la ausencia de un estímulo específico (*atributos de la memoria*) para recordar un evento dado.

Dentro de la memoria de largo plazo son consideradas dos distinciones: **memoria declarativa** (memoria para hechos y episodios) y **memoria procedimental** (memoria para habilidades y otras operaciones cognoscitivas). La **memoria procedimental** es la memoria sobre habilidades o destrezas, estas memorias no son accesibles al conocimiento consciente; una prueba de una memoria procedimental sólo puede obtenerse a través de la observación de la ejecución. Esta memoria representa conocimiento de cómo hacer las cosas, que son almacenadas como resultado de las experiencias de condicionamiento instrumental. Las memorias procedimentales pueden representar también reacciones emocionales ante eventos ambientales, como miedo al atravesar un puente elevado. Estas reacciones emocionales se almacenan como resultado del condicionamiento pavloviano. Las memorias procedimentales se adquieren lentamente a través de la experiencia

repetida. Aquí también quedan comprendidas la habituación y la sensibilización (Squire y Kandel, 1999).

La memoria declarativa o explícita se caracteriza como capacidad para adquirir, retener y recuperar, consciente e intencionadamente acontecimientos, hechos números, eventos, palabras, rostros y los conocimientos adquiridos durante nuestra experiencia de vida; una memoria declarativa puede existir en la forma de un pensamiento verbal o de una imagen no verbal. La memoria declarativa puede formarse en una única experiencia, aunque la práctica puede aumentar la capacidad para recordar una memoria declarativa (Squire, 1987; Squire y Kandel, 1999).

Dentro de la **memoria declarativa** se hace una subdivisión: memoria **episódica** y memoria **semántica** (Tulvin, 1972; Schacter y Tulvin, 1994). La memoria episódica se refiere a la memoria para eventos pasados o acontecimientos específicos en la vida del individuo (autobiografía), consta de información sobre acontecimientos relacionados temporalmente, mientras que la memoria semántica contiene el conocimiento necesario para la utilización del lenguaje. La memoria episódica puede ser sobre un evento experimentado en un momento y lugar determinados y la memoria semántica incluye información sobre las palabras y otros símbolos, sus significados y referentes, las relaciones entre las palabras y los símbolos, y las reglas, fórmulas o algoritmos para la adquisición de conceptos y resolución de problemas.

La información que contiene la memoria episódica está organizada temporalmente; es decir, un evento precede, se produce al mismo tiempo o sigue a otro evento. Por el contrario, el conocimiento en la memoria semántica está organizado conceptualmente. La fuente de memoria episódica es la estimulación sensorial; la comprensión del conocimiento cultural constituye la fuente de la memoria semántica (Squire, 1987; Tulvin, 1972).

#### **II.2.5. Consolidación de la memoria**

La consolidación es el proceso relativo a la transición de un sistema de almacenamiento de información lábil y de vida corta a un sistema viable de almacenamiento a largo plazo. El desarrollo de la memoria a largo plazo parece

ocurrir sobre períodos de tiempo y puede involucrar eventos bioquímicos que alteran la conectividad sináptica de un modo estable, o cambios morfológicos en la topografía de la conectividad sináptica (Squire y Davis, 1981).

El concepto de consolidación de la memoria fue establecido por Müller y Pilzecker quienes propusieron que el aprendizaje no induce instantáneamente, memorias permanentes sino que la memoria toma tiempo para ser fijada o consolidada). Consecuentemente la memoria permanece vulnerable a la interrupción por un periodo de tiempo después del aprendizaje (Lechner et al., 1999).

La evidencia esencial para la teoría de la consolidación de la memoria, procede de estudios donde se altera la actividad cerebral por medio de electrochoques convulsivos o por la administración de convulsivantes poco después de una experiencia. Igualmente una conmoción cerebral, la aplicación de anestesia general profunda o cualquier otro efecto que bloquee la actividad puede *impedir la consolidación* de modo que en una prueba posterior no se demostraría retención alguna; el escaso recuerdo producido tras el tratamiento se denomina **amnesia retrógrada** (Bower y Hilgard, 2011; Klein, 2012).

La hipótesis de la consolidación de la memoria propuesta hace más de un siglo por Müller y Pilzecker fue el punto de partida y sigue guiando a la investigación estimulado estudios que revelan las influencia hormonal y neuronal que regula la consolidación de la memoria (McGaugh, 2000); así como el descubrimiento de eventos moleculares y celulares (Kandel, 2001) y los procesos que ocurren a nivel de sistemas cerebrales y las interacciones entre ellos durante la formación de la memoria (Lechner et al., 1999; Nadel y Bohbot, 2001).

### **II.2.6. La memoria no es unitaria**

La idea de que la memoria está compuesta de distintos sistemas tiene una larga historia. William James en su obra Principios de Psicología (1890) escribió capítulos separados sobre memoria primaria y memoria secundaria. Otros antecedentes son el de McDougall (1923) quien distinguió entre reconocimiento explícito e implícito, y Tolman (1948) quien propuso que hay más de una clase de aprendizaje. En 1969 Bruner contrastó entre memoria sin registro y memoria con



registro. Y en la década de 1970 se hizo una distinción entre conocimiento declarativo y de procedimiento (Winograd, 1975). Pero **la evidencia experimental para disociar tipos diferentes de memoria proviene del paciente H. M.**, quien después de haberse sometido a una cirugía (extirpación bilateral de los lóbulos temporales) mostró severo deterioro en la memoria. H. M. presentó incapacidad para aprender nuevos hechos o eventos, pero no hubo evidencia de pérdida de su capacidad intelectual y mantuvo intacto tanto su lenguaje y sus habilidades perceptomotoras, así como su memoria remota. De este conjunto de datos se concluyó que las estructuras en el lóbulo temporal medial, muy probablemente el hipocampo (HC), estuviera implicado en procesos de memoria complejos, y que estructuras independientes anatómica y funcionalmente del lóbulo temporal medial mediaban otras funciones de aprendizaje y memoria (Scoville y Milner, 1957). Esto permitió colocar a la información perdida por la amnesia, en el rubro de conocimiento declarativo y a esas habilidades de H. M. que no fueron deteriorados por la amnesia en una forma de memoria llamada de procedimiento.

El trabajo subsiguiente con pacientes amnésicos y evidencias de estudios con animales experimentales permitió ir más allá de las habilidades motoras detectando que otros tipos de aprendizaje tampoco se deterioran con lesiones del HC, tal es el caso de las habilidades perceptuales (lectura a través del espejo; el condicionamiento clásico de reflejos (reflejo palpebral); el priming (perceptual y conceptual), el aprendizaje de gramática artificial y el de categorías. Toda esta gama de aprendizajes abre el abanico de lo denominado memoria de procedimiento. Hallazgos que también determinaron un cambio conceptual a partir de la dicotomía de conocimiento declarativo y conocimiento de procedimiento (Cohen y Squire, 1980) o memoria explícita-memoria implícita (Graf y Schacter, 1985) fueron los siguientes: a) el cerebelo es esencial para el reflejo condicionado palpebral, aprendizaje preservado tanto en animales con lesión hipocámpica (Schmaltz y Theios (1972) como en pacientes severamente amnésicos (Clark y Squire, 1998); b) el estriado (STR) se identificó como una estructura importante para el aprendizaje que da como resultado memoria de hábito (Mishkin et al., 1984) y en un experimento de disociación, en ratas después de lesiones en el fórnix y el STR se demostró el papel

de estas regiones para afectar la memoria declarativa y de hábito, respectivamente (Packard, Hirsh y White, 1989); c) otros tipos de aprendizaje, como el miedo condicionado o el condicionamiento de preferencia de lugar, los cuales adjudican carga positiva o negativa a un estímulo, implican la participación de la amígdala (AMY) (Davis, 1992; Fanselow, 1994; LeDoux, 1992; McDonald y White, 1993). Dada la amplia variedad de tareas de aprendizaje y memoria explorados en estos estudios, y el número de diferentes estructuras que fueron implicadas, la perspectiva cambió al principio de la década de 1980 para dar paso a un armazón que acomodara sistemas múltiples de memoria. En ese tiempo, el término no declarativa fue introducido con la idea de que la memoria declarativa se refería a un sistema de memoria y que la “memoria no-declarativa” es un término que hacía referencia a los varios sistemas de memoria adicionales (Squire y Zola-Morgan, 1988).

La Figura 2 ilustra una clasificación que incorpora estas ideas. La memoria declarativa se refiere a la capacidad de recordar conscientemente hechos y eventos, y es la clase de memoria que es deteriorada en la amnesia y depende de estructuras en el lóbulo medial temporal. Las formas de memoria no declarativas se refieren a habilidades y destrezas, no son accesibles al conocimiento consciente, una prueba de esta memoria sólo se obtiene observando la ejecución, es decir, son reveladas a través de la reactivación de los sistemas dentro de los cuales el aprendizaje ocurrió originalmente.

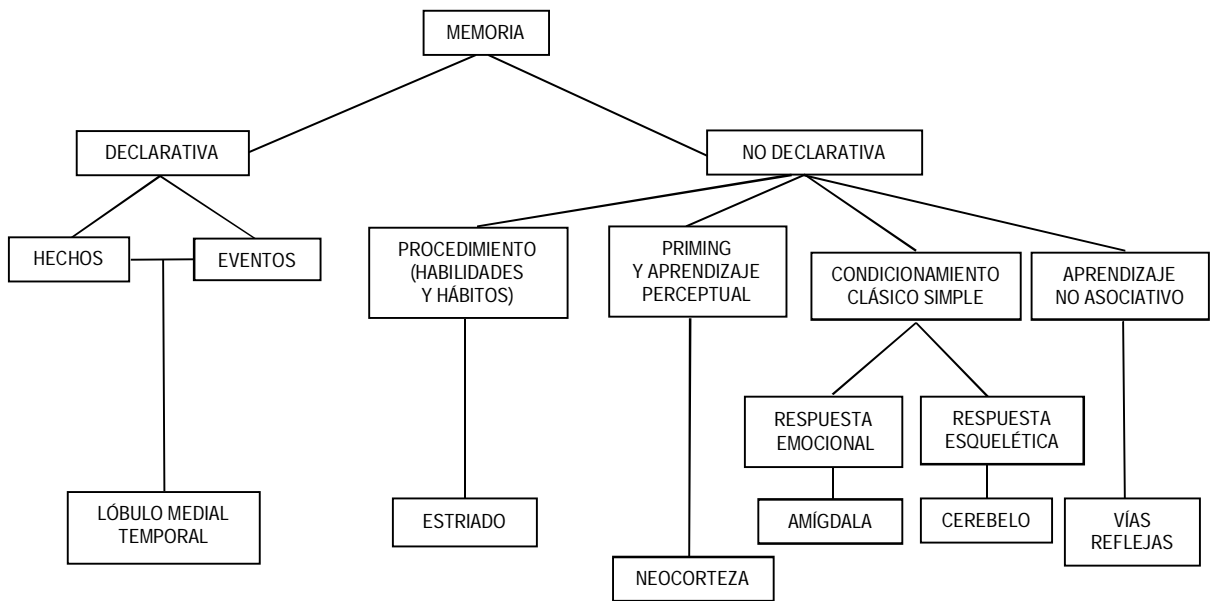


Figura 2. Una clasificación de sistemas de memoria de largo plazo en mamíferos. En el esquema se indican las estructuras cerebrales que se ha considerado que son especialmente importantes para cada forma de memoria declarativa y no declarativa (Tomado de Squire, 2004).

### II.2.7. Relaciones entre los diversos sistemas de memoria

Es evidente que los sistemas múltiples de memoria deben interactuar cuando el cerebro está intacto y cuando el animal es sometido a un paradigma determinado. Las interacciones entre los sistemas de memoria pueden ser caracterizadas como competitivas o cooperativas. Un conjunto de hallazgos congruentes con el punto de vista de que los sistemas de memoria pueden competir es que la interrupción o bloqueo de las funciones de una estructura puede facilitar la adquisición de algunas tareas conductuales, por ejemplo, lesiones del HC y del STR en una tarea de laberinto en cruz deterioran el aprendizaje de lugar (dependiente del HC) y aprendizaje de respuesta (dependiente del STR), respectivamente (Packard y McGaugh, 1996); en una tarea de laberinto acuático, la lesión de fimbria/fórnix deterioró el aprendizaje espacial pero no el aprendizaje de respuesta a señales locales estímulo-respuesta (Devan y White, 1999).

Además de los ejemplos de competencia entre los sistemas de memoria hay algunos ejemplos en los cuales sistemas neurales separados parecen trabajar cooperativamente para formar nuevas memorias. Uno de ellos es el reportado por Packard, Cahill y McGaugh (1994), quienes empleando una tarea de laberinto acuático de Morris encontraron que la administración directa de anfetamina dentro de la AMY inmediatamente después del entrenamiento, facilita la retención tanto de una tarea dependiente del HC como una tarea dependiente del STR, mientras que inyecciones de lidocaína intra-amígdala justo antes de la prueba de retención no deterioraron la ejecución de ninguna de las tareas. Estos experimentos indican que el procesamiento de estas formas de memoria no depende de la AMY, pero la activación de la AMY puede contribuir a la formación de la memoria que es mediada por otros sistemas.

En otro experimento, Devan y White (1999), usando el laberinto acuático de Morris (en sus versiones de plataforma visible y oculta), evidencian una interacción competitiva entre las subregiones medial y lateral del STR, fimbria/fornix y STR lateral; mientras que el sistema hipocámpico puede interactuar cooperativamente con el STR medial. Las diferencias anatómicas del STR lateral y medial pueden dar cuenta de estos resultados. El STR lateral recibe proyecciones que descienden primariamente desde la neocorteza sensomotora (McGeorge y Faull, 1989) y ascendentes dopaminérgicos proviniendo desde la sustancia nigra (SN) pars compacta (Heimer et al., 1995). Estos patrones de conectividad combinados con los resultados de diferentes estudios implicando lesiones y manipulaciones post-entrenamiento de las funciones de consolidación de la memoria (Packard y White, 1991; White y Viaud, 1991; McDonald y White, 1994; Packard y McGaugh 1996) sugieren que esta subregión estriatal puede especializarse en la formación de hábito estímulo-respuesta. Por otro lado, el STR medial recibe entradas desde diferentes áreas mesocorticales y allocorticales, incluyendo la formación hipocámpica, lo que sugiere que el STR medial puede contribuir al control de la conducta con base cognitivo-espacial de otras estructuras aferentes a él. Debido a que en este experimento las lesiones asimétricas no afectan conexiones directas interhemisféricas a través de las comisuras, es probable que los efectos de la lesión

resulten específicamente de la desconexión de vías ipsilaterales, esto es, proyecciones eferentes hipocámpicas al STR medial sobre el lado del HC lesionado, y aferentes hipocámpicas y eferentes STR mediales sobre el lado del STR medial lesionado.

Lo descrito, son algunas de las evidencias experimentales que contribuyeron al planteamiento de la teoría de sistemas múltiples de memoria, así como a desentrañar algunas de las posibles interacciones entre ellos durante el procesamiento de información.

En nuestro laboratorio, una serie de resultados ha venido aportando evidencia que apoya la propuesta del procesamiento de información por la participación de sistemas múltiples. Se ha demostrado que varios de los tratamientos que típicamente producen amnesia, se tornan totalmente inefectivos (es decir, ya no dañan la memoria) cuando los sujetos experimentales son sometidos a la tarea de evitación inhibitoria, e incluso a otras tareas, en condiciones de entrenamiento incrementado (sobrerreforzamiento y sobre-entrenamiento). Este efecto protector de las altas intensidades de choque se ha interpretado en el sentido de que las estructuras cerebrales implicadas cambian su conectividad, pasando de una configuración de circuito en serie a la de un circuito conectado funcionalmente en paralelo (Prado-Alcalá, 1995), de tal manera que cuando ocurre alguna interferencia en una o varias de las estructuras, la información derivada de la experiencia de aprendizaje sigue su curso hacia el resto de los elementos del sistema, que en estas condiciones de alta motivación, son suficientes para consolidar la memoria. Es decir, que en condiciones de alta intensidad de choque (entrenamiento incrementado) el procesamiento de información parece ocurrir de manera simultánea y paralela en varios de los sistemas de memoria del cerebro. En el siguiente apartado describiré algunas de esas evidencias y que son el antecedente directo para el planteamiento de mi estudio.

### III. ANTECEDENTES

#### III.1. Protección del sobrerreforzamiento contra la amnesia producida por tratamientos sistémicos

En nuestro laboratorio se ha mostrado que la administración sistémica de drogas anticolinérgicas produce amnesia; e.g., las inyecciones de atropina en el STR administradas después del entrenamiento de evitación inhibitoria producen un profundo estado amnésico (Cruz-Morales et al., 1992; Giordano y Prado-Alcalá, 1986). Con el mismo protocolo, Durán-Arévalo et al. (1990) confirmaron el efecto amnésico clásico producido por la administración intraperitoneal (i.p.) de escopolamina, pero cuando los animales fueron entrenados con un estímulo aversivo relativamente alto, el bloqueo de la actividad colinérgica no produjo deficiencia alguna en la retención de largo plazo. Este resultado indicó que la acetilcolina (ACh) es necesaria para la consolidación de la memoria en condiciones de entrenamiento con una intensidad baja de choque eléctrico, pero no lo es cuando los sujetos se someten a una experiencia incrementada de entrenamiento, es decir, con intensidades de choque relativamente elevadas.

En un estudio de Quirarte et al. (1993) se estableció que la actividad colinérgica cerebral interviene en la consolidación de la memoria cuando la experiencia de aprendizaje se da dentro de un cierto intervalo de intensidades de estímulo aversivo: el entrenamiento con intensidades entre 0.3 y 0.6 mA no deteriora la retención pues la ejecución de los sujetos tratados con escopolamina no es diferente con respecto a sus controles, en otras palabras, existe un intervalo de intensidades donde la actividad colinérgica del sistema nervioso central no es necesaria para la memoria. Con intensidades intermedias (entre 0.7 y 0.8 mA) la actividad colinérgica del sistema nervioso central sí es necesaria para que ocurran los procesos de la memoria de largo plazo, pues el bloqueo colinérgico produjo un deterioro marcado en la retención. Mientras que dicho tratamiento es inefectivo para que el deterioro se manifieste en animales entrenados con intensidades de choque altas, de 1.0 mA. Los autores interpretan los resultados de la forma siguiente:

- Cuando el animal se enfrenta a una situación en la que su integridad física no está amenazada (baja intensidad de choque eléctrico) y en la que la motivación para evitar la situación aversiva es baja, algunos sistemas neuroquímicos diferentes al colinérgico se encargan de que la información derivada de la experiencia de aprendizaje quede almacenada.
- Cuando la situación se torna relativamente peligrosa (intensidades intermedias de choque) la activación de los sistemas colinérgicos es indispensable para que la memoria del evento se consolide.
- Por último, cuando la integridad del organismo está seriamente amenazada (intensidades altas de choque eléctrico), estando altamente motivado para ejecutar la respuesta de evitación, se activarán de manera simultánea, múltiples sistemas neuroquímicos de tal manera que aunque el colinérgico sigue participando en el proceso de consolidación, éste ya no es indispensable para que se almacene la memoria, mientras que los sistemas neuroquímicos restantes se hacen cargo de esta función.

El efecto protector en contra de la amnesia, producido por el incremento en la experiencia de aprendizaje, dio lugar a la hipótesis de que el mismo efecto se encontraría al bloquear la actividad de los sistemas neuroquímicos GABAérgico y serotoninérgico, aunque hay controversia en cuanto a la manera en cómo el ácido gamma amino butírico (GABA) está involucrado en los procesos de memoria. Por una parte, se ha observado que la administración sistémica de antagonistas a receptores GABA facilitan la retención de la evitación inhibitoria y del aprendizaje de discriminación en un laberinto (Brioni y McGaugh, 1988) y por otro lado, se ha encontrado que estos antagonistas producen amnesia de la tarea de evitación inhibitoria y de la supresión condicionada (Nabeshima et al., 1988). También se han reportado resultados contradictorios cuando se ha alterado la actividad GABAérgica en áreas cerebrales específicas; por ejemplo, la infusión del agonista muscimol en la corteza entorrinal, AMY e HC produce amnesia retrógrada, y la infusión de antagonistas a receptores GABA en el septum o la AMY produce efectos de facilitación en tareas instrumentales (Brioni y McGaugh, 1988; Brioni, Nagahara y

McGaugh, 1989; Izquierdo et al., 1992); en contraste, la administración de esta clase de antagonistas en la SN (Cobos-Zapíaín et al., 1996) y en el STR (Chávez et al., 1995; Salado-Castillo et al., 1996) induce amnesia. Algunas de las discrepancias mencionadas podrían deberse a diferencias en los procedimientos y parámetros de la estimulación aversiva utilizados durante el entrenamiento (Cruz-Morales et al., 1993) o a la actividad GABAérgica de sistemas neuronales diferentes (límbico y nigroestriatal) (Chávez et al., 1995).

Un gran número de resultados experimentales apoyan la idea de que la serotonina o 5-hidroxi-triptamina (5-HT) juega un papel importante en procesos de memoria (Ögren, 1985). Sin embargo, no se tenían datos acerca de la interacción de tratamientos que alteran la actividad de la 5-HT y la magnitud del estado motivacional durante la experiencia de aprendizaje.

Con base en los resultados obtenidos con los sistemas GABAérgico y colinérgico, se planteó la hipótesis de que la interferencia con la actividad serotoninérgica produciría amnesia en ratas entrenadas con intensidad baja de choque eléctrico; también se hizo la predicción de que ese tratamiento no modificaría la memoria en ratas entrenadas con una intensidad alta de choque. Así, tanto antes o después, como antes y después del entrenamiento se inyectó una droga que produce agotamiento duradero de 5-HT, la p-cloranfetamina; este tratamiento produjo una interferencia significativa con el almacenamiento de la memoria en los animales entrenados con una intensidad baja de estímulo aversivo, pero no en aquellos que habían sido entrenados con el choque de intensidad alta (Solana-Figueroa et al., 2002).

Tomados en conjunto, los experimentos descritos sugieren fuertemente que: a) la actividad normal de los sistemas colinérgico, GABAérgico y serotoninérgico cerebrales es indispensable para que se lleve a cabo el proceso de consolidación de la memoria; b) en condiciones de un entrenamiento incrementado, cuando se ha aumentado la motivación para ejecutar una tarea, esos sistemas neuroquímicos pueden participar en el proceso de consolidación, pero ninguno de ellos es indispensable para dicha función; y c) cuando en condiciones de motivación



incrementada se interfiere con la actividad normal de cualquiera de esos sistemas neuroquímicos, los sistemas remanentes que mantienen su actividad normal son suficientes para que se establezca la memoria de largo plazo.

### **III.2. Protección del sobrerreforzamiento contra la amnesia producida por tratamientos intracerebrales**

En contraste con los efectos generalizados sobre la actividad cerebral, producidos por la administración sistémica de fármacos, la infusión directa de éstos en sitios restringidos del cerebro permite hacer inferencias más precisas acerca de las funciones de núcleos o regiones neuronales particulares. Por ejemplo, al microinyectar drogas antimuscarínicas en el cuerpo estriado de ratas, inmediatamente después de que fueron entrenadas en la tarea de evitación inhibitoria se produce un estado amnésico que es dependiente de la dosis administrada y del intervalo entre el entrenamiento y la administración (Giordano y Prado-Alcalá, 1986; Prado-Alcalá et al., 1981). De manera equivalente a lo descrito para el caso de los tratamientos sistémicos, cuando se incrementó el estado motivacional de los animales, por aumento de la intensidad del choque eléctrico aplicado durante el entrenamiento, la infusión de los antimuscarínicos escopolamina o atropina en el STR no produjeron alteraciones en la memoria (Díaz del Guante et al., 1990; Giordano y Prado-Alcalá, 1986).

Asimismo, cuando se indujo un bloqueo temporal de toda la actividad sináptica de la región dorsal del STR anterior, de la AMY o de la SN por medio de la infusión de lidocaína, se encontró amnesia en animales entrenados con un choque relativamente leve, pero la memoria se protegió cuando se incrementó la intensidad del estímulo aversivo (Pérez-Ruiz y Prado-Alcalá, 1989; Salado-Castillo et al., 2011). También se ha reportado que tanto lesiones de la AMY (Parent, Quirarte, Cahill y McGaugh, 1995) como microinyecciones de picrotoxina en la SN (Cobos-Zapiaín et al., 1996) producen deficiencias en la memoria, y que estas deficiencias ya no se hacen evidentes cuando se incrementa la motivación para prevenir la estimulación aversiva.

Los datos descritos indican que hay tratamientos que al ser aplicados en estructuras cerebrales específicas inducen un cuadro amnésico cuando el nivel motivacional derivado de la experiencia de aprendizaje es relativamente bajo. Pero, de nuevo, cuando el nivel motivacional se encuentra incrementado, esos tratamientos se tornan totalmente inocuos, es decir, ya no producen amnesia. Una situación experimental que vale la pena resaltar es que en estos protocolos los tratamientos amnésicos intracerebrales se han aplicado después del entrenamiento.

Los resultados referentes a los efectos de tratamientos intracerebrales sobre la retención de la tarea de evitación inhibitoria, han dado lugar al planteamiento de modelos que permiten interpretar de un modo global dichos resultados; además, estos modelos han servido para hacer predicciones y para guiar nuevas investigaciones.

En virtud de que en todos los casos analizados, bastó con que se interfiriera con la actividad fisiológica de una sola estructura para que no se consolidara la memoria, es razonable postular que todas ellas son necesarias y que están conectadas funcionalmente en serie, de tal forma que sin la participación de una de ellas no se produce la consolidación, o sea que son indispensables para los procesos de almacenamiento de la memoria. Esto ha llevado a plantear un tipo de conexión en serie proponiéndose que al impedir el funcionamiento de alguna de ellas, se interrumpe el paso de información a las demás, por lo que el proceso mnemónico no se realiza (Prado-Alcalá, 1995).

Ahora bien, cuando el estado motivacional se incrementa de manera significativa, la misma interferencia que producía amnesia, ahora resulta inofensiva, es decir, el proceso de consolidación se realiza normalmente. En otras palabras, cuando la motivación para evitar la estimulación aversiva es muy alta (sobrerreforzamiento), se observa que a pesar de interrumpir la actividad de cualquiera de las estructuras descritas no se deteriora el proceso de almacenamiento de la memoria. La interpretación que se ha dado es que las estructuras involucradas cambian su conectividad, pasando de una configuración de circuito en serie a la de un circuito conectado funcionalmente en paralelo, de tal manera que cuando ocurre

alguna interferencia en una o varias de las estructuras, la información derivada de la experiencia de aprendizaje sigue su curso hacia el resto de los elementos del sistema, que en estas condiciones de alta motivación, son suficientes para consolidar la memoria (Prado-Alcalá, 1995).

Desde otro punto de vista, es posible que las estructuras de las que depende la consolidación de la memoria en condiciones motivacionales bajas (condiciones de bajo reforzamiento), también sean indispensables cuando el entrenamiento se lleve a cabo en una situación altamente motivante (condiciones de sobrerreforzamiento). Se ha propuesto que la razón por la que el almacenamiento de información aún se lleva a cabo cuando la experiencia de entrenamiento es elevada, a pesar de la aplicación de tratamientos típicamente amnésicos es la siguiente: **el incremento en la experiencia de entrenamiento induce la aceleración del proceso de consolidación de la memoria que se llevaría a cabo en el corto intervalo entre el entrenamiento y la aplicación del tratamiento amnésico** (Parent y McGaugh, 1994). En otras palabras, en la medida en que el choque eléctrico aplicado durante el entrenamiento es de mayor intensidad, en esa medida el proceso de consolidación se efectúa más rápidamente. Recientemente, se encontró que los efectos amnésicos típicos de cicloheximida, un inhibidor de la síntesis de proteínas, fueron prevenidos por el entrenamiento incrementado de evitación inhibitoria (Díaz-Trujillo et al., 2009). A pesar de esta evidencia, los mecanismos neurobiológicos del efecto protector de la mejora del aprendizaje frente a los tratamientos amnésicos siguen siendo completamente desconocidos.

### **III.3. Espinas dendríticas y memoria**

Un principio fundamental de las bases teóricas estructurales para el aprendizaje es que el diagrama del cableado básico del cerebro podría ser modificado durante el periodo de vida de un individuo y que el aprendizaje es capaz de inducir cambios estructurales continuos, incluyendo el crecimiento de conexiones nuevas. Aunque diferentes aspectos de la estructura sináptica parecen cambiar con la experiencia, el principal sustrato potencial consistente para el almacén de memoria durante modificaciones conductuales es una alteración en el patrón de conexiones

sinápticas (Greenough y Bailey, 1988; Weiler, Hawrylak y Greenough, 1995). Un cambio estructural neuronal, que ha sido propuesto como un sustrato de la memoria de largo plazo, está relacionado con los cambios en la densidad de las espinas dendríticas (Horner, 1993; O'Malley et al., 2000; Leuner et al., 2003). También hay amplia evidencia que apoya el punto de vista de que la adquisición de nueva información induce el desarrollo de espinas dendríticas en el hipocampo en una variedad de tareas de aprendizaje (Horner, 1993; Moser, Trommald y Andersen, 1994; Rusakov et al., 1997; O'Malley et al., 2000; Leuner et al., 2003; Restivo et al., 2009), incluyendo la tarea de evitación inhibitoria utilizada en el presente estudio (O'Malley et al., 1998). En este caso, la densidad de espinas dendríticas del hipocampo dorsal se incrementó a las 6 h después del entrenamiento y regresó a los niveles basales a las 72 h después del entrenamiento.

El hipocampo no sólo está implicado en la adquisición de respuestas condicionadas, sino también en el proceso de extinción, es decir, en la disminución del aprendizaje de las respuestas condicionadas después de la suspensión del estímulo incondicionado o reforzador (Szapiro et al., 2003; Vianna et al., 2003; Dillon et al., 2008). Sin embargo, hay una evidente falta de información con respecto a la formación de espinas en el aprendizaje incrementado, y todavía menos en relación con la extinción del este tipo de aprendizaje.

### **III.4. La formación hipocámpica**

#### **III.4.1. Ubicación y anatomía**

La formación hipocámpica (FH) es una región especializada de la corteza límbica, localizada en el lóbulo temporal. La FH ocupa el eje septo-temporal, y está constituida por el giro dentado el hipocampo HC o Cornus Ammonis (CA), el complejo subicular y la corteza entorrinal.

En la Figura 3 se muestra la posición de la formación hipocámpica en el cerebro de rata (Amaral y Witter 1989). En la Figura 4 aparecen las principales regiones citoarquitectónicas de la formación hipocámpica: 4A el hipocampo, la corteza entorrinal y también se muestra el eje longitudinal o septotemporal transverso de la formación hipocámpica el cual se extiende desde el polo septal al polo

temporal. En la figura 4B aparece una sección transversa con sus campos (giro dentado, CA3-CA1 y el subículum) y sus varias capas así como el circuito trisináptico (el giro dentado da lugar a las fibras musgosas que trayectan el estratum lucidum hacia las dendritas de las células piramidales del CA3, donde ellas terminan. Las células del CA3 distribuyen las colaterales de Schaffer a las células del CA1, las que a su vez envían sus axones al subículum) (Witter, 1989).

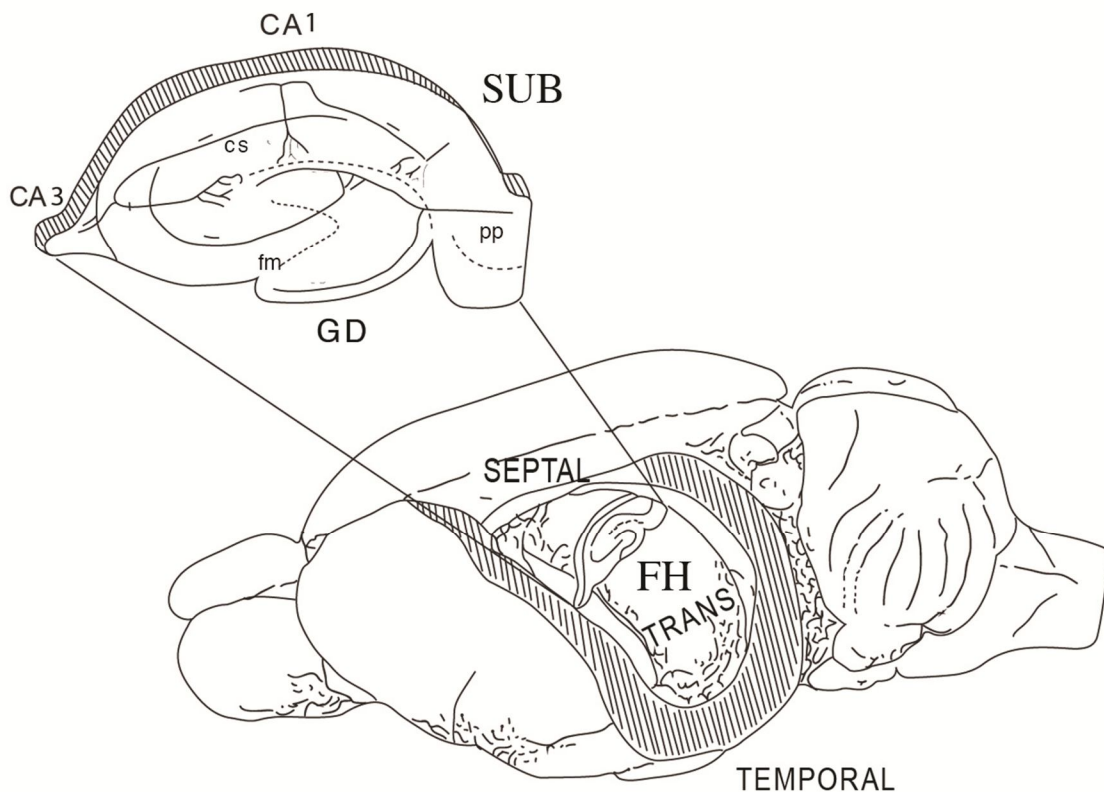


Figura 3. Posición de la formación hipocámpica en el cerebro de rata. En el esquema, la superficie cortical que recubre el hipocampo ha sido removida. El hipocampo es una estructura alargada, en forma de C con el eje largo o septotemporal que va desde el núcleo septal rostral (S) a la corteza temporal (T) ventrocaudal. El eje corto o transversal (TRANS) está orientado perpendicular al eje septotemporal. Los principales campos de la formación hipocámpica (a excepción de la corteza entorrinal) se encuentran en las rebanadas tomadas aproximadamente a medio camino a lo largo del eje septotemporal. El corte representado en la parte superior izquierda es una representación de la síntesis de los principales elementos neuronales y conexiones intrínsecas de la formación hipocámpica. Abreviaturas: GD, giro dentado; fm, fibras musgosas, pp, vía perforante, cs, colaterales de Schaffer. (Tomado de Amaral y Witter, 1989).

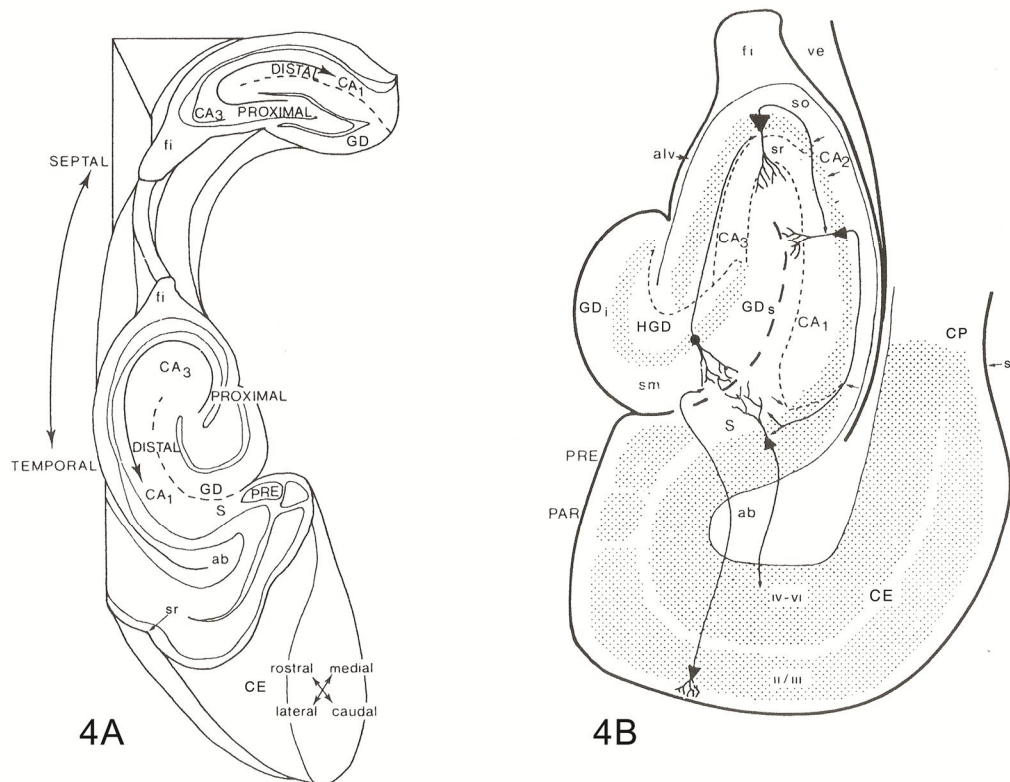


Figura 4. Principales regiones citoarquitectónicas de la formación hipocámpica: Giro dentado (GD); hipocampo dividido en CA1, CA2 y CA3; complejo subicular (subiculum S, pre PRE y para subiculum PAR) y corteza entorrinal (EC). 4A indica el eje longitudinal o septo temporal, el cual corre desde el polo septal al polo temporal. 4B es un esquema de una sección perpendicular al eje longitudinal y se señalan las relaciones de entrada y salida del hipocampo con la corteza entorrinal y el circuito trisináptico: el giro dentado da lugar a las fibras musgosas que trayectan el estratum lucidum hacia las dendritas de las células piramidales del CA3, donde ellas terminan. Las células del CA3 distribuyen las colaterales de Schaffer a las células del CA1, las que a su vez envían sus axones al subículo. Abreviaturas: CA1, 2, 3 subcampos del asta de Amon; GD giro dentado, GD<sub>i</sub> hoja infrapiramidal del giro dentado, GD<sub>s</sub> hoja suprapiramidal del giro dentado, CE corteza entorrinal, fi fimbria, HGD hilus del giro dentado, PAR parasubiculum, CP corteza perirrinal, PRE presubiculum, sr sulcus rinal, S subiculum, sm capa molecular, so stratum oriens, sr stratum radiatum (Tomado de Witter, 1989).

El GD está formado por células granulares (CG) dispuestas en forma de “C” alrededor de la región del hilio. Este último contiene una población heterogénea de interneuronas GABAérgicas. Los axones de las CG forman un plexo de fibras

denominadas “musgosas” (FM) que atraviesan la región del hilio y hacen contacto con las células piramidales del campo CA3 (Claiborne et al., 1986). El plexo de FM está integrado por axones finos no mielinizados con terminales gigantes que contienen altos contenidos de zinc (Haug, 1976).

El HC, propiamente dicho, está separado del GD por la fisura de la FH, está constituido por neuronas piramidales divididas en 4 campos, CA1, CA2, CA3 y CA4. Su organización laminar permite identificar 5 estratos: El stratum pyramidale, compuesto por los cuerpos neuronales de las células piramidales; el stratum radiatum y el stratum lacunosum moleculare que corresponden a las arborizaciones dendríticas apicales en su porción medial y terminal respectivamente. El stratum oriens, está formado por las dendritas basales y los axones de las neuronas piramidales que atraviesan hasta el alveus para dar lugar a la fimbria del HC y al fórnix. En el campo CA3 se forma el stratum lucidum, en el cual se encuentran las aferencias de las fibras musgosas del giro dentado. Finalmente, el complejo subicular está constituido por células piramidales y polimórficas. Sus límites son la corteza entorrinal y el campo CA1, del cual recibe aferencias abundantes (Cohen y Eichenbaum, 1993).

En la Figura 5 se presenta un esquema de la organización tridimensional de la formación hipocámpica del cerebro de rata: en (A) se muestra el hipocampo en forma de C en una envoltura transparente del cerebro de la rata. Se pueden apreciar las columnas del fórnix (f) descendente en el polo septal del hipocampo. En (B) se muestran tres secciones horizontales (mayúsculas pequeñas A, B y C en diferente nivel dorso-ventral de la formación hipocámpica. La corteza entorrinal (CE) no se ve en el nivel más dorsal, pero es evidente en los niveles medio y ventral de la formación hipocámpica. En (C), la superficie de la formación hipocámpica se ha dibujado fuera del cerebro y la acompañan tres secciones coronales (mayúsculas pequeñas D, E y F) a diferente nivel rostro-caudal. Son indicados también el polo septal (s) y temporal (t) y los campos CA1 y CA3 del hipocampo, el caudado y putamen CPu, el giro dentado DG, la fimbria (fi) y el subículum (s) (Witter y Amaral, 2004).

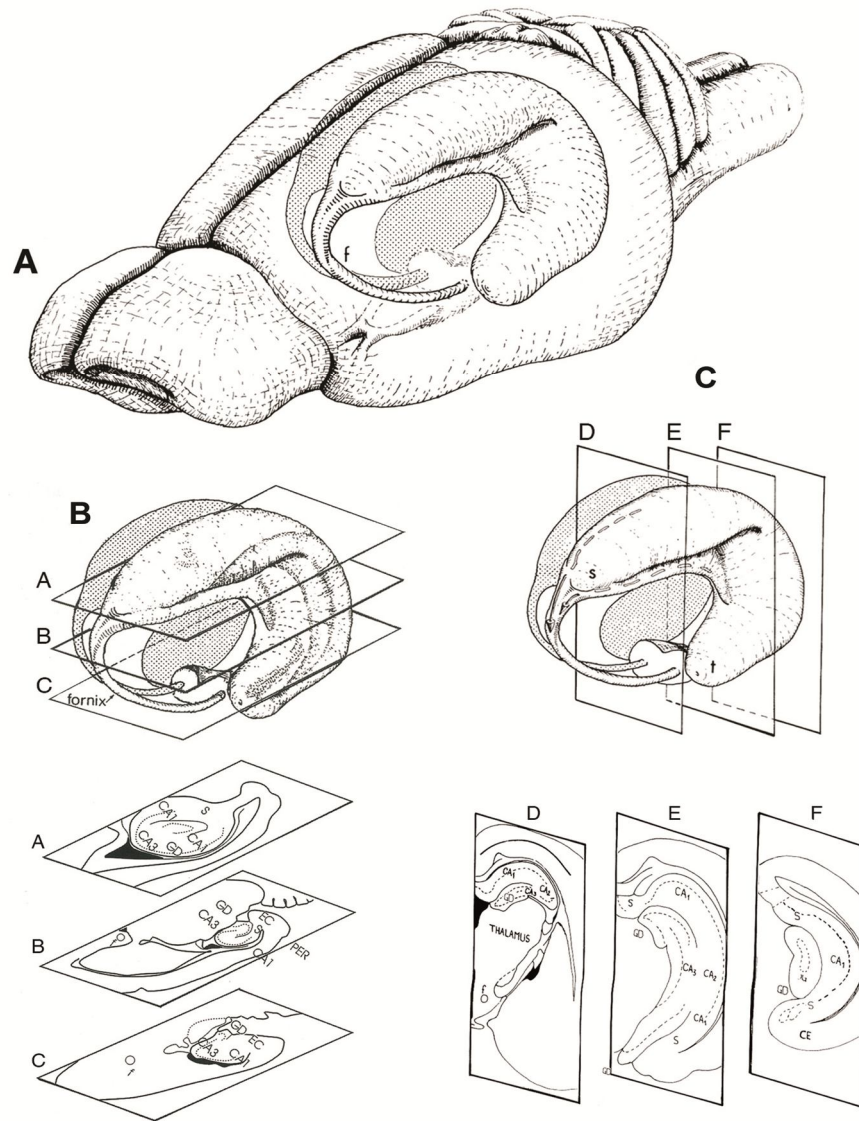


Figura. 5. Organización tridimensional de la formación del hipocámpica. En (A), hipocampo en forma de C en una envoltura transparente del cerebro de la rata. En (B), tres secciones horizontales (mayúsculas pequeñas A, B y C en diferente niveles dorso-ventrales de la formación hipocámpica. En (C), la formación hipocámpica se dibujó fuera del cerebro. En D, E y F (mayúsculas pequeñas) se muestran secciones coronales en diferente nivel rostro-caudal a través de la formación hipocámpica. Tomado de Witter y Amaral, 2004.



### **III.4.2. Desarrollo sináptico**

La generación neuronal en la FH es heterocrónica. Así, las células piramidales de los distintos campos se generan entre los días embrionario (E) 14 y 19. Las células granulares del giro dentado inician su generación en E14, tienen un pico de proliferación en los días postnatales (P) 5 y 7, y se continúan generando a lo largo de la vida (Bayer, 1982).

El desarrollo dendrítico de las células de la FH se inicia en la etapa embrionaria, tiene un pico de desarrollo en los días P5 y P10 para los campos CA1 y CA3, respectivamente. Sin embargo, la maduración dendrítica se completa alrededor del día P20 debido al retardo en el desarrollo de la conectividad con el giro dentado. Finalmente las espinas sinápticas de las células piramidales inician su generación en el día P4, alcanzan un máximo desarrollo en el día P15 y maduran alrededor de P24 (Pokorny y Yamamoto, 1981; Fiala, et al., 1998).

### **III.4.3. Conexiones**

Las fibras aferentes glutamatérgicas provenientes de la corteza entorrinal entran a la FH, a través del patrón perforante. La corteza entorrinal recibe aferencias de las cortezas del cíngulo, prefrontal y límbicas entre las que están las áreas de asociación cortical; olfatoria, de diversos núcleos talámicos, del clastrum y de la AMY. La FH recibe también aferencias de varios tipos a saber: colinérgicas, originadas en el área septal; dopaminérgicas provenientes del área tegmental mesencefálica; serotoninérgicas originadas en núcleo rafe dorsal y noradrenérgicas del locus coeruleus (Köhler, 1985; Cohen y Eichenbaum, 1993).

Las fibras eferentes que nacen del HC y del complejo subicular, corren por la fimbria-fórnix hasta llegar a las áreas septales y a las regiones diencefálicas. El HC proyecta al diencefalo por medio de dos rutas: una constituida por el fórnix postcomisural que termina en el hipotálamo, el cuerpo mamilar, el procencéfalo rostro medial y en el núcleo talámico anterior. La otra vía está formada por fibras precomisurales originadas en CA1, CA3 y subículum. Esta vía termina en el área septal, la cual, a través de los núcleos septo-fimbrial y habenular medial proyecta al hipotálamo (Swanson et al., 1980).

#### III.4.4. Circuito Trisináptico del hipocampo

El blanco principal de la vía perforante es la capa molecular del giro dentado que forma la **primera sinapsis** del circuito hipocámpico. Las fibras musgosas del giro dentado, forman la **segunda sinapsis**, al unirse con las células piramidales del CA3. Estas últimas proyectan sus axones (i.e., colaterales de Schaffer) a las neuronas del campo CA1 formando la **tercera sinapsis** del circuito trisináptico del HC (Buzsáki y Eidelberg, 1982). El campo CA1 proyecta en forma columnar al subiculum, y algunas de sus proyecciones también se dirigen a capas profundas de la corteza entorrinal (Isaacson, 1982). Por otra parte, las neuronas piramidales del CA1 reciben aferencias provenientes del HC contralateral (i.e., fibras comisurales intrahipocámpicas) a nivel del primer tercio de la dendrita apical y en las dendritas basales. También recibe aferencias de la corteza entorrinal a través del patrón perforante, las cuales terminan a nivel del stratum lacunosum moleculare (Köhler, 1985).

#### III.4.5. Función

Con base en los efectos del daño en el HC y el registro de su actividad neuronal en primates, se ha sugerido que participa en la asociación de la información proveniente de diferentes regiones corticales, por ejemplo, acerca de objetos y su ubicación en el ambiente espacial, que requieren de memoria de eventos particulares o episódicos (Maguire et al., 1996a; Maguire et al., 1996b; Rolls, 1996). Se ha observado que personas con lesión bilateral del HC son incapaces de almacenar recuerdos de tipo simbólico y verbal. Se ha argumentado que el HC es el substrato de la memoria declarativa, definida como la acumulación de hechos y datos derivados de las experiencias de aprendizaje (Squire, 1992; Cohen y Eichenbaum, 1993). En la rata, se ha demostrado que el HC participa en la memoria espacial y juega un papel esencial en los procesos de integración (Sharp 1997; McNaughton et al., 1996; Maaswinkel y Jarrard, 1999) y consolidación del aprendizaje (Morris et al., 1982; Olton, 1983; Olton y Papas, 1979; Vann et al., 2000). Se sabe también que participa en conductas de exploración y rastreo olfatorio (Swanson, 1983).

En el HC se genera un patrón electroencefalográfico de actividad rítmica lenta (4-12 Hz) denominado ritmo theta del HC. Dicha ritmicidad tiene una influencia colinérgica desde el septum medial y el núcleo de la banda diagonal de Broca. El ritmo theta, se presenta durante el sueño de ondas lentas, y en vigilia se le asocia con algunos estados de atención y alerta (Cohen y Eichenbaum, 1993), por lo que se ha propuesto como un mecanismo de atención selectiva e importante en la formación de memoria (Vinogradova, 1995).

Por otra parte, el HC como parte del sistema límbico, está conectado intrincadamente con casi todo el cerebro, y su participación en las emociones marca un blanco obvio para ser dañado por el estrés excesivo. El HC monitorea las percepciones del mundo por el cerebro, especulando continuamente con la realidad, sin embargo, situaciones no esperadas o experiencias estresantes lo ponen en acción (McEwen y Schmeck, 1994).

El HC es una estructura que presenta plasticidad sináptica, debido a que permite un incremento persistente en la eficacia sináptica después de la estimulación repetitiva de una población sináptica, que puede durar desde horas hasta varios días, denominado potenciación a largo plazo (LTP) y se ha utilizado como modelo para explicar los mecanismos sinápticos involucrados en los procesos de memoria y aprendizaje (Bliss y Lomo, 1973; Bliss y Gardner-Medwin, 1973).

#### **III.4.6. El hipocampo y la memoria**

Con base en estudios de lesión, estimulación y registro electrofisiológico se ha propuesto que el HC está implicado en la adquisición y consolidación de una representación del medioambiente con base en estímulos multimodales (e.g., estímulos espaciales, sensoriales, configuracionales y temporales) (O'Keefe y Nadel, 1978; Sutherland y Rudy, 1989; Anagnostaras, Gale y Fanselow, 2001). En roedores, es una estructura clave para la consolidación de la memoria en tareas espaciales (Jarrard, 1993; Morris et al., 1982) y de la conducta de rastreo olfatorio (Swanson, 1983). También ha sido asociado con tareas motivadas aversivamente, observándose que su lesión produce un deterioro significativo en la retención del

aprendizaje de evitación inhibitoria (Bailey, Overstreet y Crocker, 1986; Black, Nadel y O'Keefe, 1977; Thompson, 1978; Walsh et al., 1984).

Moser y Moser (1998) revisaron la evidencia anatómica y conductual que indicaba que había una diferenciación funcional entre las porciones dorsal y ventral del HC de la rata. Se ha propuesto que el HC ventral juega un papel más prevaeciente en conductas motivadas aversivamente (e.g., evitación inhibitoria, condicionamiento de conducta de congelamiento, y ansiedad) debido a sus densas conexiones anatómicas con estructuras subcorticales (hipotálamo, amígdala y núcleo accumbens) implicadas en la defensa y emoción (Bast, Zhang y Feldon, 2001; Moser y Moser, 1998; Petrovich et al., 2001), mientras que al HC dorsal se le atribuye un papel principal en el procesamiento de memoria espacial (Eichenbaum, 1996; Moser, Moser y Andersen, 1993). Sin embargo, existen reportes indicando que tanto el HC ventral como el HC dorsal están implicados, aunque con diferencias, en la adquisición, consolidación y recuperación de la memoria de la respuesta de evitación inhibitoria (Ambroggi et al., 1996, 1997). Otro estudio reciente ha destacado la participación de los receptores nicotínicos del HC dorsal en la adquisición, consolidación y recuperación de la memoria de la tarea de evitación inhibitoria (Barros et al., 2004).

Así pues, el hipocampo está implicado en la consolidación de la memoria del entrenamiento de evitación inhibitoria, como lo demuestran los efectos de deterioro en la retención de esta tarea por la interferencia con la actividad hipocámpica (Izquierdo et al., 1992; Ambroggi-Lorenzini et al., 1996; Stublely-Weatherly et al., 1996; Martínez et al., 2002).

En nuestro laboratorio, la lesión neurotóxica producida por el ácido kaínico en el campo CA1 del HC dorsal o en el CA3 del HC ventral, produjo deterioro en la retención de la tarea de evitación inhibitoria (Martínez et al., 2002). En un estudio subsecuente, Quiroz et al. (2003) encontraron que cuando las ratas son entrenadas en esta tarea aplicando un estímulo aversivo de intensidad suficiente para que las ratas aprendan la conducta de evitación, la inactivación temporal del HC con la administración de TTX inmediatamente después del entrenamiento impide la

consolidación de la memoria de esta tarea cuando es evaluada 48 h después del entrenamiento, aunque el aprendizaje incrementado de esta tarea también protege contra la amnesia producida por el bloqueo reversible de la actividad del hipocampo (Quiroz et al., 2003).

### **III.5. Técnica de lesión en el estudio de los procesos mnemónicos**

Hasta el presente, la comprensión de los procesos conductuales, neuronales y bioquímicos implicados en las funciones del cerebro, en parte están basados en los efectos producidos por lesiones en regiones específicas del cerebro. La interrupción de los procesos mnemónicos debido a lesiones irreversibles inducidas antes de la adquisición de un aprendizaje puede ser el resultado de la interferencia con algunas de las etapas postuladas para la memoria (adquisición, consolidación y recuperación), ya que las estructuras dañadas pudieran estar involucradas en una o varias de estas etapas. De la misma forma, lesiones permanentes hechas después de la adquisición de una respuesta condicionada pueden afectar el almacenamiento de información o impedir su evocación. Otro problema con los estudios que implican lesiones permanentes es que las áreas hacia las cuales proyecta la región dañada, sufren rearrreglos que pueden modificar su fisiología posiblemente debido a procesos compensatorios que conducen a una recuperación de la función respectiva. Circuitos alternativos que normalmente son inoperantes pueden tomar la función de la región dañada. Por esta razón algunos laboratorios prefieren estudiar los efectos reversibles de infusiones dentro de áreas discretas del cerebro.

### **III.6. Inactivación reversible con tetrodotoxina (TTX)**

La inyección de TTX, se ha empleado para inactivar de forma reversible estructuras neurales; esta aproximación metodológica tiene sus ventajas porque, además de tratarse de un bloqueo reversible, con esta droga se ha definido en la rata el intervalo crítico de integridad funcional de diferentes estructuras subcorticales, necesario para la consolidación de la memoria en tareas de evitación inhibitoria (Ambrogio Lorenzini et al., 1996, 1997, 1999). Con esta técnica se ha obtenido no sólo información topográfica, sino también cronológica sobre los correlatos neuronales del procesamiento de la memoria (Ambrogio Lorenzini et al., 1999).

Con respecto a la extensión y duración de la inactivación funcional inducida por la administración de TTX, reportes previos indican que una dilución de 10 ng/ $\mu$ L produce un bloqueo cuyo radio promedio es aproximadamente de 1 mm y que el efecto obtenido es máximo a los 25 min de su aplicación y disminuye de manera exponencial hasta el nivel control alrededor de las subsecuentes 24 h (Zhuravin y Bures, 1991). En nuestro laboratorio, Quiroz y cols. (2003) mostraron que la administración de TTX (10 ng/ $\mu$ L) en el HC dorsal deteriora la actividad neuronal (medida por una disminución en la actividad de *c-fos* inducida con ácido kaínico) 30 min después de la administración de TTX y esta inactivación se mantiene por lo menos durante 90 min, observándose a las 48 h una total recuperación en la expresión de *c-fos*.

### **III.6.1. TTX y el bloqueo de canales de sodio dependientes de voltaje**

La tetrodotoxina (TTX) es una toxina marina que ha sido aislada de especies animales ampliamente diferentes incluyendo: salamandras, peces loro, ranas, pulpos, estrellas de mar, pez ángel y cangrejos. La fuente de la TTX es todavía incierta aunque se cree que puede ser bacteriana y su nombre se debe al pez al cual se asocia más comúnmente, los *Tetraodontiformes* (tetra, cuatro y odontos, diente) o pez globo *tetraodon*.

La molécula de TTX es un heterocíclico con un grupo guanidina cargado positivamente, el catión resultante se estabiliza por resonancia. En la Figura 6 se presenta la estructura química de la TTX donde el grupo guanidina, que consta de 3 átomos de nitrógeno (que aparecen en azul), es el que da el nombre genérico para esta clase de neurotoxinas: toxinas guanidinium (Marban, Yamagishi y Tomaselli, 1998).

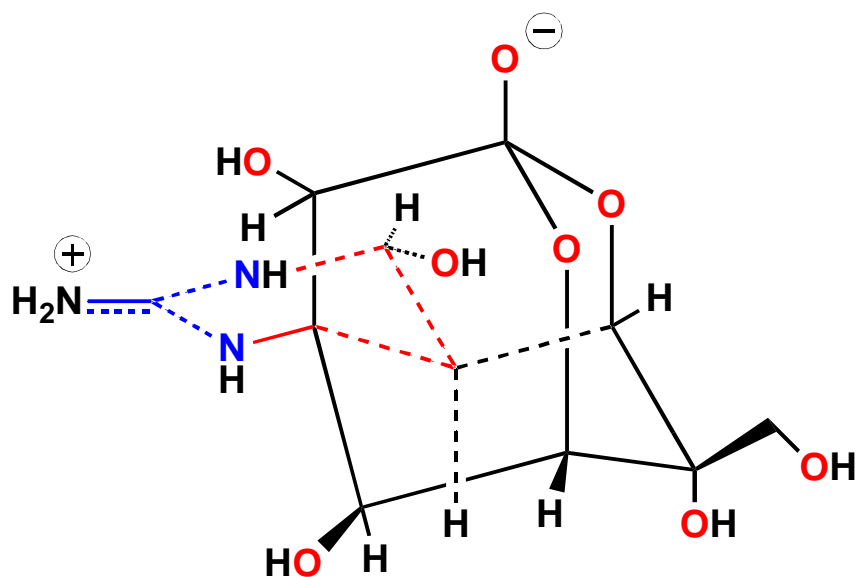


Figura 6. Estructura química de la TTX

La TTX está entre las sustancias más tóxicas conocidas, es muy específica actuando en los canales de sodio dependientes de voltaje de las membranas excitables, bloqueando selectivamente el flujo de sodio, interfiriendo así con la despolarización de la membrana e inhibiendo efectivamente la conducción nerviosa. Debido a su especificidad por los canales de Na<sup>+</sup>, permite la separación de las corrientes de Na<sup>+</sup> de otras corrientes iónicas (Fozzard y Limpricht, 2010), por lo que se ha usado en la caracterización de los canales de sodio en las membranas excitables y para estudiar el papel de ellos en la fisiología normal y patológica.

### III.6.2. Estructura del canal de sodio

Los canales de sodio son grandes glicoproteínas formadas por varias subunidades polipeptídicas denominadas  $\alpha$  (con una masa molecular de 240-280 kDa),  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$  y  $\beta_4$ , de entre 30 y 40 kDa cada una, en estado glicosilado. Además de la subunidad  $\alpha$ , los canales de sodio en el sistema nervioso central están conformados por las subunidades  $\beta_1$  (o  $\beta_3$ ) y  $\beta_2$ , en tanto que los del músculo esquelético del animal adulto tienen sólo la subunidad  $\beta_1$ . El poro acuoso conductor de iones está contenido en la subunidad  $\alpha$  y los elementos esenciales para la función

del canal (apertura, selectividad iónica e inactivación rápida) pueden ser demostrados cuando ésta es expresada sola en células heterólogas. Las subunidades  $\beta$  son elementos auxiliares que modifican la cinética y la dependencia de voltaje de la apertura y cierre del canal (Marban et al., 1998; Salceda y Ortega, 2009).

Utilizando secuencias parciales del canal de sodio purificado de la anguila eléctrica, se aisló el ADNc que codifica la subunidad  $\alpha$  de dichos canales. La secuencia deducida, de 1820 aminoácidos, reveló una proteína conformada por cuatro dominios homólogos (I-IV), cada uno de los cuales posee 6 segmentos transmembranales (S1-S6) en configuración helicoidal alfa. La Figura 7 muestra el arreglo generalmente aceptado en la actualidad para la subunidad  $\alpha$  del canal de sodio. La proteína constituye un poro cuya vía de permeación está formada en su parte externa por los lazos de unión S5-S6 (denominados segmentos P que se considera revisten el poro) de cada dominio. Hasta el momento se han caracterizado nueve subunidades  $\alpha$  en células de mamífero, mismas que en la nomenclatura moderna se denominan  $Na_v1.1$  a  $Na_v1.9$ . Se conoce también una décima isoforma relacionada ( $Na_x$ ) que funciona como canal de sodio (Noda et al., 1984; Salceda y Ortega, 2009).

En cuanto a la sensibilidad al voltaje, el hecho de que los segmentos transmembranales S4 posean residuos de aminoácidos cargados positivamente en cada tercera posición, sugiere que son estos segmentos los que constituyen los sensores de voltaje del canal (Bezanilla, 2000).



## Subunidad $\alpha$ del canal de $\text{Na}^+$

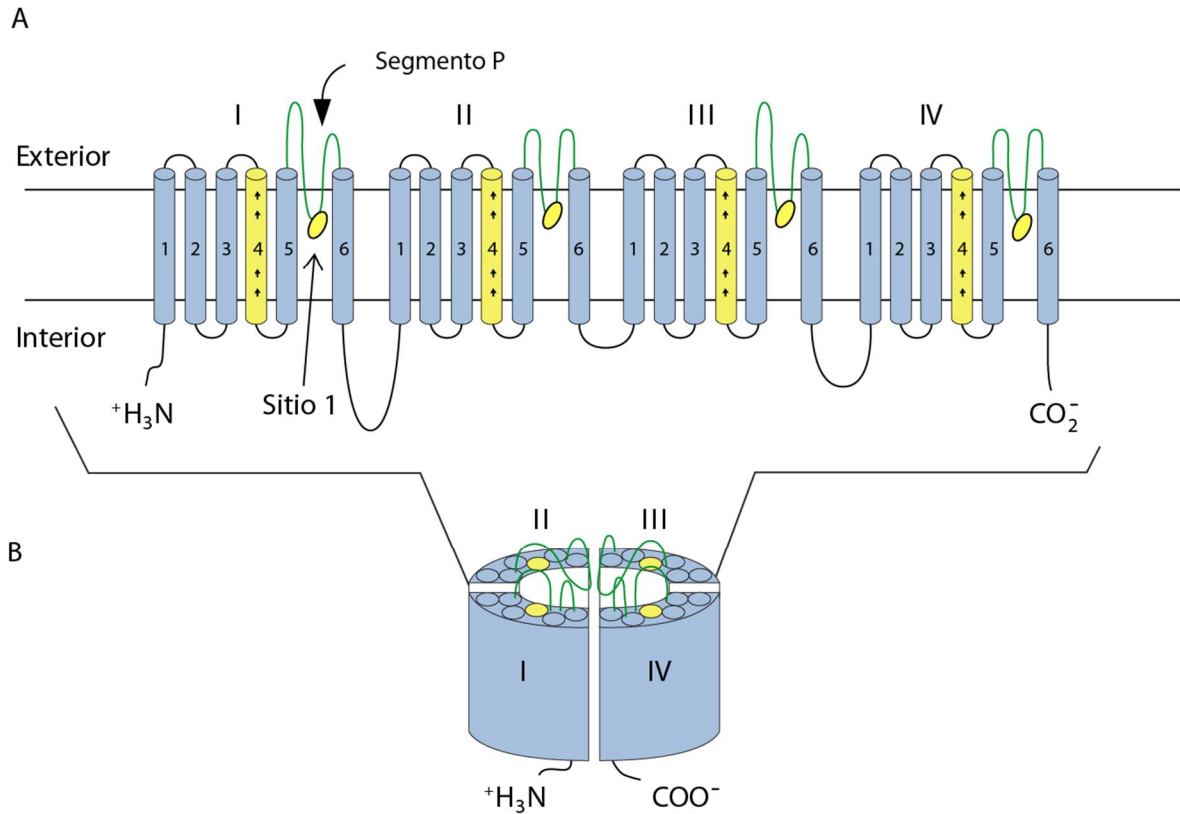


Figura 7. Representación esquemática de la subunidad  $\alpha$  del canal de  $\text{Na}^+$ . En A, los segmentos S4 cargados se muestran en amarillo, y los segmentos P revistiendo al poro en color verde (asa del poro del canal) y del I-IV los cuatro dominios del canal de  $\text{Na}^+$ . El esquema también muestra la localización del sitio receptor 1 (óvalo amarillo), al cual se une la tetrodotoxina (TTX). Este sitio receptor está formado por dos anillos de residuos aminoacídicos localizados en el asa que forman los segmentos transmembranales S5-S6 en cada uno de los cuatro dominios. En B, la disposición tridimensional de los dominios de expansión de la membrana del canal de  $\text{Na}^+$  regulado por voltaje (Modificado de Marban, Yamagishi y Tomaselli, 1998; Salceda y Ortega, 2009).

### III.6.3. Sitios de unión de las toxinas al canal de sodio

Todos los sitios receptores que se han propuesto como blancos de las toxinas identificados hasta hoy, parecen estar localizados en la subunidad  $\alpha$ . Nos ocuparemos del **Sitio 1** por ser el lugar de acción de los compuestos heterocíclicos como la TTX. Este sitio receptor se encuentra en la cara extracelular del canal y está presente en todas las isoformas conocidas del canal de sodio y su afinidad a la toxina es dependiente de la isoforma. Hay evidencias indicando que el Glu-387 del canal  $Na_v1.2$  del cerebro de rata es responsable de la afinidad del canal de sodio por la TTX (Noda, Suzuki, Numa y Stuhmer, 1989). Posteriormente, se demostró que ciertas mutaciones en la región S5-S6 en cualquiera de los cuatro dominios del canal causan una pérdida de afinidad por la TTX; uno de los residuos responsables correspondía al Glu-387 del canal  $Na_v1.2$ . Este residuo aminoacídico, junto con los residuos Glu-945, Asp-1426 y Asp-1717, fue relacionado con el anillo interno al cual se une la TTX. Un segundo grupo de residuos conforman un anillo externo que interactúa con la TTX, y está formado por los residuos aminoacídicos Asp-384 y Glu-942 en los dominios I y II, respectivamente, Lis-1422 en el dominio III, y un residuo neutral Ala-1714 en el dominio IV (Terlau, et al., 1991). Además de las interacciones electrostáticas con estos dos anillos, para que la TTX se una al canal se requiere de un anillo aromático del dominio I, en la región del poro. Este residuo no está absolutamente conservado y se presenta en canales de sodio resistentes a tetrodotoxina (TTX-R), incluida la isoforma cardíaca  $Na_v1.5$ . El cambio de una cisteína por Tir-385 en la isoforma cardíaca humana es responsable de la baja sensibilidad del canal a TTX (Satin et al., 1992). En la Figura 7 este Sitio 1 está representado por óvalos color amarillo

### III.6.4. Selectividad del canal por el ión sodio y la TTX

Los canales de sodio tienen un filtro de selectividad en algún punto a lo largo de ellos, con un sitio al que se unen débilmente los iones de  $Na^+$ . Se ha propuesto que el ión de  $Na^+$  se une transitoriamente a un sitio activo a medida que se mueve a través del filtro. En el lugar de unión, la carga positiva del ión se estabiliza por un residuo de aminoácido de carga negativa situado en la pared del canal y también por

una molécula de agua atraída a un segundo residuo de aminoácido polar en el lado externo de la pared del canal (Hille, 2001). La TTX, que se asemeja al catión de sodio hidratado, entra al poro del canal de  $\text{Na}^+$ , enlazándose a un glutamato adyacente. Tras los complejos cambios conformacionales, la TTX se une aún más electrostáticamente, a la apertura del canal de  $\text{Na}^+$ , negando así al ión sodio la oportunidad de entrar al canal; al detenerse el flujo del sodio, el potencial de acción a lo largo de la membrana nerviosa cesa. El agarre tenaz de la TTX sobre el complejo canal de  $\text{Na}^+$  es demostrado por el tiempo de ocupación de la TTX con respecto al  $\text{Na}^+$  hidratado en el complejo. El sodio hidratado se une reversiblemente en una escala de tiempo de nanosegundos, mientras que TTX se une y permanece en el orden de décimas de segundo (Johnson, 2002).

#### **IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Hasta el momento, la serie de experimentos realizados en el laboratorio para estudiar el efecto protector del sobrerreforzamiento implican la administración de tratamientos en estructuras cerebrales inmediatamente después del entrenamiento, por lo que el efecto protector del entrenamiento incrementado puede interpretarse cuando menos de dos maneras: 1) que en condiciones de sobrerreforzamiento se acelere el proceso de consolidación por lo que el intervalo de tiempo entre el entrenamiento y la administración del tratamiento farmacológico pudiera ser suficiente para que el aprendizaje se consolide, o bien, 2) que las estructuras inactivadas ya no son necesarias para que se consolide la memoria. Por lo tanto, el propósito de esta tesis es dilucidar cuál de estas dos interpretaciones es correcta.

#### **V. HIPÓTESIS**

1. La inactivación del hipocampo dorsal, inducida antes del entrenamiento de evitación inhibitoria mediado por reforzamiento alto producirá deterioro en la retención medida 48 h después del entrenamiento.

2. El número de espinas dendríticas en el área CA1 del hipocampo se incrementará guardando una relación directa con la extinción de la tarea cuando el entrenamiento de evitación ocurra con intensidad baja moderada y alta.

#### **VI. OBJETIVOS**

##### **VI.1. Objetivos generales**

- Investigar el efecto de intensidades bajas, moderadas y altas de choque eléctrico sobre la retención de una tarea de evitación inhibitoria cuando el HC dorsal se inactiva antes del entrenamiento.
- Estudiar la espinogénesis en las neuronas piramidales del área CA1 del hipocampo en la extinción de una respuesta de evitación inhibitoria que ha sido adquirida con niveles bajo, medio y alto (aprendizaje incrementado) de choque eléctrico.

## VI.2 Objetivos particulares

1. Determinar la intensidad de choque eléctrico que corresponde a un *bajo reforzamiento* (baja intensidad de choque eléctrico) y la intensidad de choque eléctrico que corresponde a un *alto reforzamiento* (alta intensidad de choque eléctrico).

2.- Establecer si el entrenamiento incrementado (entrenamiento con alta intensidad de choque eléctrico) tiene efecto protector a pesar de la inactivación temporal, con TTX, del hipocampo de rata.

**Dado que la administración de los tratamientos se efectuó antes de la sesión de entrenamiento, fue necesario realizar experimentos que permitieran descartar posibles efectos que pudieran confundirse con el de la deficiencia en la consolidación de la memoria. Para ello, se plantearon otros tres objetivos particulares:**

3.- Evaluar la posible presencia de aprendizaje ligado a estado con la administración intrahipocámpica de TTX.

4.- Evaluar el efecto de TTX sobre la memoria de corto y largo plazo de animales entrenados en evitación inhibitoria con baja intensidad de choque eléctrico.

5. Determinar si la aplicación de TTX en el hipocampo dorsal deteriora la actividad motora de la rata.

## **VII. MATERIALES Y MÉTODOS**

### ***VII.1. Animales***

Se emplearon ratas macho de la cepa Wistar, con peso entre 250 y 350 g obtenidas del bioterio del Instituto de Neurobiología. Los animales ingresaron al bioterio del laboratorio de Aprendizaje y Memoria y allí se mantuvieron en cajas individuales en condiciones controladas de temperatura de  $20 \pm 1$  °C, con un periodo de luz-oscuridad de 12 h (iniciándose a las 7:00 h) y con libre acceso a comida y agua. Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética Animal del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México y estuvieron en conformidad con las directrices del NIH (National Institute Health) para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio.

### ***VII.2. Cirugía***

Antes de la cirugía, los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (45 mg/kg, i.p.) y se les administró atropina (0.4 mg/mL i.p.) para evitar complicaciones respiratorias. Ya bajo anestesia general y con ayuda de un aparato estereotáxico, se procedió a implantar en varios grupos de animales, cánulas fabricadas con tubo de aguja hipodérmica de acero inoxidable del número 23, de 10 mm de largo. Las cánulas se dirigieron a la región dorsal del HC siguiendo las coordenadas obtenidas del atlas de Paxinos y Watson (2005) para cerebro de rata (AP = -4.1, L  $\pm$  2.5, V = 3.1). Después de fijar las cánulas al cráneo con acrílico dental, se les colocó un estilete de la misma longitud para evitar que se taparan; éste fue retirado para la administración de los fármacos. Las pruebas conductuales se iniciaron después de una semana de recuperación post-operatoria. También se estudiaron grupos de ratas intactas.

### ***VII.3. Manipulación***

Cada rata fue manipulada por tres a cinco minutos durante tres días consecutivos antes de iniciar cada experimento conductual. La manipulación consistió en sacarla de su caja, revisar los estiletes de las cánulas y sujetarla simulando la infusión de las sustancias. En el último día de manipulación se introdujo

en las cánulas un inyector falso con la longitud (10.5 mm) del inyector que se usaría durante la microinyección.

#### ***VII.4. Microinyección***

La inyección bilateral de las sustancias se hizo a través de las cánulas, utilizando inyectores contruidos con agujas de acero inoxidable calibre 30, conectados a microjeringas Hamilton acopladas a una bomba de infusión continua WPI modelo sp200i. El volumen total de cada inyección fue de 1  $\mu$ L y la velocidad de infusión fue de 1  $\mu$ L en un min. Una vez terminada la infusión, los inyectores se dejaron dentro de las cánulas durante un minuto adicional. Las microinyecciones se llevaron a cabo en un cuarto diferente a aquel en donde tuvieron lugar el entrenamiento y la prueba de retención. Transcurridos treinta minutos las ratas implantadas fueron entrenadas en la tarea de evitación inhibitoria de un ensayo.

#### ***VII.5. Aparatos***

El entrenamiento y la prueba se realizaron en una cámara de evitación inhibitoria constituida por dos compartimientos distintos, los cuales tienen las mismas dimensiones (30 x 30 x 30 cm) y están separados por una puerta corrediza tipo guillotina. El compartimiento de seguridad, con paredes y tapa de acrílico color rojo transparente, tiene un piso de barras de acero inoxidable (6 mm de diámetro, separadas por 9 mm de centro a centro), y se iluminó con un foco de 10 W colocado en el centro de su tapa. El otro compartimiento, no iluminado, tiene paredes laterales de acero inoxidable en forma de V y cada una se continúa hasta la mitad del piso, dejando 1.5 cm de separación entre ellas.

Estas láminas pueden ser electrificadas con un estimulador de pulsos cuadrados (Grass Instruments Co., modelo S-48) conectado en serie con una unidad de corriente constante (Grass Instruments Co., modelo CCU-1A). Los choques eléctricos fueron administrados en forma de un tren de pulsos cuadrados de corriente de 50 ms de duración, una frecuencia de 10 Hz y una duración de tren de 10 s. La cámara de condicionamiento estuvo localizada en un cuarto oscuro, sonoamortiguado y provisto de un enmascarador de ruido.

### ***VII.6. Entrenamiento y pruebas de extinción***

El día del entrenamiento cada animal fue puesto en el interior del compartimiento de seguridad; 10 s después, la puerta que divide los dos compartimientos se abrió y se midió la latencia para cruzar al otro compartimiento (latencia de entrenamiento). Cuando los animales cruzaron a este compartimiento la puerta fue cerrada y un choque eléctrico (un tren de impulsos cuadrados de 50 ms a 10 Hz) de 1.0, 2.0, ó 3.0 mA fue administrado. Cinco s más tarde la puerta fue reabierta permitiendo al animal escapar al compartimiento seguro y el estimulador fue apagado; esta latencia también fue medida (latencia de escape). Después de 30 s en el compartimiento de seguridad los animales fueron regresados a sus jaulas. Veinticuatro h después del entrenamiento, la extinción de la tarea fue medida en seis días consecutivos. Para este fin, se siguió el mismo procedimiento del entrenamiento excepto que el choque eléctrico fue omitido; si el animal no cruzó al segundo compartimiento dentro de 600 s se asignó un registro de latencia de retención de 600 y la sesión se dio por terminada. Después de la última sesión de extinción, cuatro animales de cada grupo fueron seleccionados al azar para realizar los análisis histológicos que se describen a continuación. Dos grupos control se añadieron: uno de ellos fue sometido al mismo procedimiento de entrenamiento, excepto que el choque eléctrico no se administró (grupo 0 mA, n = 3). Los animales del segundo grupo control (n = 3) fueron mantenidos bajo idénticas condiciones de vida a las de aquellos animales utilizados para el estudio conductual, pero nunca abandonaron el bioterio, excepto para el sacrificio (grupo Bio).

### ***VII.7. Actividad Motora Horizontal***

Para evaluar la actividad motora horizontal espontánea se utilizó una caja de acrílico transparente con tapa (42 cm de largo, 42 cm de ancho y 36 cm de altura). Un sistema de sensores infrarrojos está acoplado por fuera de la caja en cada una de sus caras, para medir la actividad del sujeto. Los sensores en las paredes opuestas se encuentran colocados a ras de la rejilla del piso de la caja, de manera que cuando el cuerpo del animal interrumpe el haz infrarrojo de cada sensor se revela su posición en los planos X-Y-Z. Este sistema de sensores permitió medir el desplazamiento



horizontal de los animales. La frecuencia de muestreo de la posición del sujeto fue de 50 Hz. Los datos se recolectaron con el software VersaMax System (AccuScan Instruments, INC., Columbus, Ohio). La cámara de actividad motora se ubicó dentro de un cuarto sonoamortiguado iluminado.

### ***VII.8. Verificación de la ubicación de las cánulas***

Después del experimento conductual, todos los animales a los que se les implantó cánulas se sacrificaron con una sobredosis de pentobarbital sódico y se perfundieron por vía intracardiaca con solución salina isotónica seguida de formaldehído al 10 %, posteriormente el cerebro se extrajo y se colocó en un frasco con formaldehído al 10%. Para corroborar la ubicación de las cánulas, se hicieron cortes coronales de 50 micrómetros de espesor que se montaron en laminillas portaobjeto para ser teñidos con la técnica de Nissl y observados al microscopio. Aquellos animales cuyos cortes mostraron que las puntas de los inyectores no se encontraron en el nivel referido del HC, no se incluyeron en el análisis estadístico.

### ***VII.9. Impregnación rápida de Golgi***

Inmediatamente después de la sexta prueba de extinción los animales seleccionados que habían sido entrenados, junto con aquellos grupos de 0 mA y Bio, fueron anestesiados con xilazina/ketamina y perfundidos transcárdialmente con una solución tampón de formalina al 10% (pH 7.4). Después de 24 h los cerebros fueron retirados del cráneo, y un bloque de 4 mm, conteniendo el hipocampo dorsal (Bregma -2.8 a -4.2) se obtuvo de cada animal. Cada bloque de hipocampo fue impregnado usando la técnica de Golgi rápido, modificado por Díaz-Cintra et al. (1981). Después de 12 días, cada bloque se transfirió a una solución de nitrato de plata al 0.75% en agua bidestilada por 12 h, se lavó en alcohol al 50%, embebido en nitrocelulosa de baja viscosidad, y cortado a lo largo del plano frontal con un espesor de 120  $\mu\text{m}$ . Cada sección se recogió en alcohol al 70%, se deshidrató, y montó en medio Entellan. Cada portaobjetos contó con 16 secciones de hipocampo dorsal y se le asignó un número al azar para asegurar que al momento de su observación se desconocieran las condiciones experimentales.

### **VII.10. Análisis morfométrico**

La cuenta de espinas dendríticas se realizó en cinco neuronas completas, bien impregnadas del CA1 del hipocampo dorsal de cada rata. Este análisis se llevó a cabo con un microscopio Nikon Optiphot-2 usando un objetivo de 100 X (Plan-Apochromat, NA 0,8) y una retícula ópticamente calibrada sobre el ocular de 10 X. Las fotomicrografías fueron ensambladas a partir de imágenes obtenidas en diferentes planos focales y reconstruidas usando el software Helicon Focus 5.1 (LTD, 2010).

Las dendritas apicales fueron divididas en segmentos proximal, medial y distal, donde la vía comisural, las colaterales de Schaffer, y las fibras de la vía perforante llegan, respectivamente (Amaral y Witter, 1989; Yeckel y Berger, 1990; Dudman et al., 2007). Se contó el número de espinas a lo largo de una longitud de 25  $\mu$ m de tres ramas secundarias de cada segmento. Así, se obtuvieron tres cuentas por segmento de cada neurona. Se decidió analizar las ramas secundarias, y no el eje dendrítico principal, debido a que el segmento proximal de la dendrita apical principal carece de espinas en los primeros 100  $\mu$ m del soma (Megías et al., 2001; presente tesis), y por lo tanto, no se podrían haber hecho comparaciones válidas si el segmento proximal de la dendrita principal habría sido tomado en cuenta. La densidad de espinas dendríticas se calculó como el número de espinas dendríticas dividido por las 25  $\mu$ m de la rama dendrítica que se analizó.

### **VII.11. Análisis estadístico**

*Prueba de evitación inhibitoria.* Debido al corte temporal arbitrario de 600 s que se dio a la prueba de retención, en muchos casos no se presentó una distribución normal en los datos obtenidos, por lo que los resultados de latencias de entrenamiento, escape y retención fueron analizados de manera independiente con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para determinar si los grupos presentaron diferencias significativas entre sí; para detectar entre qué par o pares de grupos se presentaron las diferencias se empleó la prueba de U de Mann-Whitney. La prueba de Wilcoxon se aplicó en los casos donde se comparó la latencia de

adquisición y la latencia de retención dentro del mismo grupo. En todos los casos se aplicó un nivel de significancia  $\leq 0.05$ .

*Prueba de extinción.* Debido a que la medición de la retención fue truncada en 600 s, se utilizó estadística no paramétrica para analizar los resultados conductuales. Se aplicó el análisis de varianza de Kruskal-Wallis para analizar las latencias de adquisición y escape y para las latencias de retención de cada una de las sesiones de extinción. Cuando fue apropiado, la prueba U de Mann-Whitney se utilizó para hacer comparaciones entre pares de grupos.

*Actividad motora.* Los datos de actividad motora horizontal se analizaron con una ANOVA mixto de medidas repetidas en un diseño 3 (droga) x 12 (tiempo), empleando como prueba post-hoc la de Duncan ( $p \leq 0.05$ ).

*Densidad de espinas.* La densidad de espinas en cada uno de los tres segmentos de la dendrita apical fue analizada con ANOVAs independientes de una vía. Esto se hizo debido a que sus diferentes inervaciones (los segmentos proximal, medial y distal reciben fibras comisurales, colaterales de Schaffer y la vía del patrón perforante, respectivamente) indican que estos segmentos no son elementos neuronales homogéneos, sino más bien compartimientos funcionales independientes. Cuando los valores F fueron significativos, se utilizó la prueba de rangos múltiples de Duncan para determinar posibles diferencias significativas por comparación entre pares de muestras ( $p \leq 0.05$ ).

## VIII. RESULTADOS

### VIII. 1. Verificación de la ubicación de las cánulas

Los datos de los resultados conductuales se obtuvieron sólo de los animales cuyo análisis histológico confirmó que las puntas de las cánulas quedaron ubicadas en la región dorsal del HC. En la Figura 8 se presentan fotomicrografías de cortes coronales de cerebros de rata teñidos con la técnica de Nissl que muestran la localización bilateral de cánulas en el hipocampo dorsal. En la Figura 9 se representan las regiones en las que se encontraron las puntas de los inyectores en los diferentes cortes coronales en varios niveles en el eje anteroposterior en relación a Bregma.

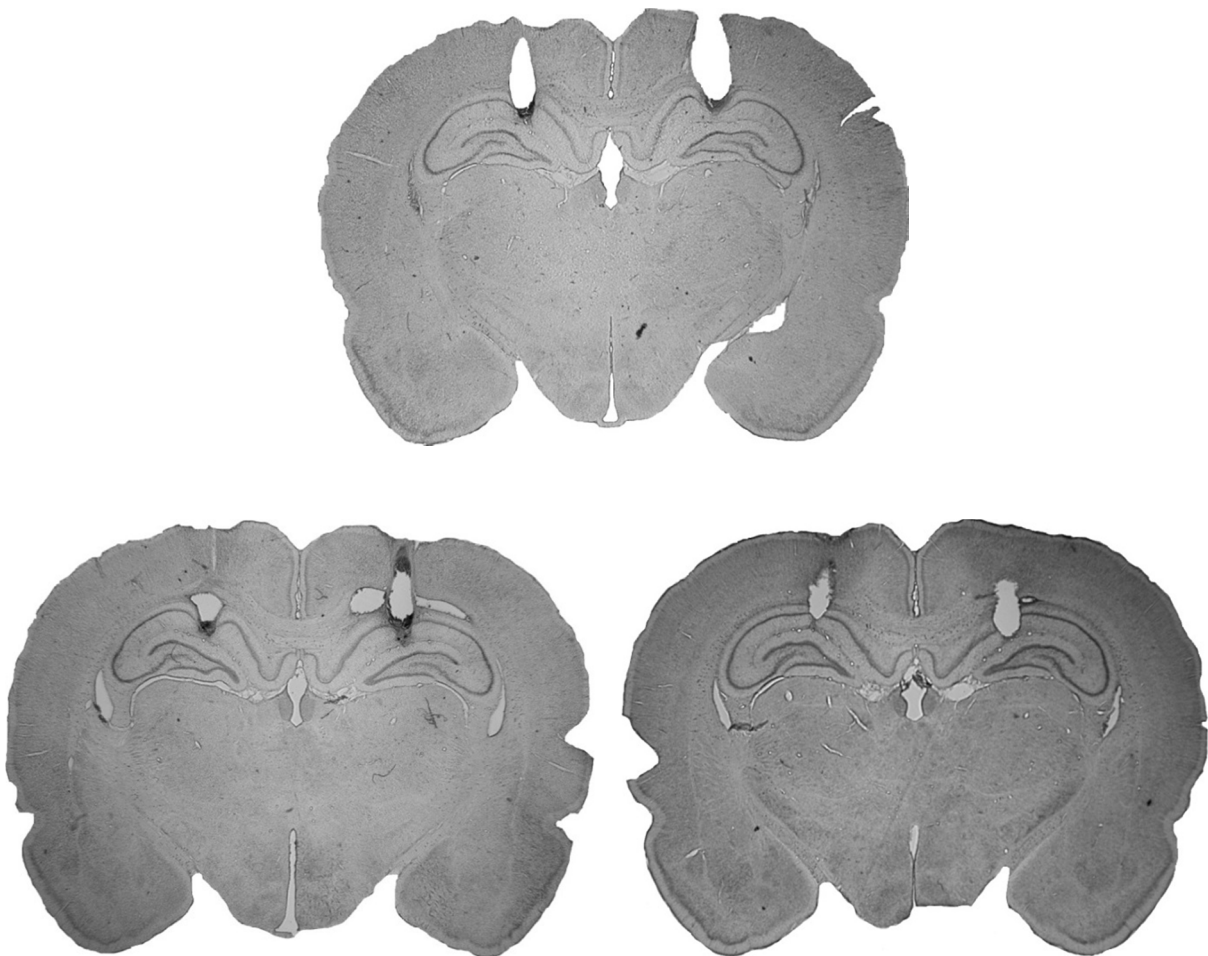


Figura. 8. Las micrografías (1x) fueron tomadas con un microscopio de campo claro (Niko, Eclipse E600, Japón).

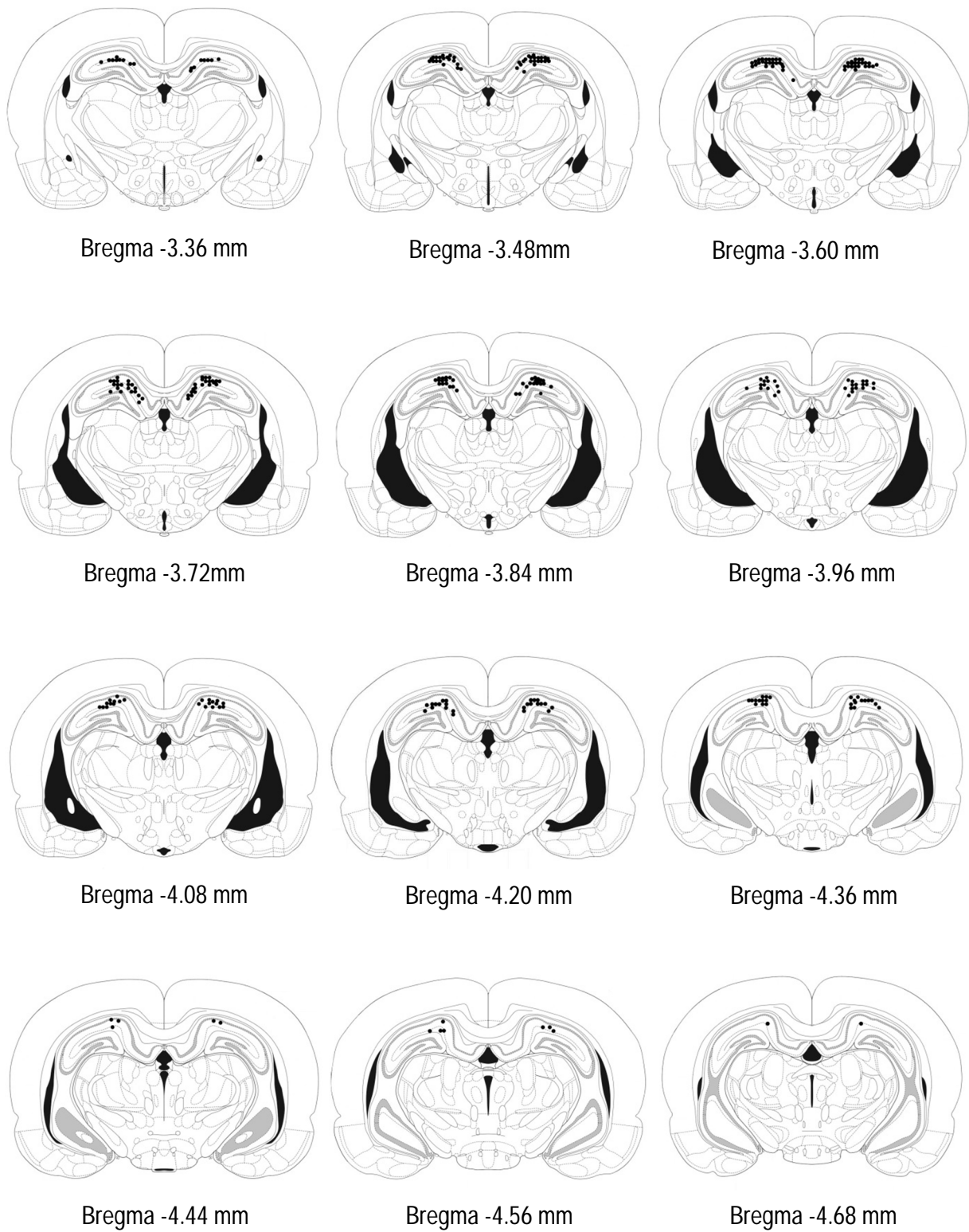


Figura 9. Representación de las regiones del hipocampo dorsal en las que se encontraron las puntas de los inyectores a varios niveles del eje A-P en relación a Bregma (modificado del Atlas de Paxinos y Watson, 2005).

## **VIII. 2. Experimento 1. Definición de reforzamiento alto y bajo a través de las pruebas de extinción**

Este experimento se realizó con el fin de definir de manera operacional y esencialmente en términos de aprendizaje, la intensidad para el bajo, mediano y alto reforzamiento. Si la extinción es definida como la disminución del aprendizaje de las respuestas condicionadas después de la suspensión del estímulo incondicionado o reforzador (Szapiro et al., 2003; Vianna et al., 2003; Dillon et al., 2008), es de esperarse que altos niveles de choque eléctrico se relacionarán con una mayor resistencia a la extinción del aprendizaje de evitación inhibitoria.

### **Tratamientos**

Con la finalidad de encontrar si una relativamente alta intensidad de choque eléctrico produce fuerte resistencia a la extinción en comparación con intensidades bajas de choque eléctrico, animales intactos se distribuyeron al azar en grupos independientes ( $n = 10$ ) y se entrenaron en evitación inhibitoria con una de las siguientes intensidades de choque eléctrico 1.0, 2.0 ó 3.0 mA. A partir de las 24 h después del entrenamiento, se midió la extinción de la tarea por seis días consecutivos. Para este fin, se siguió el mismo procedimiento de entrenamiento, excepto que el choque eléctrico se omitió en las sesiones de extinción; si el animal no cruzó al segundo compartimento dentro de 600 s, un valor de latencia de retención de 600 se asignó y la sesión de dio por terminada. Se incluyó un grupo control que se sometió al mismo procedimiento de entrenamiento, excepto que no se le administró choque eléctrico (0 mA). En el caso de este grupo, una vez que los animales habían cruzado al compartimento oscuro, la puerta se volvió a abrir después de 5 s y si no volvían al compartimento seguro dentro de un período adicional de 5 s, se les empujó suavemente de regreso a él. Veinticuatro horas más tarde, y durante seis días consecutivos, también a este grupo se le midió la latencia para entrar en el compartimento oscuro.

### **Resultados**

La prueba de Kruskal-Wallis reveló que no hubo diferencias significativas entre los grupos con respecto a las latencias de entrenamiento ( $H(3) = 6.354$ ,  $p = 0.096$ ). Ya

que la latencia de "escape" del grupo de 0 mA no estuvo motivada por choques eléctricos, era de esperarse que esta latencia en cada una de las ratas de este grupo fuese mayor que la mediana de las latencias de escape de los grupos que sí recibieron la estimulación aversiva; por esta razón sólo los grupos de 1.0, 2.0 y 3.0 mA fueron incluidos en el análisis de las latencias de escape con la prueba Kruskal-Wallis, que indicó que no había diferencias significativas entre ellos ( $H(2) = 0.467$ ,  $p = 0.792$ ). Las latencias de escape de estos tres grupos fue de 1.8, 2.2 y 2.1 s, respectivamente.

La Figura 10 muestra la retención de la conducta de evitación inhibitoria de los grupos durante los 6 días de extinción. Un claro patrón diferencial de resistencia a la extinción fue producido por las diferentes intensidades de choque eléctrico que se aplicaron durante el entrenamiento. La prueba de Kruskal-Wallis reveló que hubo amplias diferencias significativas entre los grupos en cada una de las seis sesiones de extinción ( $p$ 's  $< 0.001$  para cada sesión). Como se había anticipado, la mediana de los valores de las latencias del grupo 0 mA fueron muy bajas, siempre menores de 15 s, y difirieron de la de los otros grupos en cada una de las sesiones ( $p$ 's de 0.05 a 0.0001). En el otro extremo, el grupo de 3.0 mA mostró una ejecución casi perfecta durante las primeras 5 sesiones de extinción, y una calificación muy alta en la sexta sesión, muy por arriba de los otros grupos. Excepto por la primera sesión, en la que su latencia de retención no difirió de la del grupo de 2.0 mA, el grupo de 3.0 mA mostró retenciones significativamente mayores que la de los demás grupos en las seis sesiones ( $p$ 's entre 0.01 y 0.0001). La retención del grupo 2.0 mA fue significativamente mayor que la del grupo 1.0 mA a lo largo de las primeras cinco sesiones ( $p$ 's entre 0.05 y 0.01), y en la sexta sesión las ejecuciones de estos grupos fueron muy similares ( $p = 0.684$ ).

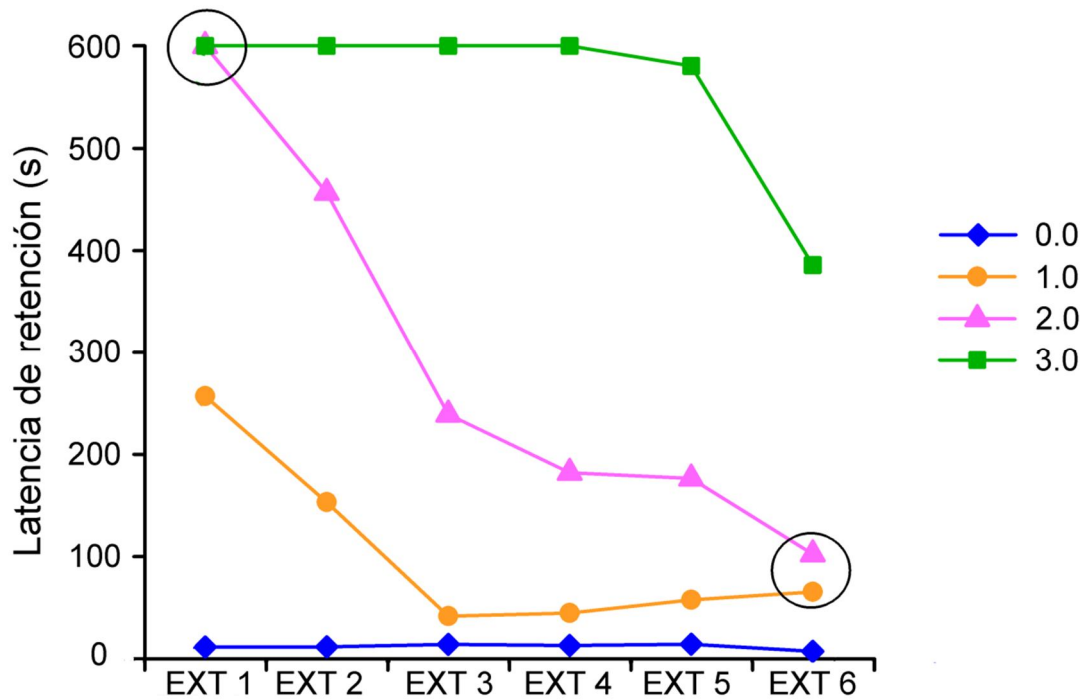


Figura 10. Mediana de las latencias de retención a través de las sesiones diarias de extinción (EXT1-EXT6) desplegadas por los grupos que habían sido entrenados en evitación inhibitoria con 1.0, 2.0 ó 3.0 mA. También se muestra la latencia para pasar a través de los compartimientos de la cámara del grupo de 0.0 mA (control) el cual fue sujeto al mismo procedimiento de entrenamiento, sólo que el choque eléctrico no se administró. En cada sesión de extinción las retenciones de cada grupo difieren significativamente de los valores de latencia de los otros grupos, excepto para los dos puntos dentro de los círculos abiertos.



### **VIII.3. Experimento 2. Efecto protector del sobrerreforzamiento**

Una vez determinadas las intensidades para el alto y bajo reforzamiento, este experimento se planteó con la finalidad de determinar si la aplicación de un choque eléctrico de intensidad relativamente alta produce el efecto protector contra la amnesia al bloquear temporalmente la actividad neuronal del HC dorsal. Las intensidades del choque eléctrico que se utilizaron durante el entrenamiento de evitación inhibitoria fueron de 1.0, 2.0 y 3.0 mA.

#### **Tratamientos**

Después de ocho días de recuperación de la cirugía, los animales fueron distribuidos al azar en grupos independientes para recibir una inyección de 1  $\mu$ L/hemisferio de solución salina (VEH) ó 10 ng/ $\mu$ L/hemisferio de tetrodotoxina (TTX, Sigma, T8024) a través de las cánulas implantadas en el HC dorsal. Los grupos se identificaron como VEH1.0, TTX1.0, VEH2.0, TTX2.0, VEH3.0 y TTX3.0 ya que 30 min después de administrada VEH o TTX los sujetos se entrenaron en evitación inhibitoria con una de las intensidades de choque seleccionadas del experimento anterior (1.0, 2.0 ó 3.0 mA). La retención de cada grupo fue evaluada a las 48 h.

#### **Resultados**

No se encontraron diferencias significativas en las latencias de entrenamiento entre los grupos tratados con el vehículo ( $H(3) = 6.32, p > 0.05$ ), ni entre los grupos TTX ( $H(3) = 3.03, p > 0.05$ ). Estos resultados se muestran en la Figura 11A. En el caso de las latencias de escape, aparecieron diferencias altamente significativas, tanto en los grupos tratados con TTX como en los tratados con el vehículo ( $H(3) = 19.54, p < 0.0005$ , y  $H(3) = 25.48, p < 0.00001$ , respectivamente). Con respecto a los grupos de VEH, la prueba post-hoc U de Mann-Whitney demostró que el grupo 0.0 mA tuvo latencias de escape significativamente mayores que cada uno de los otros grupos (valores de p entre 0.001 y 0.0005), mientras que las latencias de escape no difirieron entre los grupos que recibieron choque eléctrico. Un panorama similar surgió cuando se hicieron comparaciones entre pares de grupos tratados con TTX: el grupo 0.0 mA tuvo latencias más altas que el resto de los grupos ( $p < 0.0005$  en cada

comparación), mientras que no se encontraron diferencias significativas entre los grupos que recibieron choque eléctrico (Figura 11B).

Como se muestra en la Figura 11C, se encontraron diferencias altamente significativas cuando se compararon los puntajes de retención entre los grupos VEH ( $H(3) = 25.92, p < 0.0001$ ). Las pruebas U revelaron que hubo diferencias significativas entre el grupo 0 mA y el resto de los grupos ( $p < 0.001$  en cada comparación); los grupos de 1.0 y 3.0 mA también difirieron entre sí ( $p < 0.005$ ).

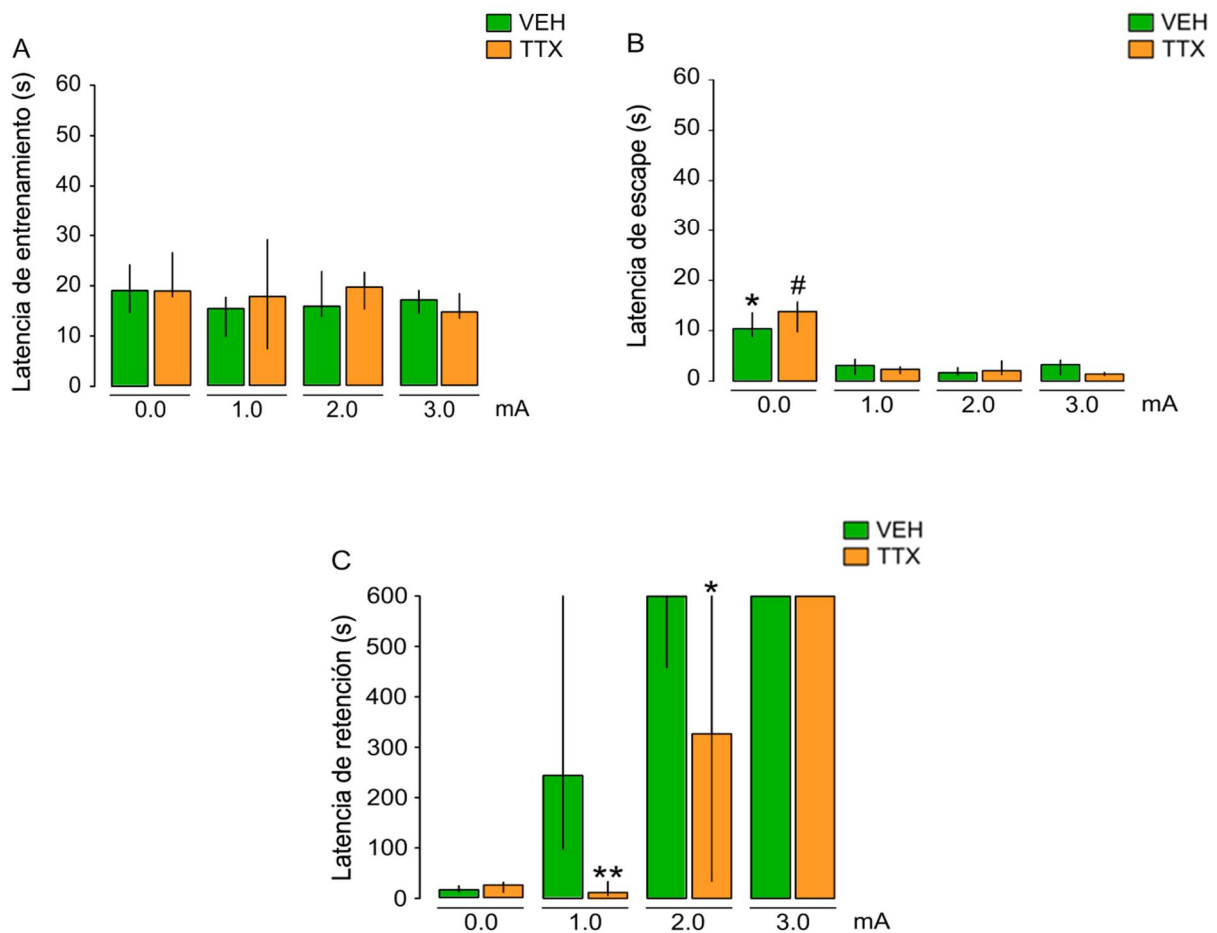


Figura 11. Mediana de los valores de latencia ( $\pm$  rango intercuartilar) de grupos de ratas inyectadas, 30 min antes del entrenamiento, con vehículo (VEH) o terodotoxina (TTX) en el hipocampo dorsal. (A) Los grupos VEH y TTX tuvieron latencias de entrenamiento similares, independientemente de la intensidad del choque administrado. (B) Latencias de escape: \*  $p < 0.001$  vs. los grupos VEH de 1.0, 2.0 y 3.0 mA; #  $p < 0.001$  vs. los grupos TTX de 1.0, 2.0 y 3.0 mA. (C) Latencias de retención: \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.001$  con respecto a su grupo control.

También se encontraron diferencias significativas durante la prueba de retención (Figura 11C), entre los grupos que fueron tratados con TTX ( $H(3) = 25.4$ ,  $p < 0.0001$ ); las pruebas U indicaron que los grupos 0 y 1.0 mA tuvieron latencias significativamente menores que las de los grupos 2.0 y 3.0 mA ( $p < 0.001$  en cada comparación), y que estos dos grupos también difirieron entre ellos ( $p < 0.05$ ). Comparaciones pareadas simples (prueba de U) mostraron que con respecto a sus correspondientes controles VEH, tanto el grupo de TTX1.0 y TTX2.0 mA mostraron significativo deterioro de la retención ( $p < 0.0005$  y  $0.05$ , respectivamente), mientras que los grupos de TTX0.0 y TTX3.0 mA no difirieron de sus respectivos grupos control.

#### **VIII.4. Experimento 3. Dependencia de estado**

Existe evidencia experimental que indica que los efectos farmacológicos producidos por una variedad de drogas pueden actuar como un estímulo condicionado intrínseco necesario para la ejecución de una respuesta condicionada. Así, la memoria adquirida bajo la influencia de una droga puede ser recordada en el mismo estado pero no en un estado diferente (Overton, 1964, 1966); por tal motivo, este experimento se diseñó con la finalidad de detectar si el efecto observado con la administración de TTX está ligado a un fenómeno de dependencia estado.

##### **Tratamientos**

Cuatro grupos independientes de animales implantados con cánulas recibieron los siguientes tratamientos bilaterales: dos grupos recibieron 1  $\mu$ L de SAL y los otros dos 10 ng/ $\mu$ L de TTX y treinta min después fueron entrenados en evitación inhibitoria aplicando un choque de 1.0 mA. La retención de los 4 grupos fue evaluada a las 48 h sólo que dos grupos volvieron a recibir el tratamiento original (SAL o TTX) 30 min antes de la prueba de retención; los dos grupos restantes no recibieron tratamiento adicional alguno.

##### **Resultados**

Debido a que en el Experimento 2, la TTX se administró antes del entrenamiento y la retención fue de medida 48 h después, se podría argumentar que los efectos de deterioro sobre la ejecución fueron debidos a un efecto dependiente del estado y no a la perturbación de TTX sobre los procesos de aprendizaje o memoria. Por lo tanto, en el Experimento 3 se investigaron los efectos de la microinyección de TTX antes del entrenamiento y antes de la prueba de la retención habiéndose administrado un choque eléctrico de 1.0 mA durante el entrenamiento; los resultados indican que los déficits observados no son debidos a dependencia de estado.

Al igual que en los experimentos anteriores, la prueba de Kruskal-Wallis no detectó diferencias estadísticas significativas en las latencias de entrenamiento ( $p = 0.97$ ) ni en las de escape ( $p = 0.08$ ), pero los efectos del tratamiento llegaron a ser

significativos en la sesión de retención ( $H(3) = 27.7, p = 0.0001$ ). La prueba U de Mann Whitney mostró que la retención fue significativamente deteriorada en el grupo que ejecutó el entrenamiento y la prueba bajo el efecto de TTX, así como el grupo que sólo recibió TTX antes del entrenamiento. Los resultados se muestran en la Figura 12.

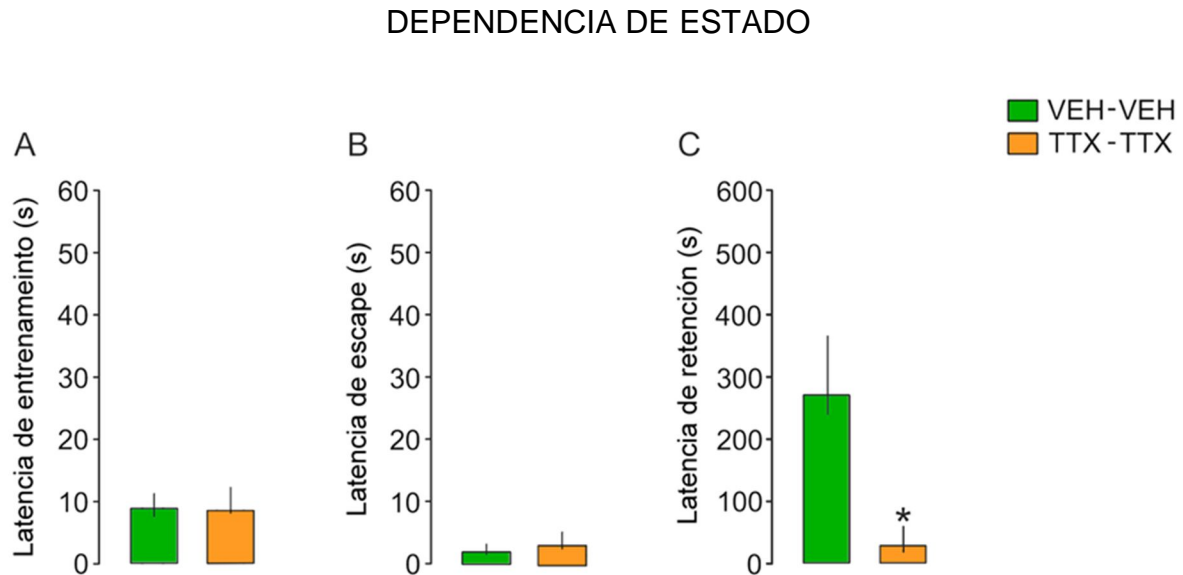


Figura 12. Mediana de los valores de latencias de entrenamiento, escape y retención ( $\pm$  rango intercuartilar) de grupos de ratas entrenadas en evitación inhibitoria de un esnasyo con 1.0 mA e inyectadas 30 min antes del entrenamiento y 30 min antes de la prueba de retención, ya sea con solución salina isotónica vehículo (VEH-VEH) o tetrodotoxina (TTX-TTX) en el hipocampo dorsal. No hubo diferencias significativas en las latencias entrenamiento (A) o en las latencias de escape (B) entre los grupos VEH y TTX. En contraste, TTX produjo un deterioro significativo de la retención lo que indica que la ejecución pobre no fue debida a dependencia del estado (C). \*  $p < 0.005$  con respecto al grupo control VEH.

#### **VIII.5. Experimento 4. Evaluación de las memorias de corto y largo plazo**

Los experimentos anteriores de este estudio indicaron claramente que la administración intrahipocámpica de TTX antes del entrenamiento produjo un deterioro de la retención que no fue debido a dependencia del estado y que el entrenamiento con una relativamente fuerte estimulación aversiva protegió a la memoria contra el típico efecto amnésico de TTX. Debido a que los animales se encontraban bajo el efecto de TTX cuando se sometieron al entrenamiento, y por lo tanto su HC se encontraba inactivo, el deterioro que se observó en la retención evaluada a las 48 h pudiera atribuirse a la incapacidad de los sujetos para adquirir o aprender la tarea (de tal modo que sin la adquisición no habría evocación), y no necesariamente atribuirse a una deficiencia en la consolidación de la memoria. La información generada con este experimento permitiría establecer si el efecto amnésico de TTX ha sido producido por la interferencia con la adquisición o la consolidación de la IA. Si la administración de TTX antes del entrenamiento impide la adquisición (aprendizaje), entonces los animales no mostrarán retención alguna cuando se prueben poco después del entrenamiento. Pero, si estos animales despliegan una buena retención poco después del entrenamiento, y llegan a estar amnésicos cuando se prueban tiempo después del entrenamiento, entonces se podría concluir que TTX deteriora el proceso de consolidación.

#### **Tratamientos**

Dos grupos de animales recibieron 1  $\mu$ L de VEH o 10 ng/kg de TTX en el hipocampo dorsal 30 min antes del entrenamiento de evitación inhibitoria con 1.0 mA. Para probar si TTX había producido su efecto amnésico al interferir con el aprendizaje, una primera prueba de retención se realizó 30 min después del entrenamiento (memoria de corto plazo); y para probar si el efecto amnésico había interferido con la consolidación, una segunda prueba se realizó 48 h después del entrenamiento (memoria de largo plazo).

#### **Resultados**

Las pruebas U de Mann-Whitney demostraron que no hubo diferencias significativas entre los grupos VEH y TTX en las latencias de entrenamiento ( $p >$

0.27) ni en las latencias de escape ( $p > 0.88$ ), confirmando nuevamente que la inactivación previa del HC por la administración de TTX no modificó la capacidad de los animales para responder ante un ambiente novedoso ni su reactividad ante el choque eléctrico. Tampoco se presentaron diferencias estadísticas significativas en la retención a los 30 min ( $p > 0.7$ ) alcanzando VEH y TTX una óptima ejecución de 600 s. En contraste, a las 48 h después del entrenamiento, un deterioro significativo de la retención fue evidente en el grupo de TTX ( $p < 0.001$  con respecto al grupo VEH), tal como se muestra en la Figura 13.

### MEMORIA DE CORTO Y LARGO PLAZO

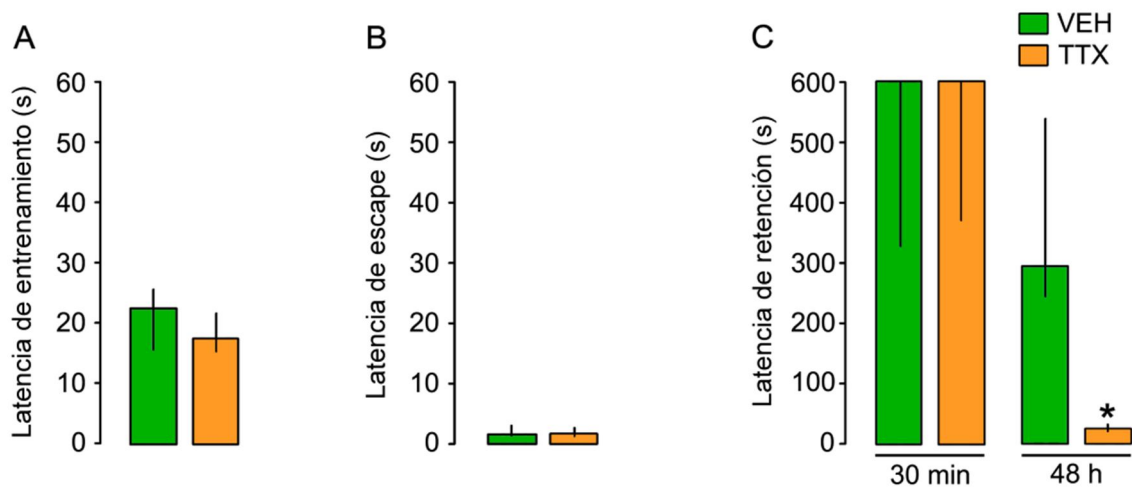


Figura 13. Mediana de los valores de latencias de entrenamiento, escape y retención ( $\pm$  rango intercuartil) de grupos de ratas entrenadas en evitación inhibitoria de un ensayo, con 1.0 mA e inyectadas 30 minutos antes del entrenamiento, ya sea con solución isotónica vehículo (VEH) o TTX en el hipocampo dorsal. No hubo diferencias significativas en las latencias de entrenamiento (A) ni en las latencias de escape (B) entre los grupo VEH y TTX. La retención se midió a los 30 min y 48 h después del entrenamiento. TTX no produjo deficiencia de la memoria de corto plazo (probada a los 30 min), pero la memoria de largo plazo (probada a las 48 h) fue significativamente afectada (C). \*  $p < 0,001$  con respecto al grupo control VEH.

### **VIII.6 Experimento 5. Efecto de TTX sobre la actividad motora horizontal y la habituación**

Los análisis estadísticos indicaron que las latencias de entrenamiento y las latencias de escape en los tres experimentos anteriores no fueron diferentes entre los distintos grupos control y experimentales. Esto fue tomado como un signo de actividad perceptiva y motora normal necesaria para aprender la tarea de evitación inhibitoria, independientemente de los deterioros cognitivos producidos por TTX. Sin embargo, se investigó la memoria a corto plazo (Experimento 4) a los 30 min después del entrenamiento, (es decir, 60 min después de la administración de TTX) cuando los animales estaban todavía bajo la influencia de TTX. Así, la latencia de retención alta podría no haber reflejado necesariamente buena memoria de corto plazo, sino un signo de acinesia, es decir, una falla para iniciar un movimiento cuando éste se requiere.

Debido a que la droga neurotóxica se administró antes del entrenamiento de IA, también fue posible que los deterioros en la retención producidos por TTX observados 48 h después del entrenamiento podrían haber sido debidos a una interferencia proactiva con la ejecución de la retención, y no a una interferencia con los procesos de memoria. Este experimento tuvo dos propósitos: (a) determinar los efectos de TTX sobre la actividad motora espontánea en los intervalos de tiempo que comprenden aquellos utilizados para medir las latencias de entrenamiento y de escape, así como las medidas a los 30 min y 48 h después del entrenamiento en los tres primeros experimentos, y (b) evaluar el efecto del bloqueo del hipocampo en la habituación motora, un tipo relativamente sencillo de aprendizaje.

#### **Tratamientos**

La actividad motora horizontal espontánea se registró en tres grupos de ratas: intactas (no implantadas) y microinyectadas en el HC dorsal con 1  $\mu$ L de solución salina isotónica VEH ó 10 ng/ $\mu$ L de TTX. Treinta minutos después de la microinyección la actividad motora horizontal se midió durante una hora en intervalos de 5 min. Cuarenta y ocho horas más tarde, esta actividad fue registrada de nuevo (sin microinyecciones).



## Resultados

En la Figura 14, la ordenada representa el valor medio del número de interrupciones a las fotoceldas en función de cada uno de los intervalos de tiempo en los que se registró la actividad motora espontánea de los sujetos. Se observa que durante el primer día de registro los tres grupos de animales desplegaron valores de actividad similares, siendo altos al comienzo de la sesión y fueron disminuyendo progresivamente, hasta llegar prácticamente a cero al final de la sesión, 1 h más tarde.

### ACTIVIDAD MOTORA HORIZONTAL Y HABITUACIÓN

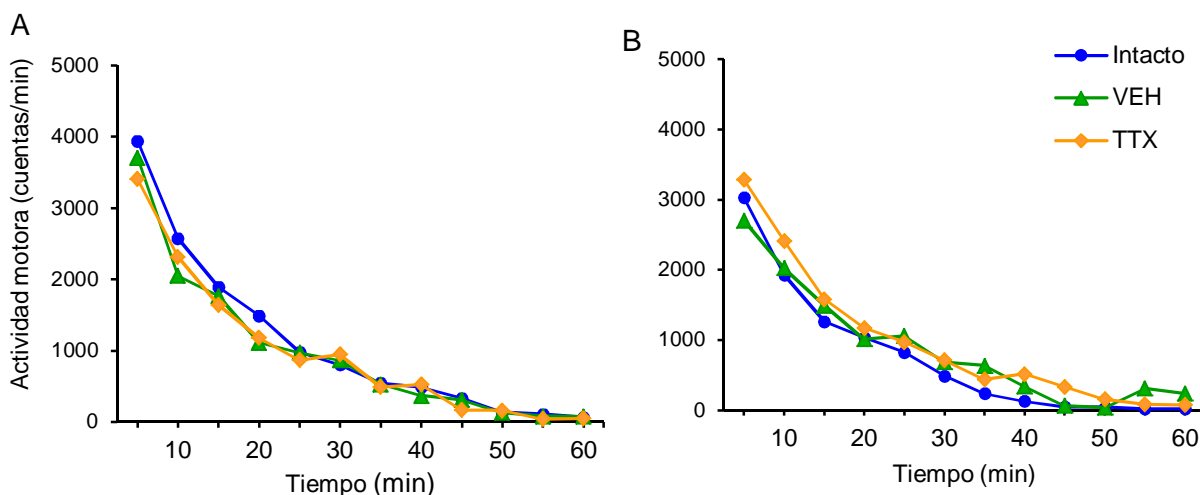


Figura 14. Media del número de interrupciones a las fotoceldas que se registró en intervalos de 5 min en una sesión de 60 min a un grupo de ratas intactas y 30 minutos después de infundir a otros dos grupos TTX o solución salina isotónica (VEH) en el hipocampo dorsal (A). Una segunda sesión se programó 48 h más tarde (B). No hubo diferencias significativas entre los grupos por efecto de los tratamientos y las diferencias debidas al factor tiempo revelan la habituación de los sujetos.

Al analizar de manera independiente los datos de actividad motora horizontal, el ANOVA de medidas repetidas (tiempo x tratamiento) reveló un efecto significativo para el intervalo de tiempo ( $F(11, 242) = 190.81, p < 0.0005$ ), mientras que el tratamiento ( $F(2, 22) = 0.69, p > 0.50$ ) y la interacción ( $F(22, 242) = 0.79, p > 0.75$ ) no produjeron efectos significativos. Lo mismo ocurrió cuando la actividad motora se midió 48 horas después; encontrándose un efecto significativo para el intervalo de tiempo ( $F(11, 242) = 138.94, p < 0.0005$ ), mientras que el tratamiento ( $F(2, 22) =$

0.96,  $p > 0.40$ ) y la interacción ( $F(22, 242) = 1.03$ ,  $p > 0.43$ ) no produjeron efectos significativos. El análisis muestra que la TTX intrahipocámpica no produjo alteraciones motoras en los momentos en los que las latencias de entrenamiento, escape y retención (a los 30 min y a las 48 h) de los experimentos 2 y 3 se midieron e hizo evidente que conforme transcurrió el tiempo los animales se fueron habituando a la cámara.

**Los resultados de los experimentos 2, 3 4 y 5 ya fueron publicados por la revista *Hippocampus*; en la sección XIII. ANEXOS se presenta copia del artículo.**

### **VIII.7. Experimento 6. Número de espinas en las neuronas piramidales del CA1 del hipocampo y su relación con la magnitud del choque eléctrico**

Este experimento se diseñó con la finalidad de determinar si la extinción después del entrenamiento incrementado de evitación inhibitoria induce cambios en la densidad de espinas en el hipocampo, en comparación con el entrenamiento regular.

#### **Tratamientos**

Ya que en el Experimento 1 se evaluó la extinción de la conducta de evitación inhibitoria en animales entrenados con diferente intensidad de choque eléctrico (1.0, 2.0 ó 3.0 mA), los cerebros de cuatro animales, seleccionados al azar, de cada uno de estos grupos se utilizaron para analizar la densidad de las espinas dendríticas en el campo CA1 del hipocampo. Se añadieron otros dos grupos control: uno de ellos fue sujeto al mismo procedimiento de entrenamiento, excepto que el choque eléctrico no se administró (0 mA grupo, n = 3), por lo que una vez que los animales habían cruzado al compartimiento oscuro de la cámara, la puerta se abrió de nuevo después de 5 s, y si no volvían al compartimiento seguro dentro de 5 s adicionales, se les empujó suavemente de regreso a él. Veinticuatro horas más tarde, y durante seis días consecutivos, la latencia para entrar al compartimiento oscuro también se midió. Los animales del segundo grupo control (n = 3) fueron mantenidos bajo idénticas condiciones de vida a las de aquellos animales utilizados para el estudio conductual, pero estos nunca abandonaron el bioterio, excepto para el sacrificio (grupo Bio).

Inmediatamente después de la sexta prueba de extinción los animales seleccionados que habían sido entrenados (1.0, 2.0, 3.0 mA), junto con aquellos grupos de 0 mA y Bio, fueron anestesiados con xilazina/ketamina y perfundidos transcárdialmente con una solución tampón de formalina al 10% (pH 7.4). Después de 24 h los cerebros fueron extraídos, y un bloque de 4 mm, conteniendo el hipocampo dorsal (Bregma – 2.8 a – 4.2; Paxinos y Watson 2005) se obtuvo de cada animal. Cada bloque de hipocampo fue impregnado usando la técnica de Golgi rápido modificado por Díaz-Cintra et al. (1981). La técnica de impregnación con Golgi rápido y el análisis morfométrico para determinar la densidad de espinas se describen con más detalle en el apartado de Materiales y Métodos. El análisis estadístico de la densidad de espinas

en cada uno de los tres segmentos de la dendrita apical se hizo con ANOVAs independientes de una vía. Esto se hizo así porque sus diferentes inervaciones (segmentos proximal, medial y distal reciben fibras comisurales, colaterales de Schaffer y vía perforante, respectivamente) indican que estos segmentos no son elementos neuronales homogéneos, sino más bien, compartimientos funciones independientes. Cuando se presentaron diferencias significativas, se usó la prueba post-hoc de Duncan.

### **Resultados**

La Figura 15 muestra una neurona piramidal con tinción de Golgi, y una ampliación de los segmentos distal, medial y proximal donde se contaron el número de espinas a lo largo de 25  $\mu$ m. El análisis estadístico reveló que hubo diferencias altamente significativas en la densidad de espinas entre los grupos en los segmentos proximal ( $F(4, 266) = 9.635, p = 0.0001$ ), medial ( $F(4, 266) = 26.978, p = 0.0001$ ), y distal ( $F(4, 266) = 20.245, p = 0.0001$ ). La Prueba de Rango Múltiple de Duncan mostró que no hubo diferencias significativas en la densidad de espinas entre los grupos Bio y 0 mA en ninguno de los segmentos (Figura 16). En cuanto al segmento proximal, la densidad de espinas de los grupos Bio y 0 mA fue significativamente mayor que la de los grupos 1.0, 2.0, y 3.0 mA; la densidad de espinas no fue significativamente diferente entre los tres últimos grupos. En el segmento medial, los grupos Bio y 0 mA también tuvieron una densidad de espinas mayor que la de los grupos 1.0, 2.0, y 3.0 mA; a su vez, el grupo 3.0 mA mostró una mayor densidad de espinas que los grupos 1.0 y 2.0 mA. Por último, en el segmento distal, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos Bio, 0 mA y 3.0 mA, mientras que cada uno de estos grupos difirió significativamente de los grupos 1.0 y 2.0 mA.

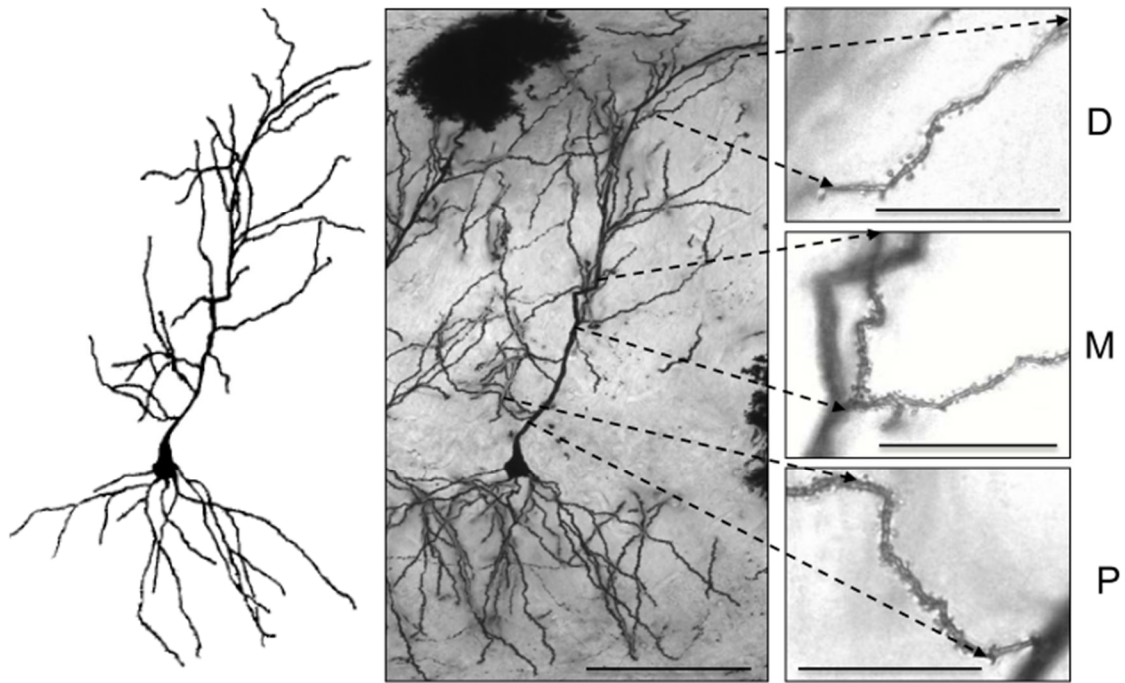


Figura 15. Ejemplo representativo de células piramidales de CA1 teñidas con la técnica de impregnación rápida de Golgi (figura central), y un dibujo de la misma en cámara lúcida (figura de la izquierda). En el lado derecho los insertos muestran imágenes ampliadas de los segmentos distal (D), medial (M) y proximal (P) de la dendrita apical. Las espinas dendríticas pudieron ser vistas fácilmente en cada imagen, con examen en diferentes planos focales. Las barras de escala: figura intermedia = 100  $\mu\text{m}$ ; insertos = 25  $\mu\text{m}$ .

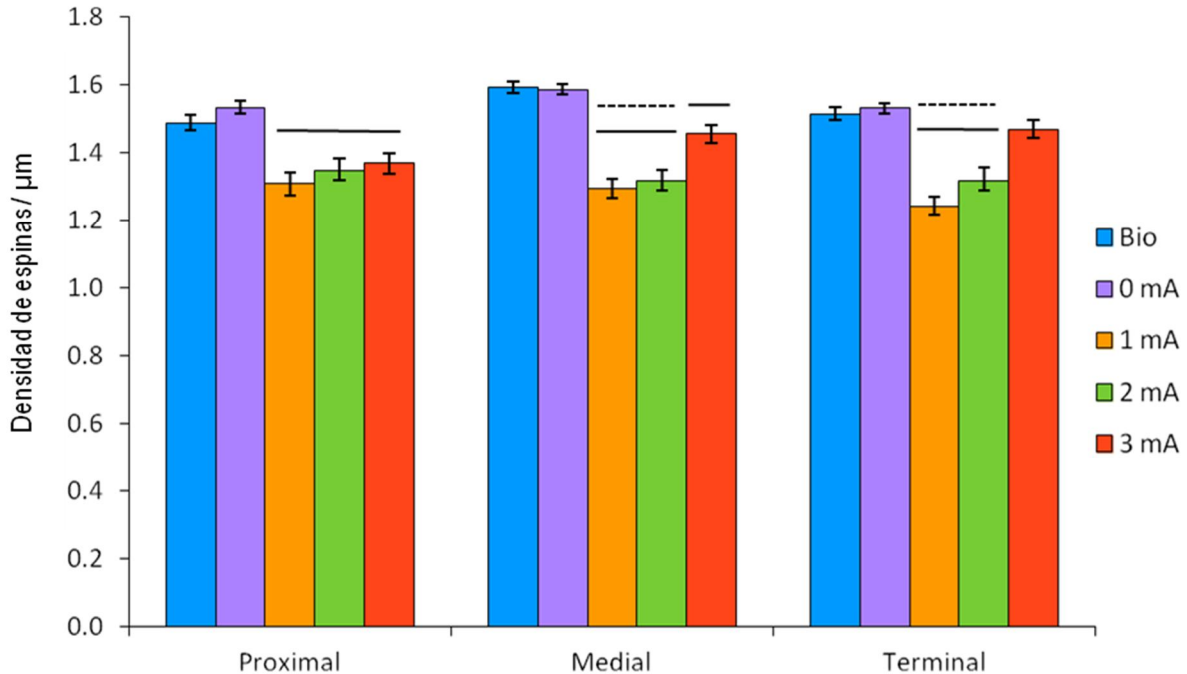


Figura 16. Media de los valores de densidad de espinas por micrómetro en cada uno de los tres segmentos de la dendrita apical del CA1, encontradas después de las seis sesiones de extinción de animales entrenados en evitación inhibitoria con 0, 1.0, 2.0, ó 3.0 mA y de un grupo de control que nunca abandonó el bioterio, excepto para el sacrificio (Bio). Las líneas continuas sobre las barras representan diferencias significativas ( $p < 0.001$ ) en comparación con los grupos Bio y 0 mA; las líneas discontinuas sobre las barras representan diferencias significativas ( $p < 0.001$ ) en comparación con el grupo de 3.0 mA.

El porcentaje de cambio en la densidad de espinas, con respecto al grupo control Bio se representa en la Figura 17. Se puede ver claramente la poda de espinas en los tres segmentos de la dendrita apical del CA1 de todos los grupos entrenados, excepto que el grupo de alto choque mantuvo una densidad de espinas normal en el segmento distal.

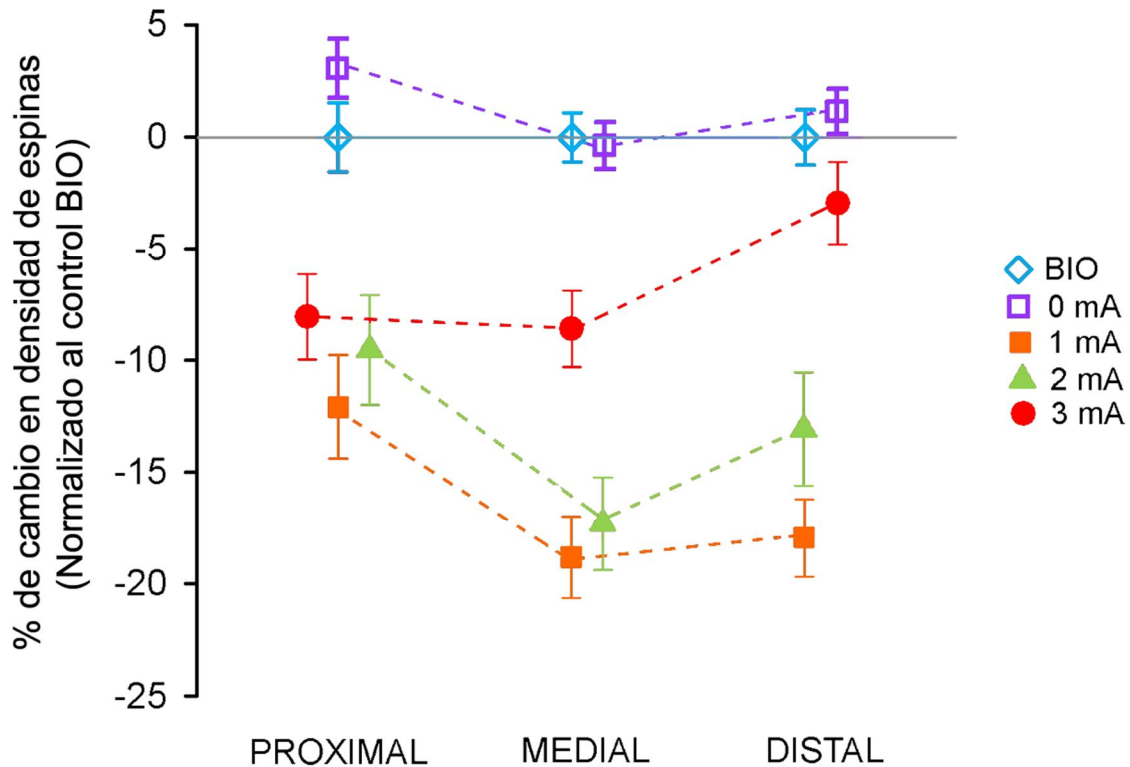


Figura 17. Efecto de la intensidad del entrenamiento de evitación inhibitoria sobre el porcentaje de cambio en la densidad de espinas encontrado después de seis sesiones de extinción, normalizados con el grupo control Bio, en cada uno de los tres segmentos de las dendritas apicales de las neuronas CA1 del hipocampo dorsal de la rata.

Los resultados del experimento 1 y de este experimento 6 ya fueron publicados por la revista *Frontiers in Behavioral Neuroscience*; en la sección XIII. ANEXOS se presenta copia del artículo.

## IX DISCUSIÓN GENERAL

En esta sección presentaremos la discusión de cada uno de los experimentos que constituyen esta tesis.

### ***Experimento 1. Definición de reforzamiento alto y bajo a través de las pruebas de extinción***

El hecho de que las latencias de entrenamiento y las de escape no fueran diferentes entre los grupos, muestra que todos los animales se comportaron de manera homogénea durante el entrenamiento. Los resultados de retención evidencian que conforme la intensidad de choque eléctrico se incrementó en el entrenamiento de evitación inhibitoria, se produjo también un incremento en las latencias de retención, ya que los grupos entrenados con 2.0 y 3.0 mA mostraron una ejecución óptima en la primera sesión de extinción.

En la literatura se señala que la magnitud del reforzamiento es uno de los parámetros que controlan la ejecución de los sujetos en la situación de aprendizaje, este parámetro abarca dos propiedades diferentes de los reforzadores, su cantidad y su calidad. La cantidad del reforzamiento puede especificarse fácilmente por medio de alguna medida física, como el peso, la concentración o el volumen. La calidad del reforzamiento puede especificarse por las preferencias del organismo hacia un reforzador respecto de otros. Al manipular estos parámetros del reforzamiento en una serie de experimentos, se llegó a la conclusión de que, con magnitudes crecientes de reforzamiento, la ejecución en el aprendizaje aumenta. Entre las investigaciones que proporcionaron esta conclusión están las de Gantt, descritas por Hull (1943), Crespi (1942), Hutt (1954) y Zeaman (1949) para la cantidad del reforzamiento, y las de Guttman (1953) y Hutt (1954) para la cualidad del reforzamiento (todas ellas citadas en Kimble, 1985).

Los resultados de este experimento son consistentes con la evidencia de que se dispone sobre los efectos de la magnitud del reforzamiento negativo, intensidades en aumento producen magnitudes de condicionamiento en aumento (Boren, Sidman y Herrnstein, 1959; Passey, 1948; Prokasy, Grant y Myers, 1958 en



Kimble, 1985) y existen algunas pruebas de que la función es asintótica al sobrepasar cierto valor de intensidad.

Específicamente, en el paradigma de evitación inhibitoria, donde los animales reciben un choque eléctrico en las patas, el deterioro de la memoria por aplicación de tratamientos amnésicos después del entrenamiento, depende de la intensidad de choque empleada durante el entrenamiento. Se ha observado que el gradiente de amnesia retrógrada producida por algunos tratamientos amnésicos está inversamente relacionado con la intensidad del choque empleado durante el entrenamiento (Bucherelli y Tassoni, 1992; Bucherelli, Tassoni y Bures, 1992; Parent y McGaugh, 1994; Quatermain y McEwen, 1970).

En el laboratorio, resultados experimentales con el procedimiento de evitación inhibitoria han permitido definir que las intensidades de choque para el *bajo reforzamiento* son aquellas mínimas que llevan a que el animal aprenda la tarea, es decir, con estas intensidades los animales presentan diferencias significativas entre sus valores de adquisición y retención; mientras que la intensidad del *sobrerreforzamiento* corresponderá a aquella que ocasiona que los animales no sólo aprendan sino que alcancen valores de resistencia a la extinción significativamente mayores a los de los sujetos que se entrenaron con una intensidad que corresponde al bajo reforzamiento.

Los resultados del presente experimento confirman lo anterior y nos permiten señalar que el grupo entrenado con 3.0 mA presentó mayor resistencia a la extinción a lo largo de los seis días en los que se evaluó la retención de la tarea sin la aplicación del choque eléctrico y son consistentes con la premisa que considera que la intensidad del estímulo aversivo tiene un efecto sobre la fuerza de la respuesta condicionada, es decir, que las diferencias en la fortaleza del aprendizaje deben poder manifestarse durante una prueba de resistencia a la extinción. Es de esperarse que los grupos de ratas que hayan aprendido (y consolidado) mejor la tarea, presenten una mayor resistencia a la extinción, es decir, que tarden más tiempo en presentar una reducción significativa en la latencia de retención. Ambroggi Lorenzini et al. (1993) investigaron la relación entre la intensidad del estímulo

incondicionado (choque eléctrico) y el gradiente de consolidación de respuestas de evitación inhibitoria a través del procedimiento de extinción forzada. Por medio de este paradigma puramente conductual diseñado para investigar el trazo específico de memoria de evitación inhibitoria, se confirmó que el fortalecimiento del condicionamiento de evitación inhibitoria está positivamente relacionado con la intensidad del estímulo incondicionado. Otros estudios también han demostrado que existe una relación directa entre la fuerza de la consolidación y la intensidad de choque eléctrico (Giordano y Prado-Alcalá, 1986; Pérez-Ruiz y Prado-Alcalá, 1989; Prado-Alcalá et al., 1994; Quiroz et al., 2003).

El objetivo de definir de manera operacional la intensidad para el bajo, mediano y alto reforzamiento fue cubierto con este experimento.

### ***Experimento 2. Efecto protector del sobrerreforzamiento***

La ausencia de diferencias significativas en la latencia de entrenamiento y de escape entre los grupos TTX con respecto a los grupos VEH, refleja que la inactivación del HC con la administración de TTX antes del entrenamiento, no interfirió con estas respuestas. En consecuencia, todos los sujetos desplegaron actividad motora semejante durante el entrenamiento y mostraron la misma capacidad de respuesta al ser expuestos a la cámara y para responder ante el choque eléctrico. Por lo tanto las diferencias observadas en la retención no pueden ser atribuidas a acciones de la TTX sobre los procesos puramente sensoriales o motores.

En la Figura 11 se observa que todos los grupos de animales que fueron inyectados con solución salina isotónica VEH presentaron diferencias significativas entre sus latencias de entrenamiento y retención, es decir estos animales modificaron su respuesta inicial (latencias de entrenamiento bajas) después de la experiencia aversiva (latencias de retención altas); esto indica que cualquiera de las tres intensidades de choque (1.0, 2.0 ó 3.0 mA) aplicadas a los sujetos que recibieron VEH antes del entrenamiento, les permitieron, aprender a evitar el choque eléctrico. Por lo que respecta a los animales que recibieron TTX, se observa

que los sujetos que tenían inactivo el HC dorsal por la administración de TTX y fueron entrenados con una intensidad de choque baja (1.0 mA), fueron incapaces de recordar la experiencia aversiva recibida durante el entrenamiento; es decir, presentaron un deterioro en la memoria de la respuesta de evitación. Sin embargo, este deterioro dejó de presentarse conforme la intensidad de choque se incrementó (los grupos de 2.0 y 3.0 mA ejecutaron bien la respuesta de evitación en la sesión de prueba).

El grupo de animales que recibió TTX y fue entrenado con 1.0 mA (TTX-1.0) presentó latencias de retención significativamente menores con respecto a su control SAL-1.0, lo que evidencia que TTX deterioró la retención cuando los animales fueron entrenados con intensidad de choque baja. Conforme se fue incrementando la intensidad de choque eléctrico, las diferencias en la retención entre los grupos que recibieron TTX y su control dejaron de presentarse (SAL-2.0 vs TTX-2.0 y SAL3.0 vs TTX-3.0). También se presentaron diferencias significativas al comparar las latencias de retención de los grupos control SAL-1.0 y SAL-3.0, lo que muestra que a pesar de que los animales del grupo de SAL-1.0 aprendieron a evitar el choque eléctrico esta respuesta estuvo en posibilidades de ser mejorada cuando se incrementó la intensidad de choque durante el entrenamiento. Otra forma de evidenciar el efecto protector del sobrerreforzamiento es comparando pares de grupos que recibieron TTX y se entrenaron con diferente intensidad de choque, como ocurre con TTX-1.0 vs TTX-2.0, TTX-1.0 vs TTX-3.0 y TTX-2.0 vs TTX-3.0 donde se evidenció una mejora en la retención en la medida en que la intensidad de choque se incrementó.

La adecuada memoria, evaluada 48 h después del entrenamiento, de los grupos de animales que fueron entrenados con altas intensidades de choque ya con el HC dorsal inactivo por la administración previa de TTX, sugiere que el incremento en la magnitud del reforzador protege a los sujetos del tratamiento amnésico. Los resultados de este experimento son consistentes con estudios anteriores en donde las intensidades de choque eléctrico relativamente altas (experiencia de entrenamiento incrementado) protegen de la amnesia retrógrada producida por la inactivación reversible del STR (Pérez-Ruiz y Prado-Alcalá, 1989) AMY y SN

(Salado-Castillo et al., 2011), del HC dorsal (Quiroz et al., 2003) o por el bloqueo de receptores colinérgicos en el STR (Giordano y Prado-Alcalá, 1986).

Precisamente porque estos experimentos, realizados en nuestro laboratorio, para explicar el efecto protector del sobrerreforzamiento implicaron la inactivación de estructuras cerebrales inmediatamente después del entrenamiento, se ha planteado la hipótesis de que en condiciones de entrenamiento incrementado se acelere el proceso de consolidación, es decir, que el intervalo de tiempo entre el entrenamiento y la administración del tratamiento farmacológico pudiera ser suficiente para que el aprendizaje se consolide. Es por lo anterior que en la propuesta metodológica de este experimento, el tratamiento amnésico (inactivación del HD con la administración de TTX) se aplicó 30 min antes del entrenamiento y así poder explorar si se presenta el efecto protector del incremento en la magnitud del reforzador (experiencia de entrenamiento incrementado), cuando de antemano la estructura cerebral, en este caso el HC dorsal, se encontraba inactivo durante el entrenamiento.

Los hallazgos de este experimento son los siguientes: a) las tres intensidades de choque empleadas permitieron a los sujetos que recibieron salina antes del entrenamiento aprender a evitar el choque eléctrico, b) la adecuada memoria (evaluada 48 h después del entrenamiento) de los grupos de animales que fueron entrenados con altas intensidades de choque, con el HC dorsal inactivo por la administración de TTX, sugiere que el incremento en la magnitud del reforzador protege a los sujetos del tratamiento amnésico. Como mencionamos antes, este efecto ya se ha reportado en estudios en donde la inactivación reversible del STR (Pérez-Ruiz y Prado-Alcalá, 1989), AMY (Salado-Castillo et al., 2011) o del HC dorsal (Quiroz et al., 2003), así como el bloqueo de receptores colinérgicos estriatales (Giordano y Prado-Alcalá, 1986) y GABAérgicos nigrales (Cobos-Zapíaín et al., 1996) se indujo justo después del entrenamiento.

Así pues, los resultados muestran que una intensidad de 1.0 mA es suficiente para que los animales control aprendan a evitar el choque eléctrico mientras que aquellos que recibieron TTX no lo hacen; es decir, el efecto del tratamiento

amnésico se manifiesta con baja intensidad de choque; el choque de intensidad intermedia indujo protección contra el efecto de la TTX, aunque la retención de la tarea fue inferior a la del grupo que fue entrenado con 3.0 mA. El incremento de la intensidad del choque a 3.0 mA produce en los sujetos una protección total en contra del efecto amnésico de la TTX. En otras palabras, cuando los sujetos se someten a una experiencia de entrenamiento incrementado (intensidad de choque alto) el tratamiento amnésico deja de ser efectivo.

Como se indicó, este experimento contempló como antecedentes directos la evidencia experimental que indica que diversas estructuras cerebrales participan en la consolidación de la memoria y que cuando se interfiere en forma temporal o permanente con la actividad de alguna de ellas o cuando se bloquea farmacológicamente la acción de sus neurotransmisores, se presenta un deterioro en la consolidación de la memoria. Sin embargo, cuando los animales se exponen a una experiencia incrementada de entrenamiento, los tratamientos amnésicos no producen alteración de la memoria. Debido a que en estos protocolos experimentales los tratamientos se han aplicado después del entrenamiento, se ha sugerido que el entrenamiento incrementado acelera el proceso de consolidación (Parent y McGaugh, 1994) el cual se llevaría a cabo en el corto intervalo entre el entrenamiento y la aplicación del tratamiento amnésico. Si esto fuese así, es decir, si la consolidación se acelera al incrementarse la intensidad de choque, se esperaría que el almacenamiento de información no ocurra si la administración del tratamiento amnésico se realiza 30 minutos antes del entrenamiento (ya que el HC se encuentra inactivo antes y durante el entrenamiento), aunque los animales fuesen entrenados con intensidad de choque alta. Pero si a pesar de mantener inactivo el HC, antes y durante el entrenamiento el proceso de aprendizaje se consolida, entonces se evidenciaría que otras estructuras se hacen cargo del proceso y que el HC deja de ser fundamental.

Nuestros resultados ponen de manifiesto que en los animales entrenados con intensidades altas de choque eléctrico no se deterioró la memoria de la respuesta de evitación, a pesar de la inactivación previa del HC, lo que sugiere que el efecto protector del entrenamiento incrementado ante el tratamiento amnésico no

se debe a una aceleración en el proceso de consolidación de la memoria. Así, la evidencia experimental obtenida aquí apunta a que el HC deja de ser fundamental para la memoria de la respuesta condicionada con alta intensidad de choque y que es otra u otras las estructuras cerebrales las que permiten que se continúe el procesamiento de información en el cerebro. Por lo tanto, los resultados de este estudio se suman a la evidencia de diversas investigaciones realizadas en este y otros laboratorios apoyando la propuesta de que la integridad funcional de un número de estructuras: corteza cerebral, HC (Markowitsch et al., 1985; Quiroz, et al., 2003), AMY (Parent y McGaugh, 1994; Parent, Tomaz y McGaugh, 1992; Salado-Castillo, 1996), neostriado (Díaz del Guante et al., 1990; Giordano y Prado-Alcalá, 1986; Prado-Alcalá, et al., 1980; Salado-Castillo et al., 2011), sustancia nigra (Cobos-Zapíaín et al., 1996; Salado-Castillo, 1996), es necesaria para la consolidación de conductas que han sido adquiridas a través de un número limitado de ensayos (los cuales pueden ser suficientes para alcanzar una ejecución asintótica) o con bajo nivel de estimulación aversiva. Mientras que ante una experiencia incrementada de entrenamiento (a través del sobreentrenamiento o sobrerreforzamiento), las mismas estructuras (y probablemente estructuras adicionales) también participan en los procesos de consolidación; sin embargo, bajo estas circunstancias ninguna estructura particular es esencial para estos procesos mnemónicos, porque la activación de algunas de ellas podría ser suficiente para la consolidación; en otras palabras, ante una experiencia incrementada de entrenamiento la información derivada de la experiencia, alcanzará a otros núcleos, además de los que estuvieron involucrados en la condición de bajo reforzamiento, los cuales serán capaces de ejecutar las funciones de memoria (Prado-Alcalá, 1995). Los resultados de este Experimento 2 también aportan información adicional a la obtenida con diferentes aproximaciones experimentales de doble y triple disociación que han llevado a la propuesta de la participación de sistemas múltiples de memoria (SMM) en paralelo para el procesamiento de información adquirida y establecimiento de la memoria (White y McDonald, 1993).

La evidencia para el planteamiento de los diferentes sistemas de memoria también llega de modelos en los que se ha mostrado que daños en un sistema

parecen incrementar el aprendizaje mediado por otro sistema (McDonald y White, 1995); estos datos apoyan el punto de vista que los sistemas múltiples de memoria compiten entre ellos por el control del aprendizaje.

La mayoría de los estudios de sistemas múltiples de memoria, usan tareas que son dependientes de algún sistema neural pero no de otro. Una tarea donde la contribución de dos sistemas, hipocámpico y estriatal, puede ser contrastada es la de laberinto en cruz. Las ratas son entrenadas en una configuración T del laberinto, para desplazarse por un reforzador ubicado en alguno de los brazos del mismo. Esta simple tarea requiere ser resuelta usando mecanismos de respuesta (egocéntricos) o mecanismos de lugar (alocéntricos). El laberinto puede ser usado para determinar si las ratas emplean de manera preferente aprendizaje sobre las bases del hábito (e.g., girar a la derecha/izquierda para aproximarse a la meta) o sobre las bases de lugar (por ejemplo orientarse por señales fijas en el cuarto para aproximarse a la meta). Evidencias recientes indican claramente que ambos tipos de aprendizaje contribuyen a la adquisición de esta tarea. La inactivación del HC o el STR con lidocaina disminuyó la expresión de soluciones de lugar y de respuesta, respectivamente (Packard y McGaugh, 1996), mientras que con la administración de glutamato ocurrió lo contrario (Packard, 1999). De forma consistente, en esta tarea las ratas generalmente usan soluciones de lugar al principio del entrenamiento y más tarde soluciones de respuesta a lo largo del entrenamiento, es decir, después de entrenamiento prolongado las ratas cambian de soluciones de lugar a soluciones de respuesta (van de soluciones cognitivas a soluciones de hábito) (Chang y Gold, 2003; Packard, 1999; Packard y McGaugh, 1996). Este papel diferencial entre el STR y el HC, se ha determinado a partir de la medición por microdiálisis-HPLC de la acetilcolina liberada a lo largo de los ensayos en la prueba de laberinto T. En el estudio de Gold (2004) se observa que la liberación de acetilcolina hipocámpica se incrementa a partir del quinto ensayo y se mantiene elevada a través de los 100 ensayos que dura la sesión. Por otra parte, la liberación de acetilcolina en el STR se incrementa gradualmente alcanzando su nivel pico hasta los 40-50 ensayos. El incremento gradual en la liberación de acetilcolina en el STR corresponde a la transición de respuestas que emite la rata, de soluciones de lugar a soluciones de

respuesta en el laberinto T, sugiriendo que la activación temprana del HC controla soluciones de lugar en los primeros ensayos, cediendo el control al STR en las soluciones de respuesta al final de los ensayos. Además, estos hallazgos sugieren que el HC permanece activo, pero que el procesamiento hipocámpico es anulado o sustituido cuando el STR llega a comprometerse completamente (Gold, 2004). De acuerdo a este punto de vista, el HC retiene la capacidad para proveer una solución de lugar para la tarea y, en términos de liberación de ACh como un marcador, permanece activo durante la ejecución de la tarea. Sin embargo, esta capacidad para proveer una solución de lugar es oscurecida más tarde en el entrenamiento por contribuciones estriatales, a menos que la contribución estriatal tardía sea disminuida o removida por manipulación farmacológica como lo hicieron Packard y McGaugh (1996).

De hecho, en el Experimento 2 de esta tesis podemos inferir qué estructuras adicionales al HC (que se encontraba inactivo) se hacen cargo del procesamiento de la información durante el entrenamiento. Es posible sugerir que la intensidad de choque incrementado es uno de los factores que probablemente a través de la AMY desencadene los mecanismos que permiten evidenciar la participación de otro u otros sistemas de memoria en la tarea de evitación inhibitoria. Esta propuesta se fundamenta en evidencias experimentales que sugieren que la liberación periférica de hormonas adrenales en respuesta a influencias estresantes influyen sobre la consolidación de la memoria a través de la activación de adrenorreceptores centrales (McGaugh, 2000). Otros experimentos sugieren que la actividad noradrenérgica en la AMY puede jugar un papel en la consolidación de la memoria. Antagonistas a  $\beta$ -adrenorreceptores infundidos dentro de la AMY inmediatamente después del entrenamiento de evitación inhibitoria deterioran la retención de la ejecución y la administración simultánea de norepinefrina (NE) atenúa el deterioro (Gallagher et al., 1997; Gallagher y Kapp, 1981). Otros estudios usando microdiálisis combinada con cromatografía líquida de alta resolución proveen un apoyo adicional en esta dirección, ya que un choque eléctrico de intensidad similar a la que las ratas reciben durante el entrenamiento de evitación inhibitoria (0.55 mA) incrementó los niveles de NE en la AMY (Galvez et al., 1996) y la cantidad de NE



liberada varió directamente con la intensidad del choque eléctrico (0.3, 0.7 y 1.2 mA) (Quirarte et al., 1998). En otro estudio, se informó que los niveles de NE incrementaron más del 300% respecto de su línea base 30 min después del entrenamiento de evitación inhibitoria y se mantuvieron elevados por 2 h; y ese incremento en los niveles de NE después del entrenamiento presentó una correlación alta con la ejecución en la retención evaluada 24 h después (McIntyre et al., 2002).

Las conexiones anatómicas de la AMY con el HC y el STR se han evidenciado con diferentes aproximaciones, una de ellas implicó la expresión de *c-fos* en el HC y STR después de inyecciones intra-amigdalinas del aminoácido excitatorio NMDA, confirmando que la AMY está conectada funcionalmente con estas dos estructuras (Cahill y McGaugh, 1993 en Packard et al., 1994). Evidencias que indican que la AMY modula la consolidación de la memoria de aprendizajes dependientes del STR basados en señales (asociación estímulo-respuesta), y la consolidación de memoria espacial dependiente del HC se derivan de un estudio en el laberinto acuático donde infusiones pos-entrenamiento de anfetamina (agonista indirecto catecolaminérgico) dentro de la AMY basolateral mejoraron la memoria “cognitiva” (dependiente de HC) y la memoria “Estímulo-Respuesta” (dependiente del estriado). Estos efectos no fueron prevenidos por infusiones intra-amigdalinas de lidocaína administrada antes de la prueba de retención realizada 24 h después del entrenamiento (Packard, et al., 1994).

Por las evidencias descritas y los resultados de este Experimento 2, puede sugerirse que durante el entrenamiento de evitación inhibitoria sistemas múltiples de memoria están participando en el procesamiento de información de esta tarea. Así el número de estructuras comprometidas en condiciones de entrenamiento con bajo choque es menor pero conforme se incrementa la intensidad de choque, muy posiblemente considerando umbrales específicos, otras estructuras se van integrando o comprometiendo con el procesamiento, es decir, en condiciones de alto choque otros sistemas de memoria reciben y procesan la información de forma paralela y cada uno lo hará con base en el tipo de información que pueda integrar. Sin embargo, esta propuesta debe ser sujeta a la prueba experimental.

Las estructuras que, en principio, se sugiere participan en el procesamiento simultáneo del aprendizaje de evitación inhibitoria en condiciones de alto choque (sin pensar que sean las únicas) son el HC, NC, SN y la AMY y por consiguiente, sólo bajo estas condiciones de entrenamiento incrementado (intensidad de choque alta) el proceso de consolidación de la memoria sigue presentándose a pesar de la lesión o inactivación farmacológica de alguna de ellas. Esta interpretación se sustenta con otros hallazgos de nuestro laboratorio donde a pesar de la inactivación de NC, SN, AMY o HC en condiciones de alto choque el aprendizaje de evitación inhibitoria se consolida. Por lo anterior podemos sugerir que el sobrerreforzamiento activa la participación de sistemas múltiples de memoria en paralelo, que se hace efectiva a partir del mismo sobrerreforzamiento, y permite explicar de esta forma el proceso de protección a la amnesia.

Por otro lado, si bien la evitación inhibitoria no está basada específicamente en claves espaciales como una tarea espacial clásica, los sujetos experimentales necesariamente adquieren información acerca de la organización espacial del entorno, por lo que se podría pensar que la tarea de evitación permitiría dissociar la participación del HC, sobre todo de su región dorsal que ha evidenciado ser fundamental en el procesamiento de información espacial (Moser y Moser, 1998; Moser, Moser y Andersen, 1993). Ahora bien, la participación del STR se evidenciaría también simultáneamente a través del control que ejerce sobre la actividad motora necesaria para la adquisición y ejecución de la respuesta condicionada, además de que durante el procedimiento de evitación inhibitoria los animales experimentales también están bajo la influencia de otros estímulos entre los que se encuentran la luz del compartimiento seguro de la cámara, la penumbra del compartimiento de castigo, así como la diferente textura del piso de ambos compartimientos; en este sentido, se sabe que el STR es una estructura polimodal, que se activa ante la estimulación sensorial (Diez-Martínez et al., 1976; Diez-Martínez et al., 1977; Saavedra de Camargo et al., 1981). Otra posibilidad es que durante el entrenamiento con intensidad de choque alta ciertos estímulos sean más prominentes o destacados que otros, lo que muy probablemente ocasionará, diferencias en la activación de los sistemas de memoria participantes,

probablemente aprendizaje sobre la base E-R dependiente del STR. Y como se ha mostrado en otros estudios, si a esta situación se le añade alguna manipulación farmacológica o de lesión de las estructuras cerebrales participantes, el resultado será la expresión de una estrategia de aprendizaje dependiente de un sistema de memoria que no ha sido afectado por esas manipulaciones. Si la estructura que se encuentra inactiva es el HC muy probablemente se establezcan asociaciones estímulo-respuesta dependientes del estriado. Esto puede explicar por qué en condiciones de entrenamiento con alta intensidad de choque el deterioro de la memoria no se manifiesta a pesar de tener inactivo el HC. Sin embargo, como se indicó, tal propuesta debe ser contrastada experimentalmente. Lo cual indica que el Experimento 2 puede complementarse con otras aproximaciones metodológicas como microdiálisis-HPLC *in vivo* para evaluar los niveles de algunas hormonas del estrés o niveles de ACh (marcadores de la actividad neuronal) en HC, NC, SN y AMY durante el entrenamiento de evitación con alto y bajo choque. Asimismo, los datos que arrojen estos experimentos se sumarían a los que existen sobre las bases neurobiológicas y mecanismos del aprendizaje de evitación inhibitoria en condiciones de bajo reforzamiento vs sobrerreforzamiento.

Así, proponemos que la evitación inhibitoria, en condiciones de entrenamiento con alto choque, es un modelo útil para disociar la participación simultánea de múltiples sistemas en el procesamiento y establecimiento de la memoria y permitirá desentrañar las relaciones de competencia o de cooperación entre los sistemas participantes.

### ***Experimento 3. Dependencia de estado***

Este experimento demostró que no hay diferencias significativas entre los grupos control (VEH), ni entre los grupos experimentales (TTX), independientemente del régimen de administración del tratamiento. La Figura 12 muestra que TTX produjo un marcado efecto amnésico en los dos grupos experimentales TTX y TTX-TTX, en comparación con los grupos control SAL y SAL-SAL ( $p = 0.0001$ , en ambos casos). Por lo tanto, el deterioro en la retención provocado cuando TTX se administró en el HC

dorsal antes del entrenamiento no es debido a dependencia de estado sino que TTX pre-entrenamiento, interfiere con la actividad del HC dorsal ocasionando un evidente efecto amnésico que deteriora la memoria de la tarea entrenada con 1 mA.

#### ***Experimento 4. Evaluación de las memorias de corto y largo plazo***

Es importante hacer notar que a pesar de que las latencias de retención del grupo VEH, evaluadas 30 minutos después del entrenamiento, presentaron valores de 600 s; las latencias de retención de este grupo, medidas a las 48 h fueron apreciablemente menores. Esto puede ser debido a que la primera retención se hizo durante el periodo correspondiente a la memoria reciente (de corto plazo), por lo que la respuesta fue óptima; en el caso de la retención medida 48 h después, los valores de latencia son menores porque la experiencia de aprendizaje durante el entrenamiento fue relativamente débil dando acceso a cierta cantidad de olvido o de extinción, en virtud de la baja intensidad de choque que se administró durante el entrenamiento (1.0 mA). Esos resultados confirman los obtenidos en los Experimentos 1 y 2, en donde los grupos controles entrenados con la intensidad baja (1.0 mA) muestran prácticamente la misma retención que el grupo control de este experimento. En su conjunto, los resultados de retención del grupo SAL de los tres experimentos muestran la confiabilidad del modelo de evitación inhibitoria utilizado, así como el buen control de estímulos y demás variables involucradas en el entrenamiento y manejo general de los sujetos de experimentación.

Este experimento nos indica que el deterioro en la ejecución observado a las 48 h, en los animales que se entrenaron bajo el efecto de TTX con intensidad de choque baja, no es consecuencia de la incapacidad de los sujetos para adquirir la tarea, y que en condiciones de bajo reforzamiento el HC dorsal no es indispensable para la memoria de corto plazo (retención inmediata) pero su integridad funcional es necesaria para la consolidación de la memoria de largo plazo (medida a las 48 h después del entrenamiento). Los resultados de este experimento que muestran que la adquisición no requiere de la integridad funcional del HC, son congruentes con el estudio reportado por Martínez et al., (2002). Ellos emplearon otra aproximación

experimental, la inyección de ácido kaínico en el HC. Los autores demostraron inequívocamente que el HC dorsal no participa en los procesos de la memoria inmediata o de corto plazo, pero sí en los de la memoria de largo plazo. Los datos reportados por Martínez et al. (2002) y los que arrojó este experimento difieren de los reportados por Ambrogi Lorenzini et al. (1996) quienes en su estudio concluyen que el HC dorsal juega un papel fundamental en la adquisición de la tarea de evitación inhibitoria. Es importante señalar que estos autores inactivaron el hipocampo dorsal antes del entrenamiento y evaluaron retención hasta las 24 h, pero no evaluaron la respuesta condicionada poco después del entrenamiento, es decir no evaluaron retención inmediata como fue el caso del presente experimento.

#### ***Experimento 5. Efecto de TTX sobre la actividad motora horizontal y la habituación***

Puesto que en el procedimiento de evitación inhibitoria se espera que el animal se desplace desde el compartimiento iluminado de la cámara al oscuro y viceversa, los resultados en este experimento nos permiten descartar la posibilidad de deterioro motor con la administración de 10 ng/ $\mu$ L de TTX treinta min antes del entrenamiento de evitación inhibitoria, por lo que podemos afirmar que TTX no interfiere con la conducta que se espera realice el sujeto durante la ejecución de la tarea de evitación.

Otro aspecto muy importante que se desprende de los resultados de este experimento, es que el procedimiento utilizado para medir la actividad motora también ha sido un modelo para estudiar la forma más elemental de aprendizaje: la habituación, que es un aprendizaje no asociativo. Este aprendizaje consiste en el decremento paulatino de una respuesta cuando el sujeto se encuentra ante una estimulación repetitiva no aversiva o cuando se encuentra en un ambiente invariante. En nuestro caso, los sujetos estuvieron expuestos a un contexto monótono (la cámara de actividad motora) que induce, a lo largo del tiempo, una disminución de la actividad motora.

El hallazgo de que no hubo diferencias significativas en la actividad motora entre los grupos de animales íntegros y los inyectados en el hipocampo dorsal con VEH o con TTX indica que todos ellos aprendieron a habituarse, independientemente de que el hipocampo estuviese funcionando normalmente o de que estuviera inactivo. Estos datos representan una situación de disociación funcional del hipocampo, ya que, por una parte, su inactivación impide la consolidación de la memoria de la evitación inhibitoria entrenada con niveles relativamente bajos de estimulación aversiva, y por otra, su inactivación no interfiere con el aprendizaje de habituación. En otras palabras, el HC es indispensable para la consolidación de la memoria de evitación inhibitoria convencional, pero no es necesario para que se desarrolle la habituación.

Por otra parte, este hallazgo también es importante porque demuestra que la administración de TTX en el HC dorsal no interfirió con las capacidades generales perceptuales de los animales, ya que para que se lleve a cabo el proceso de habituación es indispensable que los animales sean capaces de distinguir las características físicas del entorno al que habrán de habituarse. Por último, la inactivación del HC no impidió que en otras regiones cerebrales ocurrieran los procesos plásticos necesarios para que se lleve a cabo el aprendizaje de habituación.

### ***Experimento 6. Número de espinas en las neuronas piramidales del CA1 del hipocampo y su relación con la magnitud del choque eléctrico***

Hasta donde sabemos, este es el primer estudio en el que se examinó la plasticidad de espinas en el hipocampo después de un procedimiento de extinción.

Se obtuvieron dos resultados principales. Primero, como era de esperarse, la alta intensidad de choque indujo mejor aprendizaje, es decir, el grupo de 3.0 mA mostró significativamente mayor resistencia a la extinción, y su ejecución en las sesiones de extinción fue mejor que la de los otros grupos.

El segundo hallazgo principal fue que la extinción produjo poda de espinas en los tres segmentos de la dendrita apical en los grupos que habían sido entrenados con las intensidades de choque bajas (1.0 y 2.0 mA). También es interesante la

observación de que el grupo de animales sometido a una experiencia de aprendizaje incrementado (grupo 3.0 mA), el cual produjo una mayor resistencia a la extinción, mostró diferentes densidades de espinas a lo largo de la dendrita apical: hubo poda en el segmento proximal, como fue el caso para los grupos con bajo choque, un aumento significativo en la densidad de espinas en el segmento medial, y una densidad de espinas que fue tan alta como el de los grupos control en el segmento distal.

La reducción en el número de espinas después de la extinción no fue debida simplemente a la exposición al contexto experimental ni a la habituación a éste; esta inferencia puede hacerse, porque tal reducción en las espinas no se observó en el grupo que fue "entrenado" con 0 mA y expuesto al mismo contexto por el mismo número de sesiones como los grupos entrenados, que recibieron choque.

La presunción de que cambios sinápticos subyacen al almacenamiento de la memoria no es nueva. En la primera mitad del siglo XX, Pavlov (1927) y Konorski (1948) postularon que el condicionamiento eran una forma de aprendizaje diferente de aquel que participa en la extinción, pero que, sin embargo, estos dos procesos de aprendizaje estaban asociados con la formación de nuevas conexiones sinápticas. Hay una buena cantidad de evidencia experimental para sustentar la idea de que el aprendizaje está asociado a la génesis de espinas dendríticas (Rusakov et al, 1997; O'Malley et al, 1998, 2000; Leuner et al, 2003; Marrone, 2007), pero es difícil encontrar informes relacionados con la dinámica de las espinas y la extinción.

Nuestros resultados apuntan hacia un probable mecanismo de la extinción y del efecto protector del aprendizaje incrementado contra la interferencia con la formación de la memoria de largo plazo. Fue completamente claro que los grupos que realmente mostraron extinción (grupos 1.0 y 2.0 mA; Figura 10) también presentaron un grado importante de poda de espinas a lo largo de los tres segmentos de las dendritas apicales del CA1 (Figura 15). En este caso, el cambio plástico inducido por la extinción fue en forma de una reducción de los contactos sinápticos en la dendrita apical, como puede deducirse por la reducción de espinas, y sugiere que la extinción está relacionada con una disminución en las entradas

excitatorias en el sitio postsináptico. Este hallazgo va en contra de la hipótesis propuesta por Pavlov (1927) y Konorski (1948), y muestra claramente que los mecanismos que subyacen a la nueva respuesta aprendida (la extinción) son completamente diferentes de aquellos que median el aprendizaje inicial de la respuesta de evitación inhibitoria, donde se ha encontrado que la densidad de espinas aumenta significativamente (O'Malley et al., 1998).

Por otro lado, el grupo que fue entrenado con la intensidad de choque más alta (3.0 mA), mostró una retención perfecta de la respuesta condicionada a través de las cuatro primeras sesiones de extinción, y fue hasta la quinta sesión que esta respuesta comenzó a disminuir (Figura 10). Así, es evidente que la conducta de este grupo reflejó los efectos de mejora del entrenamiento. Esta elevada resistencia a la extinción fue acompañada por un patrón diferencial de modificaciones de espinas a través de la longitud de la dendrita apical del CA1 (Figura 16). Al igual que en el caso del entrenamiento con las más bajas intensidades de choque, este grupo mostró poda en los segmentos proximal y medial de la dendrita apical. Sin embargo, la cuenta de espinas en el segmento distal no fue diferente de la de los grupos control. Este interesante resultado puede indicar que el mantenimiento de la respuesta condicionada de este grupo, a pesar de haber sido sometido al proceso de extinción, puede ser debido, al menos en parte, al mantenimiento de las conexiones sinápticas mediadas por estas espinas dendríticas. Las principales fibras aferentes del segmento distal de la dendrita apical, la vía perforante, surgen desde la corteza entorrhinal multimodal. Es tentador especular que esta vía transmite o comunica las señales excitatorias producidas por las condiciones de aprendizaje incrementado, y por lo tanto detiene la poda natural inducida por la extinción de la respuesta condicionada.

En un artículo reciente, Vetere et al. (2011) estudiaron la dinámica de las espinas dendríticas después de la retención a largo plazo del condicionamiento del miedo contextual. Se encontró un aumento significativo en la densidad y el tamaño de las espinas en las dendritas apicales de las cortezas cingulada anterior e infralímbica. Interesantemente, después de la extinción de la respuesta condicionada la densidad de espinas retornó a la línea base, pero la proporción de espinas



grandes no lo hizo en la corteza cingulada anterior; el resultado opuesto se observó en la corteza infralímbica. Estos autores concluyeron que las fluctuaciones en la densidad y forma de las espinas se producen en las regiones corticales, tanto durante la formación y la extinción de las memorias del miedo contextual. Por otro lado, nosotros encontramos que la extinción fue acompañada por la poda de las espinas dendríticas a lo largo de la longitud de las dendritas apicales de las células del hipocampo CA1 de ratas que habían sido entrenadas en evitación inhibitoria con intensidades relativamente bajas de choque, y ningún cambio en la densidad de espinas en la dendrita distal cuando se administró una intensidad de choque alto. Estos hallazgos disímiles muestran que el aprendizaje de extinción representa un fenómeno complejo donde diferentes procesos tienen lugar en diferentes regiones del cerebro, los cuales puede ser dependientes del tipo de conducta que se está extinguiendo.

Vale la pena mencionar que una característica distintiva del desorden de estrés postraumático (PTSD) es la formación de una memoria fuerte, que es altamente resistente a la extinción (Armario et al., 2008), parecida a la memoria formada después del aprendizaje incrementado de la evitación inhibitoria descrito en el presente trabajo. Así, este modelo conductual puede ser útil en el estudio de la neurobiología del PTSD, y uno está tentado a hipotetizar que la resistencia a la extinción vista en esta patología, también podría estar mediada por la durabilidad de las espinas en las dendritas apicales de las neuronas piramidales del hipocampo.

Para concluir, el entrenamiento de evitación inhibitoria con un choque eléctrico de intensidad relativamente alta (3.0 mA) produjo aprendizaje incrementado, como se mostró por la fuerte resistencia a la extinción, comparado con la ejecución de los grupos que habían sido entrenados con bajas intensidades de choque eléctrico. Después de probar bajo un protocolo para producir la extinción, hubo poda de espinas dendríticas a lo largo de la longitud de las dendritas apicales de las neuronas del campo CA1 del hipocampo en los animales que fueron entrenados con bajas intensidades de choque eléctrico (1.0 y 2.0 mA); estos animales mostraron débil resistencia a la extinción. El grupo con una fuerte resistencia a la extinción también mostró la poda de las espinas dendríticas, pero sólo en los segmentos proximal y

medial de la dendrita apical; se encontró una cantidad normal de espinas en el segmento distal. La conducta de extinción, evidenciada por los registros bajos de retención, en parte puede estar mediada por un cambio plástico en forma de una reducción de los contactos sinápticos en la dendrita apical, mientras que el mantenimiento de la respuesta condicionada después del protocolo de extinción puede ser debido, al menos en parte, al mantenimiento de las conexiones sinápticas en el segmento distal de la dendrita apical.

Es necesario realizar experimentos adicionales para poner a prueba experimental las diversas interpretaciones ofrecidas a los resultados en este trabajo.

## X. RESUMEN DE RESULTADOS

1. La intensidad de choque de 1.0 mA corresponde a la de bajo reforzamiento mientras que 3.0 mA puede ser empleada como intensidad para el alto reforzamiento y 2.0 mA como una intensidad intermedia.
2. La inactivación del HC con la administración de la TTX antes del entrenamiento no interfirió con la capacidad de repuesta de los animales al ser expuestos a la cámara de evitación (adquisición) ni con la sensibilidad para responder ante el choque eléctrico (escape).
3. Los animales entrenados con intensidades altas de choque eléctrico no deterioraron la memoria de la respuesta de evitación, a pesar de la inactivación previa del HC.
4. El deterioro en la retención provocado cuando la TTX se administró en el HC antes del entrenamiento con choque bajo no es debido a dependencia de estado.
5. La administración pre-entrenamiento de la TTX en el HC no interfirió con la memoria de corto plazo.
6. La administración intra-hipocámpica de la TTX treinta min antes del entrenamiento no deterioró la actividad motora espontánea de los animales, por lo que este fármaco no interfirió con la tarea de evitación inhibitoria, ni afectó el aprendizaje de habituación.
7. Los animales entrenados con bajas intensidades de choque eléctrico (1.0, 2.0 mA) mostraron débil resistencia a la extinción y en el análisis morfométrico hubo poda de espinas dendríticas en la región proximal, medial y distal de la dendrita apical del área CA1 del HC.
8. Los animales sometidos a aprendizaje incrementado (sobrerreforzamiento) presentaron fuerte resistencia a la extinción y el análisis morfométrico evidenció poda sólo en los segmentos proximal y medial de la dendrita apical de las neuronas del CA1 del HC, mientras que la cantidad de espinas fue "normal" en el segmento distal.

## XI. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

### A) CONCLUSIONES

1. Se evidenció que el *efecto protector* del sobrerreforzamiento no se debe a una aceleración en el proceso de consolidación de la memoria.
2. En condiciones de bajo reforzamiento el hipocampo dorsal no es indispensable para la memoria de corto plazo (retención inmediata) pero su integridad funcional es necesaria para la memoria de largo plazo.
3. Es posible la participación de múltiples sistemas de memoria (hipocampo, estriado y amígdala) en el procesamiento de información para la conducta de evitación inhibitoria en condiciones de aprendizaje incrementado.
4. Los resultados de este estudio se suman a la evidencia de diversas investigaciones realizadas con aproximaciones experimentales de doble y triple disociación que han llevado a la propuesta de la participación de Múltiples Sistemas de Memoria en Paralelo para el procesamiento de información adquirida y el establecimiento de la memoria.
5. La conducta de extinción puede estar mediada por una reducción de los contactos sinápticos de la dendrita apical, mientras que el mantenimiento de la respuesta condicionada (resistencia a la extinción) puede deberse, a la conservación o persistencia de las conexiones sinápticas en el segmento distal.
6. Los resultados sugieren que la vía perforante transmite o comunica las señales excitatorias producidas por las condiciones de aprendizaje incrementado, y por lo tanto detiene la poda natural inducida por la extinción de la respuesta condicionada.
7. Es posible usar el modelo de evitación inhibitoria como una herramienta metodológica útil para disociar la participación simultánea de múltiples sistemas de memoria en los procesos de aprendizaje y memoria para desentrañar las relaciones de competencia o de cooperación entre los sistemas participantes.

## **B) PERSPECTIVAS**

El experimento 2 Efecto protector del sobrerreforzamiento, puede complementarse con otras aproximaciones metodológicas como microdiálisis-HPLC in vivo para evaluar los niveles de algunas hormonas del estrés o niveles de ACh (marcadores de la actividad neuronal) entre otros, en HC, NC, SN y AMY durante el entrenamiento de evitación con alto y bajo choque. Asimismo, los datos que arrojen estos experimentos se sumarían a los que existen sobre las bases neurobiológicas y mecanismos del aprendizaje de evitación inhibitoria en condiciones de bajo reforzamiento vs sobrerreforzamiento.

Adicionalmente, dado que la forma de las espinas dendríticas también se ha asociado a una remodelación mediada por la experiencia, este estudio puede complementarse con información adicional que permita establecer una relación entre la forma y tamaño de las espinas dendríticas y la experiencia del aprendizaje incrementado en la tarea de evitación inhibitoria.

## XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amaral, D. G., & Witter, M. P. (1989). The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience*, 31(3), 571-591.
- Ambrogio-Lorenzini, C. A., Baldi, E., Bucherelli, C., Sacchetti, B., & Tassoni, G. (1996). Role of dorsal hippocampus in acquisition, consolidation and retrieval of rat's passive avoidance response: A tetrodotoxin functional inactivation study. *Brain Research*, 730(1-2), 32-39.
- Ambrogio-Lorenzini, C. G., Baldi, E., Bucherelli, C., Sacchetti, B., & Tassoni, G. (1997). Role of ventral hippocampus in acquisition, consolidation and retrieval of rat's passive avoidance response memory trace. *Brain Research*, 768(1-2), 242-248.
- Ambrogio-Lorenzini, C. G., Baldi, E., Bucherelli, C., Sacchetti, B., & Tassoni, G. (1999). Neural topography and chronology of memory consolidation: A review of functional inactivation findings. *Neurobiology of Learning and Memory*, 71(1), 1-18.
- Ambrogio-Lorenzini, C., Baldi, E., Bucherelli, C., & Tassoni, G. (1993). Forced extinction as a means to evaluate consolidation gradient of a passive avoidance response in the rat. *Physiology & Behavior*, 53(5), 873-877.
- Anagnostaras, S. G., Gale, G. D., & Fanselow, M. S. (2001). Hippocampus and contextual fear conditioning: Recent controversies and advances. *Hippocampus*, 11(1), 8-17.
- Armario, A., Escorihuela, R. M., & Nadal, R. (2008). Long-term neuroendocrine and behavioural effects of a single exposure to stress in adult animals. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 32(6), 1121-1135.
- Atkinson, R. C. & Shiffrin, R. M. (1971). The control short-term memory. *Scientific American*, 225(2), 82-90.
- Baddeley, A. D. (1997). *Human memory: Theory and Practice*. Hove, UK: Psychology Press Ltd.
- Bailey, E. L., Overstreet, D. H., & Crocker, A. D. (1986). Effects of intrahippocampal injections of the cholinergic neurotoxin AF64A on open-field activity and avoidance learning in the rat. *Behavioral and Neural Biology*, 45(3), 263-274.
- Barros, D. M., Ramirez, M. R., Dos Reis, E. A., & Izquierdo, I. (2004). Participation of hippocampal nicotinic receptors in acquisition, consolidation and retrieval of memory for one trial inhibitory avoidance in rats. *Neuroscience*, 126(3), 651-656.
- Bast, T., Zhang, W. N., & Feldon, J. (2001). The ventral hippocampus and fear conditioning in rats - Different anterograde amnesias of fear after tetrodotoxin inactivation and infusion of the GABA(A) agonist muscimol. *Experimental Brain Research*, 139(1), 39-52.
- Bayer, S. A. (1982). Changes in the total number of dentate granule cells in juvenile and adult rats: a correlated volumetric and 3H-thymidine autoradiographic study. *Experimental Brain Research*, 46(3), 315-323.
- Beninger, J. R. (1989). The role of serotonin and dopamine in learning to avoid aversive stimuli. En: Trever-Archer (Ed.). *Aversion, avoidance and anxiety* (pp. 265-284). New Jersey: Erlbaum Assoc.

- Bezanilla, F. (2000). The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. *Physiological Reviews*, 80(2), 555-592.
- Black, A. H., Nadel, L., & O'Keefe, J. (1977). Hippocampal function in avoidance learning and punishment. *Psychological Bulletin*, 84(6), 1107-1129.
- Bliss, T. V., & Gardner-Medwin, A. R. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of Physiology*, 232(2), 357-374.
- Bliss, T. V., & Lomo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of Physiology*, 232(2), 331-356.
- Boren, J. J., Sidman, M., & Herrnstein, R. J. (1959). Avoidance, escape, and extinction as functions of shock intensity. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 52(4), 420-425.
- Bower, G. H., & Hilgard, E. R. (2011). *Teorías de Aprendizaje México*: Editorial Trillas.
- Brioni, J. D., & McGaugh, J. L. (1988). Post-training administration of GABAergic antagonists enhances retention of aversively motivated tasks. *Psychopharmacology*, 96(4), 505-510.
- Brioni, J. D., Nagahara, A. H., & McGaugh, J. L. (1989). Involvement of the amygdala GABAergic system in the modulation of memory storage. *Brain Research*, 487(1), 105-112.
- Bruner, J. S. (1969). Modalities of memory. En G. A. Talland & N. C. Waugh (Eds.), *The pathology of memory* (pp. 253-259). New York: Academic Press.
- Bucherelli, C., & Tassoni, G. (1992). Duration of retrograde amnesia induced by tetrodotoxin inactivation of the parabrachial nuclei is inversely related to the intensity of footshock in rat's passive avoidance response. *Behavioural Brain Research*, 49(2), 175-180.
- Bucherelli, C., Tassoni, G., & Bures, J. (1992). Time-dependent disruption of passive avoidance acquisition by post-training intra-amygdala injection of tetrodotoxin in rats. *Neuroscience Letters*, 140(2), 231-234.
- Buzsáki, G., & Eidelberg, E. (1982). Convergence of associational and commissural pathways on CA1 pyramidal cells of the rat hippocampus. *Brain Research*, 237(2), 283-295.
- Chang, Q., & Gold, P. E. (2003). Switching memory systems during learning: Changes in patterns of brain acetylcholine release in the hippocampus and striatum in rats. *The Journal of Neuroscience*, 23(7), 3001-3005.
- Chávez, M. E., Salado-Castillo, R., Sánchez-Alavez, M., Quirarte, G. L., & Prado-Alcalá, R. A. (1995). Post-training injection of GABAergic antagonists into the striatum produces retrograde amnesia. *Neurobiology of Learning and Memory*, 63(3), 296-300.
- Claiborne, B. J., Amaral, D. G., & Cowan, W. M. (1986). A light and electron microscopic analysis of the moss fibers of the rat dentate gyrus: *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 246(4), 435-458
- Clark, R. E., & Squire, L. R. (1998). Classical conditioning and brain systems: The role of awareness. *Science*, 280(5360), 77-81.
- Cobos-Zapíaín, G. G., Salado-Castillo, R., Sánchez-Alavez, M., Quirarte, G. L., Roldán-Roldán, G., Díaz del Guante, M. A., & Prado-Alcalá, R. A. (1996). High

- level of footshock during inhibitory avoidance training prevents amnesia induced by intranigral injection of GABA antagonists. *Neurobiology of Learning and Memory*, 65(3), 202-206.
- Cohen, N. J., & Eichenbaum, H. (1993). *Memory, amnesia, and the hippocampal system* Cambridge, MA: The MIT Press.
- Cohen, N. J., & Squire, L. R. (1980). Preserved learning and retention of pattern-analyzing skill in amnesia: Dissociation of knowing how and knowing that. *Science*, 210(4466), 207-210.
- Cruz-Morales, S. E., Duran-Arevalo, M., Díaz del Guante, M. A., Quirarte, G., & Prado-Alcalá, R. A. (1992). A threshold for the protective effect of over-reinforced passive avoidance against scopolamine-induced amnesia. *Behavioral and Neural Biology*, 57(3), 256-259.
- Cruz-Morales, S. E., Quirarte, G. L., Díaz del Guante, M. A., & Prado-Alcalá, R. A. (1993). Effects of GABA antagonists on inhibitory avoidance. *Life Sciences*, 53(16), 1325-1330.
- Davis, M. (1992). The role of the amygdala in conditioned fear. En J. P. Aggleton (Ed.), *The amygdala: Neurobiological aspects of emotion, memory, and mental dysfunction* (pp. 255-306). New York, NY, US: Wiley-Liss.
- Devan, B. D., & White, N. M. (1999). Parallel information processing in the dorsal striatum: Relation to hippocampal function. *The Journal of Neuroscience*, 19(7), 2789-2798.
- Díaz del Guante, M. A., Rivas-Arancibia, S., Quirarte, G., & Prado-Alcalá, R. A. (1990). Over-reinforcement protects against memory deficits induced by muscarinic blockade of the striatum. *Boletín de Estudios Médicos y Biológicos*, 38(3-4), 49-53.
- Díaz-Cintra, S., Cintra, L., Kemper, T., Resnick, O., & Morgane, P. J. (1981). Nucleus raphe dorsalis: a morphometric golgi study in rats of three age groups. *Brain Research*, 207(1), 1-16.
- Díaz-Trujillo, A., Contreras, J., Medina, A. C., Silveyra-Leon, G. A., Antaramian, A., Quirarte, G. L., & Prado-Alcalá, R. A. (2009). Enhanced inhibitory avoidance learning prevents the long-term memory-impairing effects of cycloheximide, a protein synthesis inhibitor. *Neurobiology of Learning and Memory*, 91(3), 310-314.
- Diez-Martínez, O., Muñoz, M. G., Prieto, G., Roig, J. A., & Brust-Carmona, H. (1976). Sensory afferents to the caudate nucleus. *Physiology & Behavior*, 16(6), 727-733.
- Diez-Martínez, O., Roig, J. A., Vargas, J. E., Sepulveda, J., & Brust-Carmona, H. (1977). Neural pathway mediating somatic evoked responses in the caudate nucleus of cats. *Physiology & Behavior*, 19(2), 269-276.
- Dillon, G. M., Qu, X., Marcus, J. N., & Dodart, J. C. (2008). Excitotoxic lesions restricted to the dorsal CA1 field of the hippocampus impair spatial memory and extinction learning in C57BL/6 mice. *Neurobiology of Learning and Memory*, 90(2), 426-433.
- Dudman, J. T., Tsay, D., & Siegelbaum, S. A. (2007). A role for synaptic inputs at distal dendrites: instructive signals for hippocampal long-term plasticity. *Neuron*, 56(5), 866-879.



- Durán-Arévalo, M., Cruz-Morales, S. E., & Prado-Alcalá, R. A. (1990). Is acetylcholine involved in memory consolidation of over-reinforced learning? *Brain Research Bulletin*, 24(6), 725-727.
- Eichenbaum, H. (1996). Is the rodent hippocampus just for 'place'? *Current Opinion in Neurobiology*, 6(2), 187-195.
- Fanselow, M. (1994). Neural organization of the defensive behavior system responsible for fear. *Psychonomic Bulletin & Review*, 1(4), 429-438.
- Fiala, J. C., Feinberg, M., Popov, V., & Harris, K. M. (1998). Synaptogenesis via dendritic filopodia in developing hippocampal area CA1. *The Journal of Neuroscience*, 18(21), 8900-8911.
- Fozzard, H. A., & Lipkind, G. M. (2010). The tetrodotoxin binding site is within the outer vestibule of the sodium channel. *Marine drugs*, 8(2), 219-234.
- Gallagher, M. (1997). Animal models of memory impairment. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 352(1362), 1711-1717.
- Gallagher, M., & Kapp, B. S. (1981). Effect of phentolamine administration into the amygdala complex of rats on time-dependent memory processes. *Behavioral and Neural Biology*, 31(1), 90-95.
- Galvez, R., Mesches, M. H., & McGaugh, J. L. (1996). Norepinephrine release in the amygdala in response to footshock stimulation. *Neurobiology of Learning and Memory*, 66(3), 253-257.
- Giordano, M., & Prado-Alcalá, R. A. (1986). Retrograde amnesia induced by post-trial injection of atropine into the caudate-putamen Protective effect of the negative reinforcer. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 24(4), 905-909.
- Gold, P. E. (2004). Coordination of multiple memory systems. *Neurobiology of Learning and Memory*, 82(3), 230-242.
- Graf, P., & Schacter, D. L. (1985). Implicit and explicit memory for new associations in normal and amnesic subjects. *Journal of Experimental Psychology. Learning, Memory, and Cognition*, 11(3), 501-518.
- Greenough, W. T., & Bailey, C. H. (1988). The anatomy of a memory: convergence of results across a diversity of tests. *Trends in Neurosciences*, 11(4), 142-147.
- Haug, F. M. (1976). Sulphide silver pattern and cytoarchitectonics of parahippocampal areas in the rat. Special reference to the subdivision of area entorhinalis (area 28) and its demarcation from the pyriform cortex. *Advances in Anatomy, Embryology, and Cell Biology*, 52(4), 3-73.
- Heimer, L., Zahm, D. S., & Alheid, G. F. (1995). Basal ganglia. En G. Paxinos (Ed.), *The rat nervous system* (pp. 579-628). San Diego, California: Academic Press.
- Hille, B. (2001). *Ionic Channels of Excitable Membranes* (3rd ed.) Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc.
- Horner, C. H. (1993). Plasticity of the dendritic spine. *Progress in Neurobiology*, 41(3), 281-321.
- Isaacson, R. L. (1982). *The Limbic System* (2nd ed.) New York: Plenum Press.
- Izquierdo, I., Da Cunha, C., Rosat, R., Jerusalinsky, D., Ferreira, M. B., & Medina, J. H. (1992). Neurotransmitter receptors involved in post-training memory processing by the amygdala, medial septum, and hippocampus of the rat. *Behavioral and Neural Biology*, 58(1), 16-26.

- James, W. (1890). *The principles of psychology*. New York: Henry Holt and Company.
- Jarrard, L. E. (1993). On the role of the hippocampus in learning and memory in the rat. *Behavioral and Neural Biology*, 60(1), 9-26.
- Jarvik, M. E. & Kopp R. (1967). An improved one-trial passive avoidance learning situation. *Psychological Reports*, 21(1), 221-224.
- Johnson, J. (2002). Tetrodotoxin. Department of Molecular Biophysics & Biochemistry. Florida State University Tallahassee, Florida, USA, <http://www.chm.bris.ac.uk/motm/ttx/ttxj.htm> (Activo diciembre 2013).
- Kandel, E. R. (2001). The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science*, 294 (5544), 1030-1038.
- Kimble, G. A., Hilgard, E. R., & Marquis, D. E. (1985). *Condicionamiento y aprendizaje*. México: Trillas.
- Klein, S. B. (2012). *Learning. Principles and applications*. California: SAGE Publications, Inc.
- Köhler, C. (1985). A projection from the deep layers of the entorhinal área to the hippocampal formation in the rat brain. *Neuroscience Letters*, 56(1), 13-19.
- Konorski, J. (1948). *Conditioned reflexes and neuron organization*. Cambridge, MA: Cambridge University Press.
- Lechner, H. A., Squire, L. R., & Byrne, J. H. (1999). 100 years of consolidation – Remembering Müller and Pilzecker. *Learning and Memory*, 6(2), 77-87.
- LeDoux, J. (1992). Emotion and the amygdala. En J. P. Aggleton (Ed.), *The amygdala: Neurobiological aspects of emotion, memory and mental dysfunction* (pp. 339-351). New York: Wiley-Liss.
- Leuner, B., Falduto, J., & Shors, T. J. (2003). Associative memory formation increases the observation of dendritic spines in the hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, 23(2), 659-665.
- Maaswinkel, H., & Whishaw, I. Q. (1999). Homing with locale, taxon, and dead reckoning strategies by foraging rats: sensory hierarchy in spatial navigation. *Behavioural Brain Research*, 99(2), 143-152.
- Maguire, E. A., Burke, T., Phillips, J., & Staunton, H. (1996). Topographical disorientation following unilateral temporal lobe lesions in humans. *Neuropsychologia*, 34(10), 993-1001.
- Maguire, E. A., Frackowiak, R. S., & Frith, C. D. (1996). Learning to find your way: a role for the human hippocampal formation. *Proceedings Biological Sciences*, 263(1377), 1745-1750.
- Marban, E., Yamagishi, T., & Tomaselli, G. F. (1998). Structure and function of voltage-gated sodium channels, *Journal of Physiology*, 508(3), 647-657.
- Markowitsch, H. J., Emmans, D., Irle, E., Streicher, M., & Preilowski, B. (1985). Cortical and subcortical afferent connections of the primate's temporal pole: a study of rhesus monkeys, squirrel monkeys, and marmosets. *The Journal of Comparative Neurology*, 242(3), 425-458.
- Marrone, D. F. (2007). Ultrastructural plasticity associated with hippocampal-dependent learning: a meta-analysis. *Neurobiology of Learning and Memory*, 87(3), 361-371.

- 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*(2), 97-103.
- McDonald, R. J., & White, N. M. (1993). A triple dissociation of memory systems: Hippocampus, amygdala, and dorsal striatum. *Behavioral Neuroscience*, *107*(1), 3-22.
- McDonald, R. J., & White, N. M. (1994). Parallel information processing in the water maze: evidence for independent memory systems involving dorsal striatum and hippocampus. *Behavioral and Neural Biology*, *61*(3), 260-270.
- McDonald, R. J., & White, N. M. (1995). Hippocampal and nonhippocampal contributions to place learning in rats. *Behavioral Neuroscience*, *109*(4), 579-593.
- McDougall, W. (1923). *Outline of Psychology* New York: Charles Scribner's Sons.
- McEwen, B. S., & Schmeck, H. M. (1994). The hostage brain. En. New York: The Rockefeller University Press.
- McGaugh, J. L. (1973) *Learning and memory*. San Francisco: Albion Publishing Company.
- McGaugh, J. L. (2000). Memory – a century of consolidation. *Science*, *287*(5451), 248-251.
- McGeorge, A. J., & Faull, R. L. (1989). The organization of the projection from the cerebral cortex to the striatum in the rat. *Neuroscience*, *29*(3), 503-537.
- McIntyre, C. K., Hatfield, T., & McGaugh, J. L. (2002). Amygdala norepinephrine levels after training predict inhibitory avoidance retention performance in rats. *European Journal of Neuroscience*, *16*(7), 1223-1226.
- McNaughton, B. L., Barnes, C. A., Gerrard, J. L., Gothard, K., Jung, M. W., Knierim, J. J., Weaver, K. L. (1996). Deciphering the hippocampal polyglot: the hippocampus as a path integration system. *The Journal of Experimental Biology*, *199*(Pt 1), 173-185.
- Megías, M., Emri, Z., Freund, T. F., & Gulyas, A. I. (2001). Total number and distribution of inhibitory and excitatory synapses on hippocampal CA1 pyramidal cells. *Neuroscience*, *102*(3), 527-540.
- Mishkin, M., Malamut, B., & Bachevalier, J. (1984). Memories and habits: Two neural systems. En G. Lynch, J. L. McGaugh & N. M. Weinberger (Eds.), *Neurobiology of learning and memory* (pp. 65-77). New York: Guilford.
- Morris, R. G., Garrud, P., Rawlins, J. N., & O'Keefe, J. (1982). Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature*, *297*(5868), 681-683.
- Moser, E., Moser, M. B., & Andersen, P. (1993). Spatial learning impairment parallels the magnitude of dorsal hippocampal lesions, but is hardly present following ventral lesions. *The Journal of Neuroscience*, *13*(9), 3916-3925.
- Moser, M. B., & Moser, E. I. (1998). Functional differentiation in the hippocampus. *Hippocampus*, *8*(6), 608-619.
- Moser, M. B., Trommald, M., & Andersen, P. (1994). An increase in dendritic spine density on hippocampal CA1 pyramidal cells following spatial learning in adult rats suggests the formation of new synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *91*(26), 12673-12675.

- Nabeshima, T., Noda, Y., & Kameyama, T. (1988). GABAergic modulation of memory with regard to passive avoidance and conditioned suppression task in mice. *Psychopharmacology*, *94*(1), 69-73.
- Nadel, F., & Bohbot, V. (2001). Consolidation of memory. *Hippocampus*, *11*(1), 56-60.
- Noda, M., Shimizu, S., Tanabe, T., Takai, T., Kayano, T., Ikeda T., Takahashi, H., Nakayama, H., Kanaoka, Y., Minamino, N. Kangawa, K., Matsuo, H., Raftery, M.A., Hirose, T., Furutani, Y., Inayama, S., Hayashida, H., Miyata, T., & Numa, S. (1984). Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature*, *312*:121-127).
- Ögren, S. O. (1985). Evidence for a role of brain serotonergic neurotransmission in avoidance learning. *Acta Physiologica Scandinavica. Supplementum*, *544*, 1-71.
- O'Keefe, J., & Nadel, L. (1978). *The hippocampus as a cognitive map*. Oxford: Clarendon Press.
- Olton, D. S. (1983). Memory functions and the hippocampus. En W. Seifert (Ed.), *Neurobiology of the hippocampus* (pp. 335-374). New York: Academic Press.
- Olton, D. S., & Papas, B. C. (1979). Spatial memory and hippocampal function. *Neuropsychologia*, *17*(6), 669-682.
- O'Malley, A., O'Connell, C., & Regan, C. M. (1998). Ultrastructural analysis reveals avoidance conditioning to induce a transient increase in hippocampal dentate spine density in the 6 hour post-training period of consolidation. *Neuroscience*, *87*(3), 607-613.
- O'Malley, A., O'Connell, C., Murphy, K. J., & Regan, C. M. (2000). Transient spine density increases in the mid-molecular layer of hippocampal dentate gyrus accompany consolidation of a spatial learning task in the rodent. *Neuroscience*, *99*(2), 229-232.
- Overton, D. A. (1964). State-Dependent or "Dissociated" Learning Produced with Pentobarbital. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, *57*, 3-12.
- Overton, D. A. (1966). State-dependent learning produced by depressant and atropine-like drugs. *Psychopharmacologia*, *10*(1), 6-31.
- Packard, M. G. (1999). Glutamate infused posttraining into the hippocampus or caudate-putamen differentially strengthens place and response learning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*(22), 12881-12886.
- Packard, M. G., & McGaugh, J. L. (1996). Inactivation of hippocampus or caudate nucleus with lidocaine differentially affects expression of place and response learning. *Neurobiology of Learning and Memory*, *65*(1), 65-72.
- Packard, M. G., & White, N. M. (1991). Dissociation of hippocampus and caudate nucleus memory systems by posttraining intracerebral injection of dopamine agonists. *Behavioral Neuroscience*, *105*(2), 295-306.
- Packard, M. G., Cahill, L., & McGaugh, J. L. (1994). Amygdala modulation of hippocampal-dependent and caudate nucleus-dependent memory processes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *91*(18), 8477-8481.
- Packard, M. G., Hirsh, R., & White, N. M. (1989). Differential effects of fornix and caudate nucleus lesions on two radial maze tasks: evidence for multiple memory systems. *The Journal of Neuroscience*, *9*(5), 1465-1472.

- Parent, M. B., & McGaugh, J. L. (1994). Posttraining infusion of lidocaine into the amygdala basolateral complex impairs retention of inhibitory avoidance training. *Brain Research*, 661(1-2), 97-103.
- Parent, M. B., Quirarte, G. L., Cahill, L., & McGaugh, J. L. (1995). Spared retention of inhibitory avoidance learning after posttraining amygdala lesions. *Behavioral Neuroscience*, 109(4), 803-807.
- Parent, M. B., Tomaz, C., & McGaugh, J. L. (1992). Increased training in an aversively motivated task attenuates the memory-impairing effects of posttraining N-methyl-D-aspartate-induced amygdala lesions. *Behavioral Neuroscience*, 106(5), 789-797.
- Pavlov, I. P. (1927). *Conditioned reflexes: An investigation of the physiological activity of the cerebral cortex*. London: Oxford University Press.
- Paxinos, G., & Watson, C. (2005). *The rat brain in stereotaxic coordinates* (4th ed.) San Diego: Academic Press.
- Pérez-Ruiz, C., & Prado-Alcalá, R. A. (1989). Retrograde amnesia induced by lidocaine injection into the striatum: Protective effect of the negative reinforcer. *Brain Research Bulletin*, 22(4), 599-603.
- Petrovich, G. D., Canteras, N. S., & Swanson, L. W. (2001). Combinatorial amygdalar inputs to hippocampal domains and hypothalamic behavior systems. *Brain Research Reviews*, 38(1-2), 247-289.
- Pokorny, J., & Yamamoto, T. (1981). Postnatal ontogenesis of hippocampal CA1 area in rats. II. Development of ultrastructure in stratum lacunosum and moleculare. *Brain Research Bulletin*, 7(2), 121-130.
- Prado-Alcalá, R. A. (1991). Fisiología del aprendizaje y la memoria. En G. Ninomiya (Ed.), *Fisiología humana. I. Neurofisiología* (pp. 492-508). México: Manual Moderno.
- Prado-Alcalá, R. A. (1995). Serial and parallel processing during memory consolidation. En J. L. McGaugh, F. Bermúdez-Rattoni & R. A. Prado-Alcalá (Eds.), *Plasticity in the central nervous system: learning and memory* (pp. 57-65). New Jersey: Erlbaum.
- Prado-Alcalá, R. A., Haiek, M., Rivas, S., Roldán-Roldán, G., & Quirarte, G. L. (1994). Reversal of extinction by scopolamine. *Physiology & Behavior*, 56(1), 27-30.
- Prado-Alcalá, R. A., Kaufmann, P., & Moscona, R. (1980). Scopolamine and KCl injections into the caudate nucleus. Overtraining-induced protection against deficits of learning. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 12(2), 249-253.
- Prado-Alcalá, R. A., Signoret, L., & Figueroa, M. (1981). Time-dependent retention deficits induced by post-training injections of atropine into the caudate nucleus. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 15(4), 633-636.
- Quatermain, D., & McEwen, B. S. (1970). Temporal characteristics of amnesia induced by protein synthesis inhibitor: determination by shock level. *Nature*, 228(5272), 677-678.
- Quirarte, G. L., Cruz-Morales, S. E., Díaz del Guante, M. A., García, M., & Prado-Alcalá, R. A. (1993). Protective effect of under-reinforcement of passive avoidance against scopolamine-induced amnesia. *Brain Research Bulletin*, 32(5), 521-524.

- Quirarte, G. L., Galvez, R., Roozendaal, B., & McGaugh, J. L. (1998). Norepinephrine release in the amygdala in response to footshock and opioid peptidergic drugs. *Brain Research*, *808*(2), 134-140.
- Quiroz, C., Martínez, I., Quirarte, G. L., Morales, T., Díaz-Cintra, S., & Prado-Alcalá, R. A. (2003). Enhanced inhibitory avoidance learning prevents the memory-impairing effects of post-training hippocampal inactivation. *Experimental Brain Research*, *153*(3), 400-402.
- Restivo, L., Vetere, G., Bontempi, B., & Ammassari-Teule, M. (2009). The formation of recent and remote memory is associated with time-dependent formation of dendritic spines in the hippocampus and anterior cingulate cortex. *The Journal of Neuroscience*, *29*(25), 8206-8214.
- Reynolds, G. S. (1973). *Compendio de condicionamiento operante*. México: Editorial Ciencia de la Conducta.
- Rolls, E. T. (1996). A theory of hippocampal function in memory. *Hippocampus*, *6*(6), 601-620.
- Rusakov, D. A., Davies, H. A., Harrison, E., Diana, G., Richter-Levin, G., Bliss, T. V., & Stewart, M. G. (1997). Ultrastructural synaptic correlates of spatial learning in rat hippocampus. *Neuroscience*, *80*(1), 69-77.
- Saavedra de Camargo, B., Brust-Carmona, H., & Roig, J. A. (1981). Effects of general anesthesia, neodecortication and spreading depression upon somatic evoked responses in caudate and entopeduncular nuclei, and their electrophysiological correlates in cats. *Brain Research Bulletin*, *6*(3), 219-225.
- Salado-Castillo, R., Díaz del Guante, M. A., Alvarado, R., Quirarte, G. L., & Prado-Alcalá, R. A. (1996). Effects of regional GABAergic blockade of the striatum on memory consolidation. *Neurobiology of Learning and Memory*, *66*(2), 102-108.
- Salado-Castillo, R., Sanchez-Alavez, M., Quirarte, G. L., Martinez Garcia, M. I., & Prado-Alcala, R. A. (2011). Enhanced training protects memory against amnesia produced by concurrent inactivation of amygdala and striatum, amygdala and substantia nigra, or striatum and substantia nigra. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *5*, 83.
- Salceda, E., & Ortega, A. (2009). Neurotoxinas: significado biológico y mecanismo de acción. *Elementos*, *74*, 29-37.
- Satin, J., Kyle, J. W., Chen, M., Bell, P., Cribbs, L. L., Fozzard, H. A., & Rogart, R. B. (1992). A mutant of TTX-resistant cardiac sodium channels with TTX-sensitive properties. *Science*, *256* (5060), 1202-1205.
- Schacter, D. L., & Tulving, E. (Eds) (1994). *Memory systems*. Cambridge, MA: MIT Press.
- Schmaltz, L. W., & Theios, J. (1972). Acquisition and extinction of a classically conditioned response in hippocampectomized rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, *79*(2), 328-333.
- Scoville, W. B., & Milner, B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, *20*(1), 11-21.
- Sharp, P. E. (1997). Subicular cells generate similar spatial firing patterns in two geometrically and visually distinctive environments: comparison with hippocampal place cells. *Behavioural Brain Research*, *85*(1), 71-92.

- Solana-Figueroa, R., Salado-Castillo, R., Quirarte, G. L., Galindo, L. E., & Prado-Alcalá, R. A. (2002). Enhanced inhibitory avoidance training protects against the amnesic effect of p-chloroamphetamine. *Life Sciences*, *71*(4), 391-399.
- Sperling, A. D. (1963). A model for visual memory task. *Human Factors*, *5*: 19-31.
- Squire, L. R. (1987). *Memory: and brain*. Oxford: University Press.
- Squire, L. R. (1992). Memory and the hippocampus: A synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychological Review*, *99*(2), 195-231.
- Squire, L. R. (2004). Memory systems of the brain: A brief history and current perspective. *Neurobiology of Learning and Memory*, *82*(3), 171-177.
- Squire, L. R., & Davis, P. H. (1981). The pharmacology of memory: a neurobiological perspective. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *21*, 323-356.
- Squire, L. R., & Kandel, E. R. (1999). *Memory from mind to molecules*. New York: Scientific American Library.
- Squire, L. R., & Zola-Morgan, S. (1988). Memory: brain systems and behavior. *Trends in Neurosciences*, *11*(4), 170-175.
- Stubley-Weatherly, L., Harding, J. W., & Wright, J. W. (1996). Effects of discrete kainic acid-induced hippocampal lesions on spatial and contextual learning and memory in rats. *Brain Research*, *716*(1-2), 29-38.
- Sutherland, R. J., & Rudy, J. W. (1989). Configural association theory: the role of the hippocampal formation in learning, memory, and amnesia. *Psychobiology*, *17*(2), 129-144.
- Swanson, L. W. (1983). The hippocampus and the concept of the limbic system. En W. Seifert (Ed.), *Neurobiology of the hippocampus* (pp. 3-19). London Academic Press.
- Swanson, L. W., Sawchenko, P. E., & Cowan, W. M. (1980). Evidence that the commissural, associational and septal projections of the regio inferior of the hippocampus arise from the same neurons. *Brain Research*, *197*(1), 207-212.
- Szapiro, G., Vianna, M. R., McGaugh, J. L., Medina, J. H., & Izquierdo, I. (2003). The role of NMDA glutamate receptors, PKA, MAPK, and CAMKII in the hippocampus in extinction of conditioned fear. *Hippocampus*, *13*(1), 53-58.
- Terlau, H., Heinemann, S. H., Stuhmer, W., Pusch, M., Conti, F., Imoto, K., & Numa, S. (1991). Mapping the site of block by tetrodotoxin and saxitoxin of sodium channel II. *FEBS Letters*, *293*(1,2), 93-96.
- Thompson, R. (1978). Localization of a 'passive avoidance memory system' in the white rat. *Physiological Psychology*, *6*(3), 263-274.
- Tolman, E. C. (1948). Cognitive maps in rats and men. *Psychological Review*, *55*(4), 189-208.
- Tulving, E. (1972). Episodic and semantic memory. In E. Tulvin and W. Donaldson (Eds), *Organization of Memory* (pp. 381-402). New York: Academic Press.
- Vann, S. D., Brown, M. W., Erichsen, J. T., & Aggleton, J. P. (2000). Fos imaging reveals differential patterns of hippocampal and parahippocampal subfield activation in rats in response to different spatial memory tests. *The Journal of Neuroscience*, *20*(7), 2711-2718.
- Vetere, G., Restivo, L., Novembre, G., Aceti, M., Lumaca, M., & Ammassari-Teule, M. (2011). Extinction partially reverts structural changes associated with remote fear memory. *Learning & Memory*, *18*(9), 554-557.

- Vianna, M. R., Igaz, L. M., Coitinho, A. S., Medina, J. H., & Izquierdo, I. (2003). Memory extinction requires gene expression in rat hippocampus. *Neurobiology of Learning and Memory*, 79(3), 199-203.
- Vinogradova, O. S. (1995). Expression, control, and probable functional significance of the neuronal theta-rhythm. *Progress in Neurobiology*, 45(6), 523-583.
- Walsh, T. J., Tilson, H. A., DeHaven, D. L., Mailman, R. B., Fisher, A., & Hanin, I. (1984). AF64A, a *cholinergic* neurotoxin, selectively depletes acetylcholine in hippocampus and cortex, and produces long-term passive avoidance and radial-arm maze deficits in the rat. *Brain Research*, 321(1), 91-102.
- Weiler, I. J., Hawrylak, N., & Greenough, W. T. (1995). Morphogenesis in memory formation: synaptic and cellular mechanisms. *Behavioural Brain Research*, 66(1-2), 1-6.
- White, N. M., & McDonald, R. J. (1993). Acquisition of a spatial conditioned place preference is impaired by amygdala lesions and improved by fornix lesions. *Behavioural Brain Research*, 55(2), 269-281.
- White, N. M., & McDonald, R. J. (2002). Multiple parallel memory systems in the brain of the rat: A review. *Neurobiology of Learning and Memory*, 77(2), 125-184.
- White, N. M., & Viaud, M. (1991). Localized intracaudate dopamine D2 receptor activation during the post-training period improves memory for visual or olfactory conditioned emotional responses in rats. *Behavioral and Neural Biology*, 55(3), 255-269.
- Winograd, T. (1975). Frame Representations and the Procedural - Declarative Controversy. En D. Bobrow & A. Collins (Eds.), *Representation and understanding: Studies in cognitive science* (pp. 185-210). New York: Academic Press.
- Witter, M. P. (1989). Connectivity of the rat hippocampus. En V. Chan-Palay & C. Kohler (Eds.), *Hippocampus: New Vistas* (pp. 53-69). New York, NY: Alan R. Liss.
- Witter, M. P., & Amaral, D. G. (2004). Hippocampal Formation. En G. Paxinos (Ed.), *The Rat Nervous System* (pp. 635-704). Burlington: Academic Press.
- Yeckel, M. F., & Berger, T. W. (1990). Feedforward excitation of the hippocampus by afferents from the entorhinal cortex: redefinition of the role of the trisynaptic pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(15), 5832-5836.
- Zhuravin, I. A., & Bures, J. (1991). Exent of the tetrodotoxin induced blockade examined by pupillary paralysis elicited by intracerebral injection of the drug. *Experimental Brain Research*, 83, 687-690.



### XIII. ANEXOS

Se anexan dos artículos publicados que se derivaron de este trabajo de tesis:

1. **Garín-Aguilar, M. E.**, Díaz-Cintra, S., Quirarte, G. L., Aguilar-Vázquez, A., Medina, A. C and Prado-Alcalá, R. A. Extinction induces pruning of dendritic spines in hippocampal CA1 depending on strength of training in rats. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 6:12, 2012.
2. **Garín-Aguilar, M. E.**, Medina, A. C., Quirarte, G. L., McGaugh, J. L. and Prado-Alcalá, R. A. Intense aversive training protects memory from the amnestic effects of hippocampal inactivation. *Hippocampus* 24:102-112 (2014).



# Extinction procedure induces pruning of dendritic spines in CA1 hippocampal field depending on strength of training in rats

María E. Garín-Aguilar<sup>1</sup>, Sofía Díaz-Cintra<sup>2</sup>, Gina L. Quirarte<sup>1</sup>, Azucena Aguilar-Vázquez<sup>2</sup>, Andrea C. Medina<sup>1</sup> and Roberto A. Prado-Alcalá<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Neurobiología Conductual y Cognitiva, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Querétaro, Qro., México

<sup>2</sup> Departamento de Neurobiología del Desarrollo y Neurofisiología, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Querétaro, Qro., México

## Edited by:

Antonella Gasbarri, University of  
l'Aquila, Italy

## Reviewed by:

Roberto Galvez, University of Illinois,  
Urbana-Champaign, USA  
Ignacio Gonzalez-Burgos, Instituto  
Mexicano Del Seguro Social, Mexico

## \*Correspondence:

Roberto A. Prado-Alcalá,  
Departamento de Neurobiología  
Conductual y Cognitiva, Instituto de  
Neurobiología, Universidad Nacional  
Autónoma de México, Boulevard  
Juriquilla 3001, Juriquilla, Querétaro.  
Qro. 76230, México.  
e-mail: prado@unam.mx

Numerous reports indicate that learning and memory of conditioned responses are accompanied by genesis of dendritic spines in the hippocampus, although there is a conspicuous lack of information regarding spine modifications after behavioral extinction. There is ample evidence that treatments that typically produce amnesia become innocuous when animals are submitted to a procedure of enhanced training. We now report that extinction of inhibitory avoidance (IA), trained with relatively low foot-shock intensities, induces pruning of dendritic spines along the length of the apical dendrites of hippocampal CA1 neurons. When animals are trained with a relatively high foot-shock there is a high resistance to extinction, and pruning in the proximal and medial segments of the apical dendrite are seen, while spine count in the distal dendrite remains normal. These results indicate that pruning is involved in behavioral extinction, while maintenance of spines is a probable mechanism that mediates the protecting effect against amnesic treatments produced by enhanced training.

**Keywords:** hippocampus, dendritic spines, pruning, extinction, inhibitory avoidance, post-traumatic stress disorder

## INTRODUCTION

It has been reported that treatments that typically produce amnesia become innocuous when administered to animals that have been submitted to an enhanced learning experience. Thus, generalized interference with cholinergic or serotonergic central activity produces amnesia of inhibitory avoidance (IA) trained with relatively low levels of foot-shock, but memory remains intact when higher levels of stimulation are used during training (e.g., Duran-Arevalo et al., 1990; Galindo et al., 2008). Similarly, long-term memory deficits of IA are produced by hindrance of synaptic activity of the striatum, amygdala, and substantia nigra; in contrast, under this circumstance memory is spared after enhanced IA training (Giordano and Prado-Alcalá, 1986; Pérez-Ruiz and Prado-Alcalá, 1989; Parent et al., 1992, 1995; Parent and McGaugh, 1994; Prado-Alcalá, 1995; Cobos-Zapíaín et al., 1996; Salado-Castillo et al., 2011). Recently, it was found that enhanced IA training prevented the typical amnesic effects of cycloheximide, a protein synthesis inhibitor (Díaz-Trujillo et al., 2009). In spite of this evidence, the neurobiological mechanisms of the protective effect of enhanced learning against amnesic treatments remain completely unknown.

The hippocampus is also involved in memory consolidation of IA training, as shown by the deleterious effects of interference with hippocampal activity on retention of this task (Izquierdo et al., 1992; Ambroggi-Lorenzini et al., 1996; Stublely-Weatherly et al., 1996; Martínez et al., 2002), although enhanced learning of this task also protects against amnesia produced by reversible blockade of hippocampal activity (Quiroz et al., 2003).

One structural neuronal change that has been proposed as a substrate of long-term memory is related to changes in dendritic spine density (Horner, 1993; O'Malley et al., 2000; Leuner et al., 2003). There is also a growing body of evidence that strongly suggests that acquisition of novel information induces the development of dendritic spines in the hippocampus in a variety of learning tasks (Mahajan and Desiraju, 1988; Horner, 1993; Moser et al., 1994; Rusakov et al., 1997; O'Malley et al., 2000; Leuner et al., 2003; Restivo et al., 2009), including the one-trial step-through IA task used in the present study (O'Malley et al., 1998). In this case, hippocampal dentate spine density was increased 6 h after training and returned to basal levels at 72 h after training.

Not only is the hippocampus involved in acquisition of conditioned responses, but also in the process of extinction, i.e., in the learned diminution of the conditioned responses following withholding of the unconditioned or reinforcing stimuli (Szapiro et al., 2003; Vianna et al., 2003; Dillon et al., 2008). However, there is a conspicuous lack of information regarding spine formation in this type of learning, and still less regarding extinction of enhanced learning.

The aim of this work was to determine if extinction of an IA response that had been acquired with low, medium, and high (enhanced training) levels of foot-shock promotes spinogenesis in CA1 pyramidal neurons of the hippocampus. If such were the case, then it might represent a possible mechanism for the protective effect of enhanced learning on memory. We now report that IA induces changes in spine density in CA1 pyramidal neurons

of the hippocampus which are dependent on the strength of training.

## MATERIALS AND METHODS

### ANIMALS

All experimental procedures were approved by the Animal Ethics Committee of Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México and were in compliance with the NIH Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals. The subjects were naive male Wistar rats (250–350 g), maintained in a room with a 12 h/12 h light-dark cycle (lights on at 7:00 h), housed individually in acrylic cages with food and tap water *ad libitum*.

Since the main goal of this work was to determine if extinction after enhanced training of IA induces changes in spine density in the hippocampus as compared to regular training, it was necessary to operationally define “enhanced training.” One way to establish such a definition was to test the effects of increasing foot-shock intensities upon resistance to extinction, which is a progressive decline in the magnitude of a conditioned response that is no longer reinforced. It is used as a measure of strength of learning, since resistance to extinction is stronger when the learning experience is also stronger. Therefore, in this experiment, independent groups of rats were given one of three different foot-shock intensities during training in order to find out whether in our experimental conditions a relatively high foot-shock intensity produces stronger resistance to extinction as compared with lower foot-shock intensities. There were 10 rats in each group. The brains of four animals of each group were used to analyze the density of dendritic spines in the CA1 field of the hippocampus.

### APPARATUS

The apparatus is an alley with two distinct compartments of the same size (30 × 30 × 30 cm), separated by a guillotine door. The safe compartment had walls and lid of red-colored acrylic with a floor of stainless steel bars (6 mm in diameter, separated by 9 mm); it was illuminated by a 10W light bulb located in the center of its lid. The other non-illuminated compartment had front and back walls and floor made of stainless steel plates with its end walls and lid constructed of red-colored acrylic. The walls and floor were shaped as a trough, 20 cm wide at the top and 8 cm wide at the bottom. In the middle of the floor, a 1.5 cm slot separated the two stainless steel plates that make up the walls and floor. When in this compartment, the rats were in contact with both plates through which foot-shock was delivered. The apparatus was cleansed with 10% alcohol and rinsed with tap water before and after each rat occupied it. A square-pulse stimulator (Grass model No. S-48), in series with a constant current unit (Grass model No. CCU-1A) generated the foot-shock. Shock delivery and measurement of latencies to cross from one compartment to the other one were accomplished by use of automated equipment. The apparatus was located inside a dark, sound-proof room provided with background masking noise.

### HANDLING

Before the behavioral experiments began each animal was handled by the experimenter. This consisted of gently touching and

holding the rat with both hands using gloves for approximately 5 min for 3 consecutive days. All behavioral observations were carried out between 9:00 h and 13:00 h.

### TRAINING AND EXTINCTION TESTING

On the day of training each animal was put inside the safe compartment; 10 s later the door dividing the two compartments was opened and the latency to cross to the other compartment was measured (training latency). When the animals crossed to this compartment the door was closed and a foot-shock (a train of 50 ms square pulses at 10 Hz) of 1.0, 2.0, or 3.0 mA was delivered. Five seconds later the door was reopened allowing the animal to escape to the safe compartment and the stimulator was turned off; this latency was also measured (escape latency). After 30 s in the safe compartment the animals were put back in their home cages. Starting 24 h after training, extinction of the task was measured on six consecutive days. To this end, the same procedure of training was followed except that the foot-shock was omitted; if the animal did not cross to the second compartment within 600 s a retention latency score of 600 was assigned and the session ended. After the last extinction session, four animals from each group were randomly selected to perform the histological analyses described below. Two control groups were added: one of them was subjected to the same training procedure, except that the foot-shock was not administered (0 mA group;  $n = 3$ ). In the case of this group, once they had crossed to the darker compartment, the door was re-opened after 5 s, and if they did not return to the safe compartment within an additional 5 s, they were gently pushed back into it. Twenty-four hours later, and for six consecutive days, latency to enter the dark compartment was also measured. The animals of the second control group ( $n = 3$ ) were kept under identical living conditions as those of the animals used for the behavioral study, but they never left the bioterium, except for sacrificing (Bio group).

### RAPID GOLGI IMPREGNATION

Right after the sixth test of extinction the selected animals that had been trained, together with those of the 0 mA and Bio groups, were anesthetized with xylazine/ketamine and perfused transcardially with a buffered solution of 10% formalin (pH 7.4). After 24 h the brains were removed from the skull, and one 4 mm block containing the dorsal hippocampus (Bregma  $-2.8$  to  $-4.2$ ; Paxinos and Watson, 2005) was obtained from each animal. Each block of hippocampus was impregnated using the rapid Golgi technique, as modified by Diaz-Cintra et al. (1981). After 12 days, each block was transferred to a solution of 0.75% silver nitrate in double-distilled water for 12 h, washed in 50% alcohol, embedded in low-viscosity nitrocellulose, and cut along the frontal plane at a thickness of 120  $\mu\text{m}$ . Each section was collected in 70% alcohol, dehydrated, and mounted in Entellan medium. Each slide had 16 sections of dorsal hippocampus and was assigned a random number to ensure that observers were blind to the experimental conditions.

### MORPHOMETRIC ANALYSIS

Dendritic spine counts were performed on five complete, well-impregnated neurons of the CA1 dorsal hippocampus of each

rat. This analysis was carried out with an Optiphot-2 Nikon microscope using a 100× objective (Plan-Apochromat, NA 0.8) and an optically calibrated reticule on the ocular 10× eyepiece. Photomicrographs were assembled from images obtained at different focal planes and reconstructed using Helicon Focus 5.1 software (LTD 2010).

The apical dendrites were divided into proximal, medial, and distal segments, where commissural, Schaffer collaterals, and perforant path fibers arrive, respectively (Amaral and Witter, 1989; Yeckel and Berger, 1990; Dudman et al., 2007). We counted the number of spines along a length of 25 μm of three secondary branches of each segment. Thus, three counts per segment were obtained from each neuron. We chose to analyze secondary branches, and not the main dendritic shaft, because the proximal segment of the main apical dendrite is devoid of spines within the first 100 μm from the soma (Megias et al., 2001; present inspection), and, obviously, no meaningful comparisons could have been made if the proximal segment of the main dendrite would have been taken into account. Dendritic spine density was calculated as the number of dendritic spines divided by the 25 μm of the dendritic branch that was analyzed.

## STATISTICAL ANALYSES

Because the measurement of retention was truncated at 600 s, nonparametric statistics were used in analyzing the behavioral results. Independent Kruskal–Wallis analyses of variance were computed for acquisition and escape latencies, and for retention latencies of each of the extinction sessions. When appropriate, the Mann–Whitney *U*-test was used to make comparisons between any two groups.

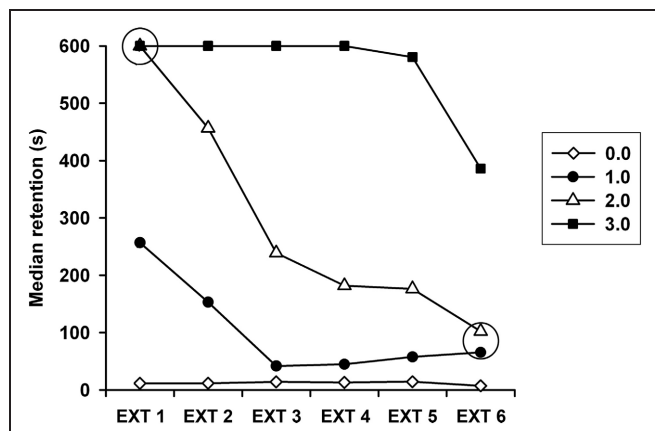
Independent One-Way ANOVAs were used to analyse spine density in each of the three segments of the apical dendrite. This was done because their different innervations (proximal, medial, and distal segments receive commissural, Schaffer collaterals and perforant path fibers, respectively) indicates that these segments are not homogenous neuronal elements but, rather, independent functional compartments. When the *F*-ratios were significant, Duncan's Multiple Range Test was used to determine potential statistical differences of pair-wise comparisons.

## RESULTS

### BEHAVIOR

**Training and escape latencies.** The Kruskal–Wallis test revealed that there were no significant differences among the groups regarding training latencies ( $H(3) = 6.354$ ,  $p = 0.096$ ). Median training latencies of the 0.0, 1.0, 2.0, and 3.0 mA groups were: 13.0, 24.56, 18.13, and 23.1 s, respectively. Because the “escape” latency of the 0 mA group was not shock-motivated, in every rat this latency was higher than the median escape latency of the foot-shocked groups, as expected; for this reason only the 1.0, 2.0, and 3.0 mA groups were included in the Kruskal–Wallis analysis of escape latencies, which yielded non-significant differences among them ( $H(2) = 0.467$ ,  $p = 0.792$ ). Escape latencies of the latter groups were: 1.8, 2.2, and 2.1 s, respectively.

**Figure 1** depicts the retention of the IA behavior of each group during the 6 days of extinction. A very clear differential pattern of resistance to extinction was produced by the various foot-shock

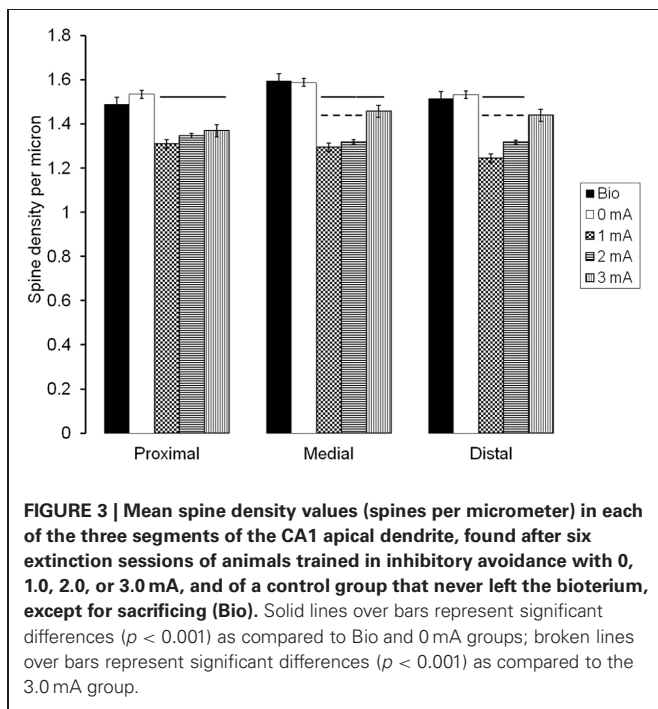
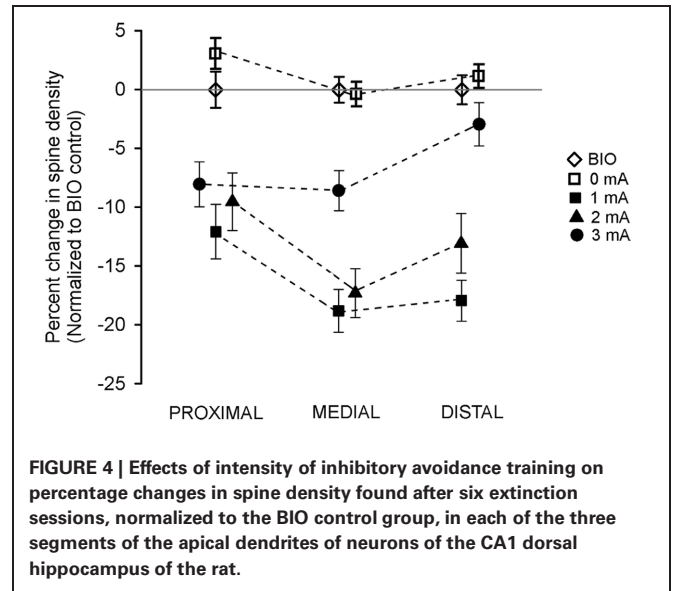
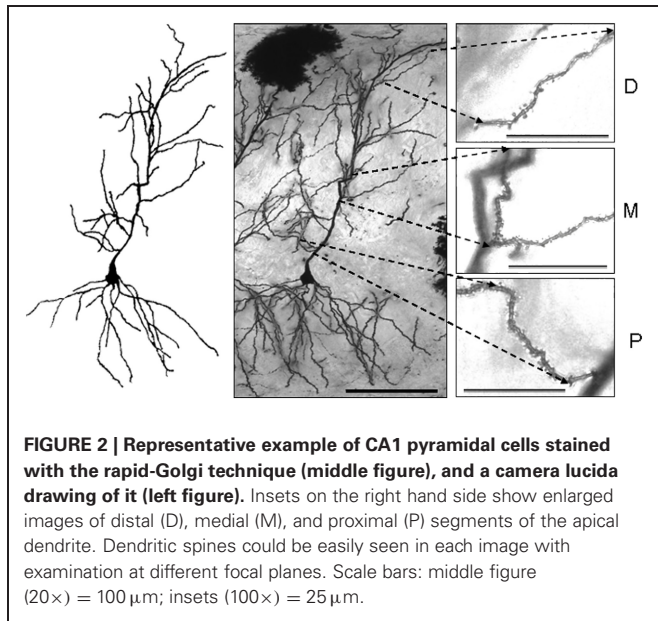


**FIGURE 1 | Median retention latencies across the daily extinction sessions (EXT1–EXT6) displayed by the groups that had been trained in inhibitory avoidance with 1.0, 2.0, or 3.0 mA.** Also shown is the step-through latency of the 0 mA (control) group. On every extinction session retention scores of each group differed significantly from the latency scores of the other groups, except for the two points within the open circles.

intensities used during training. The Kruskal–Wallis test revealed that there were highly significant differences among the groups on each of the six extinction sessions ( $p$ 's < 0.001 for each session). As anticipated, the median latency scores of the 0 mA group were very low, always below 15 s, and they differed from those of the other groups in each session ( $p$ 's ranging from 0.05 to 0.0001). At the other end, the 3.0 mA group displayed near perfect retention latencies on the first five extinction sessions, and a very high score on the sixth session, well above the other groups. Except for the first session, where its retention score did not differ from that of the 2.0 mA group, the 3.0 mA group had a significantly higher retention score than the other groups ( $p$ 's ranging from 0.01 to 0.0001) across the six sessions. The score of the 2.0 mA group was significantly higher than that of the 1.0 mA group through the first five sessions ( $p$ 's between 0.05 and 0.01), and in the sixth session, their performances were quite similar ( $p = 0.684$ ).

### HISTOLOGY

**Figure 2** shows an example of a Golgi-stained pyramidal neuron, and magnified distal, middle and proximal segments where the number of spines was tallied along a length of 25 μm. The statistical analyses revealed that there were highly significant differences in spine density among the groups in the proximal ( $F_{(4,266)} = 9.635$ ,  $p = 0.0001$ ), medial ( $F_{(4,266)} = 26.978$ ,  $p = 0.0001$ ), and distal ( $F_{(4,266)} = 20.245$ ,  $p = 0.0001$ ) segments. The Duncan's Multiple Range Test showed that there were no significant differences in spine density between the Bio and the 0 mA groups in any of the segments (**Figure 3**). Regarding the proximal segment, spine density of the Bio and the 0 mA groups was significantly higher than that of the 1.0, 2.0, and 3.0 mA groups; spine density was not significantly different among the latter three groups. In the medial segment, the Bio and the 0 mA groups also had a higher spine density than the 1.0, 2.0, and 3.0 mA groups; in turn,



the 3.0 mA group showed a higher spine density than the 1.0 and 2.0 mA groups. Finally, in the distal segment, no significant differences among the Bio, 0 mA, and 3.0 mA groups were found; each of these groups differed significantly from the 1.0 and 2.0 mA groups.

Percent change in spine density, relative to the Bio control group is depicted in **Figure 4**. It can be clearly seen the spine pruning in the three segments of the apical CA1 dendrite of all the trained groups, except that the high foot-shock group maintained normal spine density in the distal segment.

### DISCUSSION

This is the first study, to our knowledge, to examine spine plasticity in the hippocampus after a procedure of extinction.

Two main results were obtained. First, as expected, the higher foot-shock intensity induced better learning, i. e., the 3.0 mA group showed significantly higher resistance to extinction, as it performed better than the other groups on the extinction sessions.

The second main finding was that extinction produced pruning of spines in the three segments of the apical dendrite in the groups that had been trained with the lower foot-shock intensities (1.0 and 2.0 mA). Just as interesting was the observation that animals submitted to an enhanced learning experience (3.0 mA group), which produced higher resistance to extinction, showed different spine densities along the length of the apical dendrite: there was pruning in the proximal segment, as was the case for the lower foot-shock groups, a significant increase in spine density in the medial segment, and a spine density that was as high as that of the control groups in the distal segment.

The reduction in spine numbers after extinction was not simply due to exposure to the experimental context nor to habituation to it; this inference can be made because such a reduction in spines was not observed in the group that was “trained” with 0 mA and exposed to the same context for the same number of sessions as the trained, foot-shocked groups.

The presumption that synaptic changes underlie memory storage is not new. On the first half of the twentieth century Pavlov (1927) and Konorski (1948) postulated that conditioning was a form of learning different from that engaged in extinction but that, nonetheless, these two learning processes were associated with the making of new synaptic connections. There is a good deal of experimental support for the notion that learning is associated to genesis of dendritic spines (Rusakov et al., 1997; O’Malley et al., 1998, 2000; Leuner et al., 2003; Marrone, 2007), but it is difficult to find reports dealing with spine dynamics and extinction.

Our results point to one probable mechanism of extinction and of the protective effect of enhanced learning against



interference with long-term memory formation. It was quite clear that those groups that actually showed extinction (1.0 and 2.0 mA groups; **Figure 1**) also presented a significant degree of spine pruning along the three segments of the CA1 apical dendrites (**Figure 3**). In this case, the plastic change induced by extinction was in the form of a reduction of synaptic contacts in the apical dendrite, as can be implied by the reduction of spines, and suggests that extinction is linked to a decrement in excitatory inputs at the postsynaptic site. This finding goes counter to the hypotheses proposed by Pavlov (1927) and Konorski (1948), and clearly shows that the mechanisms underlying the new learned response (extinction) are quite different from that those mediating the original learning of the IA response, where spine density has been found to increase significantly (O'Malley et al., 1998).

On the other hand, the group that was trained with the high-foot-shock intensity (3.0 mA), showed perfect retention of the conditioned response through the first four sessions of extinction, and it was on the fifth session that this response only begun to decline. Thus, it is obvious that the behavior of this group reflected the effects of enhanced training. This heightened resistance to extinction was accompanied by a differential pattern of spine modifications through the length of the CA1 apical dendrite (**Figure 4**). Just as in the case of training with the lower foot-shock intensities, this group showed pruning in the proximal and medial segments of the apical dendrite. However, in the distal segment spine count was not different from the control groups. This interesting result may indicate that the maintenance of the conditioned response of this group, in spite of having been submitted to the process of extinction, may be due, at least in part, to the maintenance of synaptic connections mediated by these dendritic spines. The main afferent fibers of the distal segment of the apical dendrite, the perforant path, arise from the multimodal entorhinal cortex. It is tempting to speculate that this pathway conveys excitatory signals produced by the enhanced learning conditions, thus halting the natural pruning induced by the extinction of the conditioned response.

In a recent and stimulating article, Vetere et al. (2011) studied dendritic spine dynamics after long-term retention of contextual fear conditioning. A significant increase in the density and size of spines was found in the apical dendrites of the anterior cingulate and infralimbic cortices. Interestingly, after extinction of the conditioned response spine density returned to baseline but the proportion of large spines did not in the anterior cingulate cortex; the opposite outcome was seen in the infralimbic cortex. These authors concluded that fluctuations in spine density and spine shape occur in cortical regions during both the formation and the extinction of contextual fear memories. On the other hand, we found that extinction was accompanied by pruning of dendritic spines along the length of the apical dendrites

of hippocampal CA1 cells of rats that had been trained in IA with relatively low foot-shocks, and no change in spine density in the distal dendrite when a high foot-shock was administered. These dissimilar findings show that extinction learning represents a complex phenomenon where different processes take place in different brain regions, which may be dependent upon the type of behavior that is being extinguished.

It is worth mentioning that one distinctive feature of post-traumatic stress disorder (PTSD) is the formation of a strong memory that is highly resistant to extinction (Armario et al., 2008), akin to the memory formed after the enhanced learning of IA described in the present work. Thus, this behavioral model might be useful in the study of the neurobiology of PTSD, and one is tempted to hypothesize that resistance to extinction seen in this pathology could also be mediated by the durability of dendritic spines in the apical dendrites of the hippocampal pyramidal neurons.

To conclude, training of IA with a foot-shock of relatively high intensity (3.0 mA) produced enhanced learning, as shown by the strong resistance to extinction, as compared to the performance of the groups that had been trained with lower foot-shock intensities. After testing under a protocol to produce extinction, there was pruning of dendritic spines along the length of the apical dendrites in neurons of the CA1 field of the hippocampus in the animals that were trained with the lower foot-shock intensities (1.0 and 2.0 mA); these animals showed weak resistance to extinction. The group with the strong resistance to extinction also showed pruning of dendritic spines, but only in the proximal and medial segments of the apical dendrite; normal spine counts were found in the distal segment. Behavioral extinction, evidenced by the low retention scores, may be mediated, in part, by a plastic change in the form of a reduction of synaptic contacts in the apical dendrite, while maintenance of the conditioned response after the extinction protocol may be due, at least in part, to the maintenance of synaptic connections in the distal segment of the apical dendrite.

Further research is needed to put to the experimental test the various interpretations to the results offered in this work.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Ángel Méndez, Norma Serafín, Omar González, Martín García, and Ramón Martínez Olvera for their excellent technical assistance; and Dr. Dorothy Plerss for reviewing and helping us to improve the manuscript. Supported by the National Council of Science and Technology of México (Grant CONACYT 128259) and by PAPIIT-DGAPA-UNAM (Grant IN201712). This work was carried out in partial fulfillment of the requirements to obtain the Doctor's Degree (Doctorado en Ciencias Biomédicas, UNAM) by M. E. Garín-Aguilar, who was a recipient of a Graduate Scholarship from CONACYT (171434).

## REFERENCES

- Amaral, D. G., and Witter, M. P. (1989). The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* 31, 571–591.
- Ambrogio-Lorenzini, C., Baldi, E., Bucherelli, C., Sacchetti, B., and Tassoni, G. (1996). Role of dorsal hippocampus in acquisition, consolidation and retrieval of rat's passive avoidance response: a tetrodotoxin functional inactivation study. *Brain Res.* 730, 32–39.
- Armario, A., Escorihuela, R. M., and Nadal, R. (2008). Long-term neuroendocrine and behavioural effects of a single exposure to stress in adult animals. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 32, 1121–1135.
- Cobos-Zapíaín, G. G., Salado-Castillo, R., Sánchez-Alavez, M., Quirarte, G. L., Roldán-Roldán, G., Díaz del Guante, M. A., and Prado-Alcalá, R. A. (1996). High level of foot-shock during inhibitory avoidance training prevents amnesia induced by intranigral injection of GABA antagonists. *Neurobiol. Learn. Mem.* 65, 202–206.
- Díaz-Cintra, S., Cintra, L., Kemper, T., Resnick, O., and Morgane, P. J.

- (1981). Nucleus raphe dorsalis: a morphometric Golgi study in rats of three age groups. *Brain Res.* 207, 1–16.
- Díaz-Trujillo, A., Contreras, J., Medina, A. C., Silveyra-Leon, G. A., Quirarte, G. L., and Prado-Alcalá, R. A. (2009). Enhanced inhibitory avoidance learning prevents the long-term memory-impairing effects of cycloheximide, a protein synthesis inhibitor. *Neurobiol. Learn. Mem.* 91, 310–314.
- Dillon, G. M., Qu, X., Marcus, J. N., and Dodart, J. C. (2008). Excitotoxic lesions restricted to the dorsal CA1 field of the hippocampus impair spatial memory and extinction learning in C57BL/6 mice. *Neurobiol. Learn. Mem.* 90, 426–433.
- Dudman, J. T., Tsay, D., and Siegelbaum, S. A. (2007). A role for synaptic inputs at distal dendrites: instructive signals for hippocampal long-term plasticity. *Neuron* 56, 866–879.
- Duran-Arevalo, M., Cruz-Morales, S. E., and Prado-Alcalá, R. A. (1990). Is acetylcholine involved in memory consolidation of over-reinforced learning? *Brain Res. Bull.* 24, 725–727.
- Galindo, L. E., Garín-Aguilar, M. E., Medina, A. C., Serafin, N., Quirarte, G. L., and Prado-Alcalá, R. A. (2008). Acquisition and retention of enhanced active avoidance are unaffected by interference with serotonergic activity. *Behav. Brain Res.* 195, 153–158.
- Giordano, M., and Prado-Alcalá, R. A. (1986). Retrograde amnesia induced by post-trial injection of atropine into the caudate-putamen. Protective effect of the negative reinforcer. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 24, 905–909.
- Horner, C. H. (1993). Plasticity of the dendritic spine. *Prog. Neurobiol.* 41, 281–321.
- Izquierdo, I., Da Cunha, C., Rosat, R., Jerusalinsky, D., Ferreira, M. B., and Medina, J. H. (1992). Neurotransmitter receptors involved in post-training memory processing by the amygdala, medial septum, and hippocampus of the rat. *Behav. Neural Biol.* 58, 16–26.
- Konorski, J. (1948). *Conditioned Reflexes and Neuron Organization*. Cambridge, MA: Cambridge University Press.
- Leuner, B., Falduto, J., and Shors, T. J. (2003). Associative memory formation increases the observation of dendritic spines in the hippocampus. *J. Neurosci.* 23, 659–665.
- Mahajan, D. S., and Desiraju, T. (1988). Alterations of dendritic branching and spine densities of hippocampal CA3 pyramidal neurons induced by operant conditioning in the phase of brain growth spurt. *Exp. Neurol.* 100, 1–15.
- Marrone, D. F. (2007). Ultrastructural plasticity associated with hippocampal-dependent learning: a meta-analysis. *Neurobiol. Learn. Mem.* 87, 361–371.
- Martínez, I., Quirarte, G. L., Díaz-Cintra, S., Quiroz, C., and Prado-Alcalá, R. A. (2002). Effects of lesions of hippocampal fields CA1 and CA3 on acquisition of inhibitory avoidance. *Neuropsychobiology* 46, 97–103.
- Megias, M., Emri, Z., Freund, T. F., and Gulyas, A. I. (2001). Total number and distribution of inhibitory and excitatory synapses on hippocampal CA1 pyramidal cells. *Neuroscience* 102, 527–540.
- Moser, M. B., Trommald, M., and Andersen, P. (1994). An increase in dendritic spine density on hippocampal CA1 pyramidal cells following spatial learning in adult rats suggests the formation of new synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 12673–12675.
- O'Malley, A., O'Connell, C., Murphy, K. J., and Regan, C. M. (2000). Transient spine density increases in the mid-molecular layer of hippocampal dentate gyrus accompany consolidation of a spatial learning task in the rodent. *Neuroscience* 99, 229–232.
- O'Malley, A., O'Connell, C., and Regan, C. M. (1998). Ultrastructural analysis reveals avoidance conditioning to induce a transient increase in hippocampal dentate spine density in the 6 hour post-training period of consolidation. *Neuroscience* 87, 607–613.
- Parent, M. B., and McGaugh, J. L. (1994). Posttraining infusion of lidocaine into the amygdala basolateral complex impairs retention of inhibitory avoidance training. *Brain Res.* 661, 97–103.
- Parent, M. B., Quirarte, G. L., Cahill, L., and McGaugh, J. L. (1995). Spared retention of inhibitory avoidance learning after posttraining amygdala lesions. *Behav. Neurosci.* 109, 803–807.
- Parent, M. B., Tomaz, C., and McGaugh, J. L. (1992). Increased training in an aversively motivated task attenuates the memory-impairing effects of posttraining N-methyl-D-aspartate-induced amygdala lesions. *Behav. Neurosci.* 106, 789–797.
- Pavlov, I. P. (1927). *Conditioned Reflexes: An Investigation of the Physiological Activity of the Cerebral Cortex*. London: Oxford University Press.
- Paxinos, G., and Watson, C. (2005). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. San Diego, CA: Academic Press.
- Pérez-Ruiz, C., and Prado-Alcalá, R. A. (1989). Retrograde amnesia induced by lidocaine injection into the striatum: protective effect of the negative reinforcer. *Brain Res. Bull.* 22, 599–603.
- Prado-Alcalá, R. A. (1995). “Serial and parallel processing during memory consolidation,” in *Plasticity in The Central Nervous System: Learning and Memory*, eds J. L. McGaugh, F. Bermúdez-Rattoni, and R. A. Prado-Alcalá (New Jersey: Erlbaum), 57–65.
- Quiroz, C., Martínez, I., Quirarte, G. L., Morales, T., Díaz-Cintra, S., and Prado-Alcalá, R. A. (2003). Enhanced inhibitory avoidance learning prevents the memory-impairing effects of post-training hippocampal inactivation. *Exp. Brain Res.* 153, 400–402.
- Restivo, L., Vetere, G., Bontempi, B., and Ammassari-Teule, M. (2009). The formation of recent and remote memory is associated with time-dependent formation of dendritic spines in the hippocampus and anterior cingulate cortex. *J. Neurosci.* 29, 8206–8214.
- Rusakov, D. A., Davies, H. A., Harrison, E., Diana, G., Richter-Levin, G., Bliss, T. V., and Stewart, M. G. (1997). Ultrastructural synaptic correlates of spatial learning in rat hippocampus. *Neuroscience* 80, 69–77.
- Salado-Castillo, R., Sánchez-Alavéz, M., Quirarte, G. L., Martínez García, M. I., and Prado-Alcalá, R. A. (2011). Enhanced training protects memory against amnesia produced by concurrent inactivation of amygdala and striatum, amygdala and substantia nigra, or striatum and substantia nigra. *Front. Behav. Neurosci.* 5:83. doi: 10.3389/fnbeh.2011.00083.
- Stubley-Weatherly, L., Harding, J. W., and Wright, J. W. (1996). Effects of discrete kainic acid-induced hippocampal lesions on spatial and contextual learning and memory in rats. *Brain Res.* 716, 29–38.
- Szapiro, G., Vianna, M. R., McGaugh, J. L., Medina, J. H., and Izquierdo, I. (2003). The role of NMDA glutamate receptors, PKA, MAPK, and CAMKII in the hippocampus in extinction of conditioned fear. *Hippocampus* 13, 53–58.
- Vetere, G., Restivo, L., Novembre, G., Aceti, M., Lumaca, M., and Ammassari-Teule, M. (2011). Extinction partially reverts structural changes associated with remote fear memory. *Learn. Mem.* 18, 554–557.
- Vianna, M. R., Igaz, L. M., Coitinho, A. S., Medina, J. H., and Izquierdo, I. (2003). Memory extinction requires gene expression in rat hippocampus. *Neurobiol. Learn. Mem.* 79, 199–203.
- Yeckel, M. F., and Berger, T. W. (1990). Feedforward excitation of the hippocampus by afferents from the entorhinal cortex: redefinition of the role of the trisynaptic pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 5832–5836.

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 30 January 2012; paper pending published: 14 February 2012; accepted: 01 March 2012; published online: 16 March 2012.

Citation: Garín-Aguilar ME, Díaz-Cintra S, Quirarte GL, Aguilar-Vázquez A, Medina AC and Prado-Alcalá RA (2012) Extinction procedure induces pruning of dendritic spines in CA1 hippocampal field depending on strength of training in rats. *Front. Behav. Neurosci.* 6:12. doi: 10.3389/fnbeh.2012.00012  
Copyright © 2012 Garín-Aguilar, Díaz-Cintra, Quirarte, Aguilar-Vázquez, Medina and Prado-Alcalá. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non Commercial License, which permits non-commercial use, distribution, and reproduction in other forums, provided the original authors and source are credited.

# Intense Aversive Training Protects Memory From the Amnestic Effects of Hippocampal Inactivation

María E. Garín-Aguilar,<sup>1</sup> Andrea C. Medina,<sup>2</sup> Gina L. Quirarte,<sup>2</sup> James L. McGaugh,<sup>3</sup> and Roberto A. Prado-Alcalá<sup>2\*</sup>

**ABSTRACT:** There is extensive evidence that amnestic treatments are less effective, or ineffective when administered to subjects that have been overtrained or subjected to high foot-shock intensities in aversively motivated learning. This protective effect has been found with a variety of learning tasks and with treatments that disrupt activity in several regions of the brain, including the hippocampus, amygdala, striatum, and substantia nigra. Such findings have been interpreted as suggesting that the brain regions disrupted are not critical sites for the memory processes induced by these types of training. In most experiments investigating this issue the amnestic treatments were administered after training. Thus, it might be less amnesia was induced because the training accelerated memory consolidation and, thus, the maximum effect of the amnestic treatment occurred after memory of the learning experience was consolidated. This study investigated this issue by inactivating the hippocampus of rats bilaterally with tetrodotoxin (TTX) (10 ng/side) 30 min before one-trial inhibitory avoidance training using relatively low (1.0 mA), medium (2.0 mA), or high (3.0 mA) foot-shock intensities. Retention of the task was measured 48 h after training. TTX produced a profound retention deficit, a mild deficit, and no deficit at all in the 1.0, 2.0, and 3.0 mA groups, respectively. These data confirm the protective effect of training with relatively high foot-shock intensity against experimentally induced amnesia, and suggests that this protection is not due to accelerated consolidation. Rather, the findings suggest that strong training activates brain systems other than those typically involved in mediating memory consolidation. © 2013 Wiley Periodicals, Inc.

**KEY WORDS:** long-term memory; inhibitory avoidance; habituation; overtraining; TTX

## INTRODUCTION

The concept of memory consolidation first proposed over a century ago by Müller and Pilzecker (1900), has guided, directly or indirectly, most of the research on the mechanisms of memory. Simply stated, consolidation refers to the time-dependent processes by which the information derived from a learning experience can be transferred from a short-term, labile store to a long-term stable memory store. A great deal of experimental data has given strong support to this hypothesis as it has consistently been found that interference with brain activity shortly after a learning experience produces incapacity to remember that experience, but increasing the interval between learning and such interference allows for better memory. The lack of effect on memory when treatments that affect brain functioning is administered several hours after learning is taken as evidence of memory consolidation (McGaugh, 1966; McGaugh and Herz, 1972; Weingartner and Parker, 1984; Lechner et al., 1999; McGaugh, 2000).

Most of the evidence supporting the consolidation theory has been provided by experiments in which subjects are trained to perform a task after a relatively small number of trials or training sessions, or are subjected to relatively low levels of aversive stimulation. Although amnestic influences have been rarely studied in experiments using intensive training, the available findings have consistently indicated that amnestic treatments become ineffective or less effective when animals are extensively trained or given relatively high intensities of foot-shock for training (Prado-Alcalá et al., 2012). This effect has been observed after systemic administration of amnestic treatments (Durán-Arévalo et al., 1990; Cruz-Morales et al., 1992; Solana-Figueroa et al., 2002; Díaz-Trujillo et al., 2009) as well as localized treatments affecting the striatum (STR), amygdala (AMY), substantia nigra (SN), and hippocampus, among other cerebral structures (Thatcher and Kimble, 1966; Prado-Alcalá and Cobos-Zapíaín, 1977, 1979; Prado-Alcalá et al., 1980; Parent et al., 1992, 1994; Cobos-Zapíaín et al., 1996; Lazaro-Muñoz et al., 2010). Such findings have been interpreted as suggesting that the affected structures are not critical sites for the changes mediating

<sup>1</sup>Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Tlalnepantla, Edo. de México, México; <sup>2</sup>Instituto de Neurobiología, Campus UNAM Juriquilla, Universidad Nacional Autónoma de México, Querétaro, México; <sup>3</sup>Center for the Neurobiology of Learning and Memory, Department of Neurobiology and Behavior, University of California, Irvine, California

Grant sponsor: CONACYT; Grant numbers: 128259 and 130524; Grant sponsor: PAPIIT-DGAPA-UNAM; Grant numbers: IN201712 and IN214111; Grant sponsor: Graduate Scholarship from CONACYT; Grant number: 171434.

Abbreviations used: AMY, amygdala; FS, formalin solution; IA, inhibitory avoidance; SN, substantia nigra; STR, striatum; TTX, tetrodotoxin; VEH, vehicle

\*Correspondence to: Dr. Roberto A. Prado-Alcalá, Institute of Neurobiology, National University of Mexico, Boulevard Juriquilla 3001, Juriquilla Querétaro, Qro., 76230, México, E-mail: prado@unam.mx

Accepted for publication 16 September 2013.

DOI 10.1002/hipo.22210

Published online 1 November 2013 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).



associations based on overtraining or strong aversive stimulation, which engages other brain regions subserving memory processing.

Most studies investigating this issue have used post-training administration of amnesic treatments (for a recent review see Prado-Alcalá et al., 2012). Thus, the treatments may not have produced amnesia because overtraining or training with relatively high aversive stimulation may have accelerated consolidation. Thus, the maximal effects of the pharmacologic agents may have occurred after consolidation was largely completed. The possibility of experimentally induced acceleration of consolidation was first proposed by Bivens and Ray (1966). They reported that rats injected with low doses of strychnine before inhibitory avoidance (IA) training and given electroconvulsive shocks shortly after training had better retention than that of saline-injected controls when tested 24 h later. These findings were interpreted as indicating that strychnine accelerated consolidation. This novel idea received further support by the finding that immediate post-training inactivation of the basolateral nucleus of the AMY produced a significant impairment of one-trial IA memory produced by either low or high footshock intensities. However, when the inactivation was delayed 6 h the retention deficit was still evident in the low footshock group but not in the high footshock group. The findings suggested that the more intense stimulation produced by the higher footshock may have accelerated the consolidation process and thus decreased the duration of basolateral AMY involvement in the retention of IA learning (Parent and McGaugh, 1994).

The IA task and other learning tasks that entail the use of spatial/contextual cues are hippocampus-dependent (Jarrard, 1993; Izquierdo and Medina, 1997; Eichenbaum, 2004; Izquierdo et al., 2008). Impairment of IA memory can be produced by a variety of treatments administered before or immediately after training or before retention testing; such treatments include lesions, temporary inactivation and administration of drugs that interfere with hippocampal synaptic activity and metabolic cascades necessary for memory consolidation (Ambrogio Lorenzini et al., 1996; Stubley-Weatherly et al., 1996; Izquierdo and Medina, 1997; Martínez et al., 2002; Quiroz et al., 2003).

Other research has shown that increasing the magnitude of aversive stimulation used during IA training attenuates the amnesic effect usually produced by post-training inactivation of the hippocampus (Quiroz et al., 2003), suggesting that a functioning hippocampus is not essential for the consolidation of intensely emotional information. The recruitment of other brain systems appears to enable the storage of such information (Ambrogio Lorenzini et al., 1999). This interpretation may also provide an explanation of the finding that extensive training attenuates the amnesic effects of treatments administered shortly after training into the AMY, SN, and STR (Salado-Castillo et al., 2011; Prado-Alcalá et al., 2012).

Although there is evidence suggesting that training with high intensities of foot-shock protects memory from treatments that disrupt the functioning of several brain systems involved in memory consolidation, it is not established that the protective effect is due to accelerated consolidation. These experiments

examined this issue by administering the amnesic treatment prior to training, using tetrodotoxin (TTX) which inactivated the hippocampus during training and for a period after training during which consolidation would normally occur. Thus, there was no period of hippocampal activity during or after learning and an interpretation concerning post-training activity of the hippocampus involved in consolidation could be excluded.

## MATERIALS AND METHODS

### Subjects

The experimental protocols reported in this article were carried out following the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, and were approved by the Ethics Committee of the Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México.

The subjects were male Wistar rats (250–350 g) obtained from the colony maintained at the Instituto de Neurobiología. They were housed individually in acrylic cages in a room with 12 h of artificial light beginning at 7:00 a.m. Food and water were always available. The temperature of the various rooms in which they were reared and maintained was  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ .

### Surgical Procedures

The rats were anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg, ip), received atropine sulphate (1 mg/kg, ip) and positioned in a stereotaxic instrument (Stoelting, IL). Stainless steel guide cannulae (23-gauge) were bilaterally implanted into the dorsal hippocampus ( $AP = -4.1$ ,  $L \pm 2.5$ ,  $V = 3.1$  below skull surface); the nose bar was set at  $-3.3$  mm from the interaural line (Paxinos and Watson, 2007). The cannulae were affixed to the skull using two screws and dental acrylic, and a stylet was inserted in each cannula and retained there at all times except during the injections. Immediately after surgery, the animals received an intramuscular injection of penicillin (6,000 units) and were allowed 7 days to recover from surgical procedures before initiation of training.

### Behavioral Procedures

#### *Inhibitory avoidance*

Training and testing were carried out in a conditioning box with two distinct compartments of the same size (30 cm  $\times$  30 cm  $\times$  30 cm), separated by a guillotine door. The safe compartment had walls and lid of red-colored acrylic with a floor of stainless steel bars (6 mm in diameter, separated by 9 mm); it was illuminated by a 10 W light bulb located in the center of its lid. The other non-illuminated compartment had front and back walls and floor made of stainless steel plates with its end walls and lid constructed of red-colored acrylic. The walls and floor were shaped as a trough, 20-cm wide at the top and 8-cm wide at the bottom. In the middle of the floor, a 1.5 cm

slot separated the two stainless steel plates that make up the walls and floor. When in this compartment, the rats were in contact with both plates through which foot-shock was delivered. The apparatus was cleansed with 10% alcohol and rinsed with tap water before and after each rat occupied it. A square-pulse stimulator (Grass model No. S-48), in series with a constant current unit (Grass model No. CCU-1A) generated the foot-shock. Shock delivery and measurement of latencies to cross from one compartment to the other one were accomplished by use of automated equipment. The apparatus was located inside a dark, sound-proof room provided with background masking noise.

On the day of training each animal was put inside the safe compartment; 10 s later the door dividing the two compartments was opened and the latency to cross to the other compartment was measured (training latency). When the animals crossed to this compartment the door was closed and the stimulator was turned on (shock parameters: a train of 50 ms square pulses at 10 Hz, of 1.0, 2.0, or 3.0 mA); five s after shock onset the door was reopened allowing the animal to escape to the safe compartment and the stimulator was turned off; this latency was also measured (escape latency). After 30 s in the safe compartment the animals were put back in their home cages. Forty-eight hours later, during the retention test, the same procedure was followed except that the foot-shock was not delivered; if the animal did not cross to the second compartment within 600 s a retention latency score of 600 was assigned and the session ended.

### ***Motor activity after inhibitory avoidance training***

To discern if a high latency score shortly after training represents good short-term memory of IA (Experiment 3), it was necessary to discard the possibility that a high latency simply reflects a generalized fear response that inhibits motor behavior (freezing) produced by the foot-shock shortly after training. To this end, the motor behavior inside the safe compartment of the IA conditioning box was video-taped, and the duration of horizontal displacements, frequency of rearing, and total time of rearing were measured during 10 min, 30 min after training by two expert observers after the video sessions. The transparent guillotine door was shut, but the animals were able to see the shock compartment through it.

### ***Spontaneous motor activity and habituation***

Spontaneous motor activity was recorded in a four-cage (42 cm × 42 cm × 36 cm) automated VersaMax System (AccuScan Instruments, INC., Columbus, OH). Animal activity was measured via a grid of infrared light beams. Sixteen equally spaced beams traverse each animal cage from front to back, and an equal number of beams traverse the same cage from left to right, 2.5 cm above the floor. The body of the animal placed in the VersaMax monitor causes some of these beams to be interrupted, thus revealing its position in the X–Y planes. Motor activity was inferred from the counts obtained from beam crossings grouped into 5 min bins within the 1-h

sessions; two sessions were given, 48 h apart. Recording motor activity through the 1-h sessions also permitted studying the effects of hippocampal inactivation on habituation learning.

### ***Handling***

Before the behavioral experiments began each animal was handled by the experimenter. This consisted of gently touching and holding the rat with both hands using gloves for approximately 5 min for three consecutive days. All behavioral observations were carried out between 9:00 h and 13:00 h.

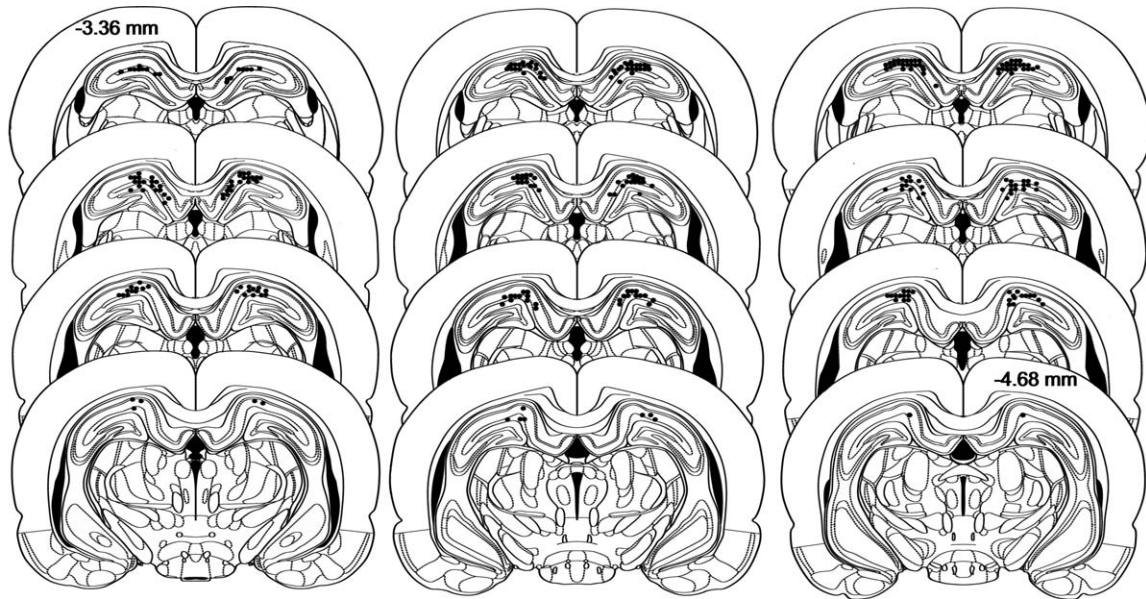
### ***Microinjection Procedure***

The involvement of many brain regions, including the hippocampus, in memory processes has been confirmed with the use of TTX infusions (e.g., Ambrogio Lorenzini et al., 1996, 1999; Quiroz et al., 2003). This drug reversibly blocks voltage-dependent sodium channels, thus impeding the initiation and propagation of action potentials (Choudhary et al., 2003). We have shown that infusions of TTX (10 ng/1 μL) into the dorsal hippocampus impair neural activity, as measured by a decrease of kainic acid-induced c-fos activation, which is evident for at least during the first 90 min after injection. C-fos expression returns to control levels within 48 h after the TTX injection. The inactivation extended 2.5 mm across the longitudinal axis of the DH (Quiroz et al., 2003). Other research has shown that the maximal effect of TTX is reached at 25 min after injection into the Eddinger-Wetsfall nucleus (Zhuravin and Bures, 1991), and it suppresses neuronal activity for about 24 h (Zhuravin and Bures, 1991; Boehnke and Rasmusson, 2001).

Because the maximal inactivating effect of TTX is achieved 25 min after injection, and because it has been estimated that the involvement of the dorsal hippocampus in memory consolidation lasts less than 90 min in the case of IA learning (Ambrogio Lorenzini et al., 1996), the bilateral infusions of TTX (Sigma, C<sub>11</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>, T8024; 10 ng/hemisphere, dissolved in 1 μL of isotonic saline) were made 30 min before training, through 30-gauge injection needles connected to a Hamilton microsyringe by polyethylene tubing. The injection needles were inserted into the guide cannulae and protruded 0.5 mm beyond the tip of the cannulae. The infusion rate was 1 μL/min and was controlled by an automated microinfusion pump (WPI, model 220i). Control rats were microinjected with isotonic saline solution, which was used as vehicle (VEH; 1 μL/hemisphere) for dissolving the TTX. At the end of the infusion, the injection needles remained inside the guide cannulae for 60 s to minimize backflow. The injection procedure was carried out in a different room from that in which training and testing took place.

### ***Histological Procedures***

Upon completion of testing, all rats were anesthetized and perfused, intracardially, with isotonic saline followed by a 10% formalin solution (FS), their brains removed and post-fixed with a 10% FS for 2 days, at which time the solution was replaced



**FIGURE 1.** Coronal sections illustrating the distribution of bilateral cannula tips in the dorsal hippocampus, ranging from  $-3.36$  to  $-4.68$  mm relative to Bregma. The number of placements shown is less than actual number of implanted cannulae because of overlapping sites. Redrawn from Paxinos and Watson (2007).

with a 10% FS-30% sucrose solution until sectioning. Sections ( $50\text{-}\mu\text{m}$  thick) were cut on a cryostat and stained with cresyl-violet. The sections were examined under a light microscope, and the location of the injection needle tips was determined.

The histological analysis revealed that in two to three animals per group one or both injection needle tips were not located in the intended target sites. These animals' data were not included in the statistical analyses. Final sample size was 8–14 rats per group. Figure 1 depicts the location of injector tips within the hippocampus in the rats of this study.

## Statistics

Because the measurement of retention of IA and of the duration of horizontal displacements was truncated at 600 s, nonparametric statistics were used in analysing the results. Independent Kruskal-Wallis analyses of variance were computed for training, escape, and retention latencies, as well as on duration of horizontal displacement, frequency of rearing, and total time of rearing. When appropriate, the Mann-Whitney U test was used to make comparisons between any two groups. A two-way analysis of variance with repeated measures on one factor was computed for data derived from measurements of spontaneous motor activity and habituation.

## Experiment 1. Protective Effect of Intense Training Against Intra-Hippocampal TTX-Induced Amnesia

In prior studies using exactly the same training procedures as in this work, we found that training with 3.0 mA produces strong resistance to extinction while training with 2.0 mA indu-

ces lower resistance, and 1.0 mA produces the least resistance to extinction. These results allowed to operationally defining high, medium, and low level of training (Garín-Aguilar et al., 2012). We further found that post-training lidocaine infusion into the SN, STR, or AMY produced strong amnesia in animals trained in IA with 1.0 mA, but training with 2.0 mA protected memory in animals infused with lidocaine into the SN, but not in those infused into the STR, or AMY, and lidocaine was totally ineffective in altering memory when training was conducted with 3.0 mA, regardless of infusion site (Salado-Castillo et al., 2011).

After we determined that in our experimental conditions 3.0 mA effectively induced stronger IA learning than 1.0 and 2.0 mA, we proceeded to test the hypothesis that enhanced learning protects memory against the typical amnesic effects of intrahippocampal TTX, even when training takes place under the inactivating influence of the drug. It was previously reported that post-training TTX infusion into the hippocampus did not disturb memory consolidation of IA trained with a relatively high foot-shock, but did so when a lower intensity was used (Quiroz et al., 2003). Since there was a time gap between training and administration of the TTX, and since it takes about 25 min to achieve its maximal blocking effect, it is possible that the protective effect seen after training with the highest foot-shock intensity was due to an acceleration of the consolidation process, which could have taken place during the time needed to reach the maximal effect of the drug (about 25 min). To test this possibility, we microinjected the TTX 30 min before training. In this manner, the time gap mentioned above was reduced to zero, because the hippocampal blockade would be in effect during the training, and would remain beyond the time needed for normal consolidation of IA (Ambrogio Lorenzini et al., 1996, 1999). Thus, if the animals



showed a retention deficiency when tested 48 h later, the hypothesis of rapid consolidation would receive strong support. On the other hand, if no such deficiency were found, then a different interpretation of the results would be in order.

### Experimental design

Three groups of rats were trained with either 1.0, 2.0, or 3.0 mA. An additional group was studied; it was subjected to the same training procedure, except that the foot-shock was not administered (0 mA group). In the case of this group, once they had crossed to the darker compartment, the door was re-opened after 5 s, and the latency to return to the safe compartment was computed. Thirty minutes before training half the groups was microinjected with VEH, while the other half was microinjected with TTX. Retention latencies were recorded 48 h afterwards.

### Behavioral Results

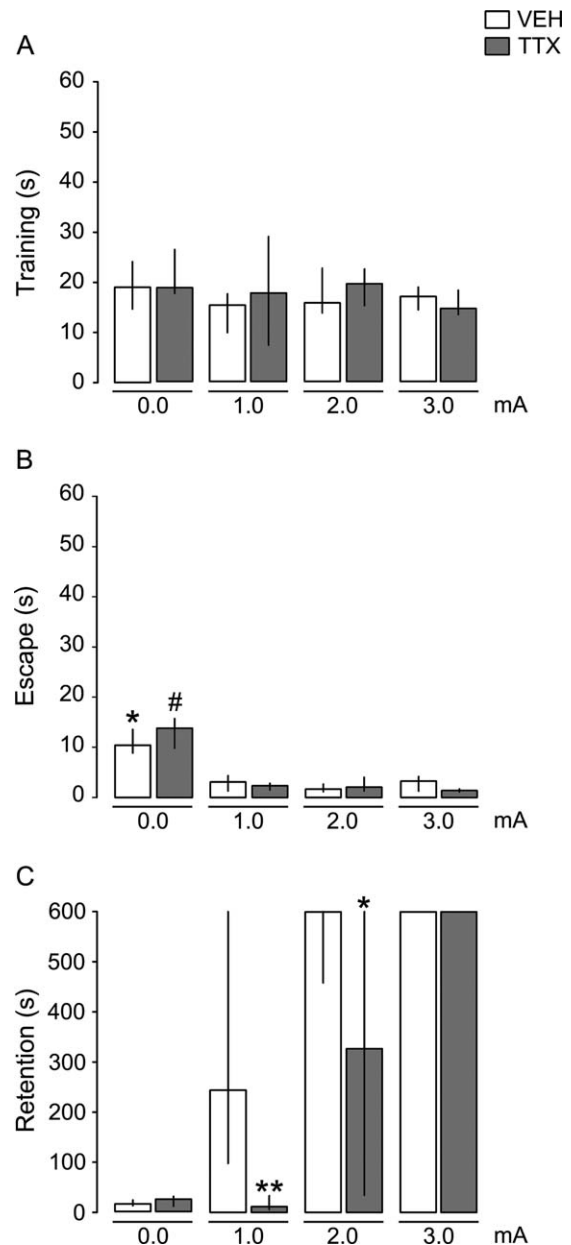
There were no significant differences in training latencies among the VEH groups [ $H(3) = 6.32, P > 0.05$ ], nor among the TTX groups [ $H(3) = 3.03, P > 0.05$ ]. In the case of escape latencies, highly significant differences became evident in both the VEH and TTX groups [ $H(3) = 19.54, P < 0.0005$ , and  $H(3) = 25.48, P < 0.00001$ , respectively]. Regarding the VEH treated groups, the post-hoc Mann-Whitney U test demonstrated that the 0 mA group had significantly higher escape scores than each of the other groups ( $P$ 's ranging from 0.001 to 0.0005), while escape latencies did not differ among the foot-shocked groups. A similar picture emerged when pair wise comparisons were made for the escape latencies of the TTX groups: the 0 mA group showed higher latencies than the rest of the groups ( $P < 0.0005$  for each comparison), and no significant differences were found among the foot-shocked groups. Figure 2 shows these results.

As depicted in Figure 2, highly significant differences were evident when comparing retention scores among the VEH groups [ $H(3) = 25.92, P < 0.0001$ ]. The U tests revealed that there were statistical differences between the 0 mA group and the rest of the groups ( $P < 0.001$  for each comparison); the 1.0 and the 3.0 mA groups also differed significantly ( $P < 0.005$ ).

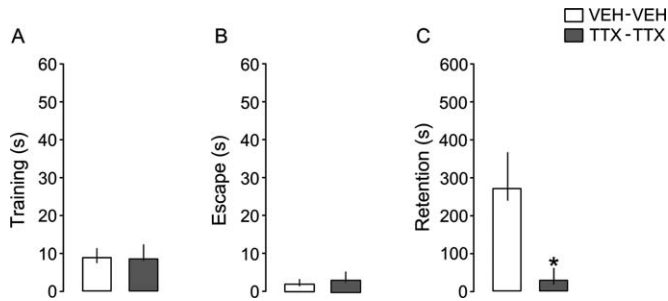
There were also highly significant differences in retention among the groups that had been microinjected with TTX [ $H(3) = 25.4, P < 0.0001$ ]; post-hoc U tests indicated that the 0 and the 1.0 mA groups had significantly lower latencies than the 2.0 and 3.0 mA groups ( $P < 0.001$  for each comparison), and that the latter two groups also differed significantly from each other ( $P < 0.05$ ). Simple paired comparisons (U test) showed that relative to their corresponding VEH-controls, both the 1.0 and 2.0 TTX groups showed significant retention deficits ( $P < 0.0005$  and 0.05, respectively) while the 0 and the 3.0 mA TTX groups did not differ from their control groups.

### Experiment 2. A Test for State-Dependency

Because in Experiment 1 the TTX was administered before training, and retention was measured 48 h afterwards, it might



**FIGURE 2.** Median retention scores (with interquartile range) of groups of rats trained in one-trial IA and injected 30 min before training, with either VEH solution or TTX into the dorsal hippocampus. (A) The TTX and VEH groups displayed similar training latencies, regardless of foot-shock intensity used during training. (B) The TTX and VEH groups that were trained with 0 mA had escape latencies significantly higher than those of the TTX and VEH shocked groups, respectively. There were no significant differences in escape latencies among the groups of rats that had been trained with 1.0, 2.0, or 3.0 mA. \* $P < 0.001$  vs. the 1.0, 2.0, and 3.0 mA VEH groups; # $P < 0.001$  vs. the 1.0, 2.0, and 3.0 mA TTX groups. (C) TTX produced a greater retention deficit when training was carried out with 1.0 mA than when training was carried out with 2.0 mA. TTX was totally ineffective in altering memory when training was conducted with 3.0 mA. The VEH and TTX groups that did not receive foot-shocks did not show retention of the task. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.001$  relative to its control group.



**FIGURE 3.** Median retention scores (with interquartile range) of groups of rats trained in one-trial IA, with 1.0 mA, and injected 30 min before training and 30 min before retention testing, with either isotonic vehicle solution (VEH-VEH) or TTX (TTX-TTX) into the dorsal hippocampus. No significant differences in training (A) or escape (B) latencies between the VEH and TTX groups were found. TTX produced a significant retention deficit which indicates that the poor performance was not due to state-dependency (C). \* $P < 0.005$  relative to the VEH control group.

be argued that the detrimental effects on performance were due to a state-dependent effect and not to disturbance of learning or memory processes. Therefore, in Experiment 2 we investigated the effects of TTX microinjected both before training and before the test of retention; the results indicated that the deficits observed are not due to state-dependency.

### Experimental design

Two groups of rats, trained with 1.0 mA were studied. They received two bilateral microinjections of either VEH (group VEH-VEH) or TTX (group TTX-TTX): one at 30 min before training and the other one at 30 min before the test of retention.

### Behavioral results

As in the previous Experiments, no statistical differences in training ( $P > 0.97$ ) and escape ( $P > 0.08$ ) latencies between the groups were found, but a significant retention deficit was produced by the infusion of TTX 30 min before both the training and retention sessions ( $P < 0.001$ ; Fig. 3).

### Experiment 3. Effect of TTX on Short-Term Memory

The previous experiments of this study clearly indicated that pre-training intrahippocampal TTX produced a retention deficit that was not due to state-dependency, and that training with a relatively strong aversive stimulation protected memory against the typical amnesic effect of TTX. It remained to be established whether the amnesic effect of TTX had been produced by interference with acquisition or with consolidation of IA. This information was essential because it would shed light on the important issue of whether training with a high foot-shock exerts its protective effect on acquisition or on consolidation processing. The logic behind this experiment was that if pre-training TTX impeded acquisition (learning), then the ani-

mals would not show any retention when tested shortly after training. On the other hand, if these animals displayed good retention shortly after training, but become amnesic when tested long after training, then one could conclude that the TTX impaired the consolidation process. Alternatively, a high retention latency shown shortly after training might mean that the foot-shock that was administered during IA training produces a generalized fear response that may reduce motor activity.

### Experimental design

Two groups of rats received intrahippocampal infusions of TTX or VEH, 30 min before IA training with 1.0 mA. To test whether TTX had produced its amnesic effect by interfering with learning, a first retention test was conducted 30 min after training; to test if the amnesic effect had interfered with consolidation, a second test was conducted 48 h after training.

To discard the possibility that a high retention score during the short-term memory test might be produced simply because the animals are immobilized as a fear response after the shock, groups of implanted rats were injected with VEH 30 min before training with 0, 1.0, or 3.0 mA and the duration of horizontal displacements, frequency of rearing, and total time of rearing displayed inside the safe compartment were measured during 10 min, 30 min after training by two expert observers after the video sessions.

Because the objective of this experiment was only to assess the effect of the foot-shocks on motor behavior, there was no need to infuse TTX into the hippocampus; the administration of VEH would control for any possible motor dysfunction that might be produced by the implantation of cannulae and injection procedures.

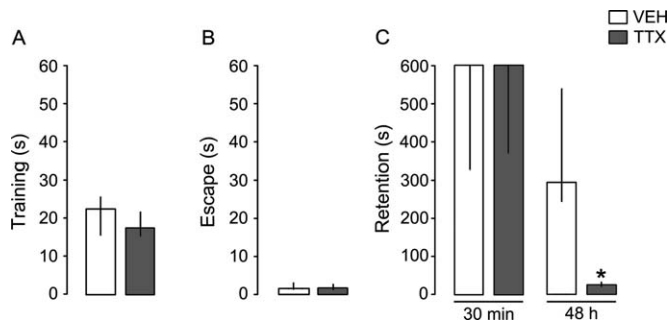
### Behavioral results

The Mann-Whitney U tests demonstrated that there were no significant differences between the VEH and TTX groups in training ( $P > 0.27$ ) and escape ( $P > 0.88$ ) latencies nor in the 30 min ( $P > 0.7$ ) retention session; by contrast, at 48 h after training, a significant retention deficit was evident in the TTX group ( $P < 0.001$  relative to the VEH group), as depicted in Figure 4.

Regarding the measurements of motor activity inside the IA conditioning box, no significant differences were found among the 0, 1.0, and 3.0 mA groups in horizontal displacement [ $H(2) = 2.99$ ,  $P > 0.20$ ], frequency of rearing [ $H(2) = 1.44$ ,  $P > 0.50$ ], nor in total time of rearing [ $H(2) = 1.26$ ,  $P > 0.50$ ]. The reliability between the two observers regarding the measurements of these behaviors was higher than 95% (Fig. 5).

### Experiment 4. Effects of TTX on Motor Activity and Habituation

The statistical analyses indicated that training and escape latencies in the previous three experiments were not different among the various control and experimental groups. This was



**FIGURE 4.** Median retention scores (with interquartile range) of groups of rats trained in one-trial IA, with 1.0 mA, and injected 30 min before training, with either isotonic VEH solution or TTX into the dorsal hippocampus. No significant differences in training (A) or escape (B) latencies between the VEH and TTX groups were found. Retention was measured at 30 min and 48 h after training. TTX did not produce deficiency of short-term (30 min test) but significantly impaired long-term memory (48 h test) (C). \* $P < 0.001$  relative to the VEH control group.

taken as a sign of normal perceptual and motor activity necessary to learn the IA task, regardless of the cognitive impairments produced by the TTX. However, short-term memory was investigated (Experiment 3) at 30 min post-training, (i.e., 60 min after TTX administration) when the animals were still under the influence of the TTX. Thus, the high retention latency could have not necessarily reflected good short-term memory, but instead a sign of akinesia, i.e., a failure to initiate a movement when a movement is required.

Because the neurotoxic drug was administered before the training of IA, it was also possible that the retention deficits produced by the TTX observed 48 h after training might have been due to proactive interference with retention performance, and not to interference with memory processes. This experiment had two purposes: (a) to determine the effects of TTX on spontaneous motor activity at the time intervals comprising those used to measure training and escape latencies, as well as those measured at 30 min and 48 h post-training in the first three experiments, and (b) to appraise the effect of hippocampal blockade on motor habituation, a relatively simple type of learning.

## Experimental design

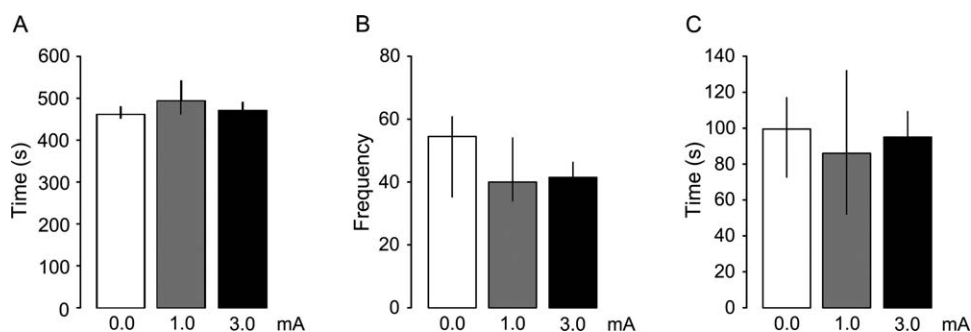
Spontaneous motor activity was recorded in three groups of rats: intact (unimplanted) and microinjected into the hippocampus with VEH or TTX. Thirty minutes after the microinjection cumulative motor activity was measured for an hour, at 5-min intervals. Forty-eight hours later, this activity was recorded again (without microinjections).

## Behavioral results

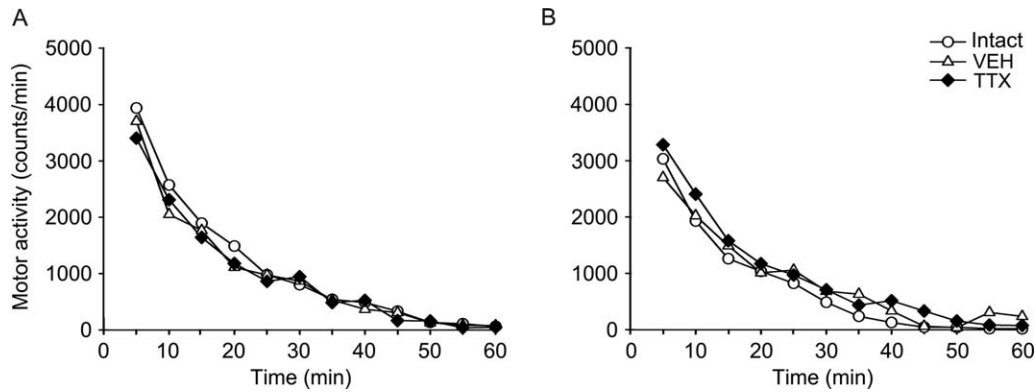
As depicted in Figure 6, on the first day of recording of motor activity, the three groups of animals displayed very similar activity counts, being high at the beginning of the session, and progressively diminishing, becoming practically zero at the end of the session, 1 h later. A repeated measures two-way ANOVA (treatment  $\times$  time) revealed a significant time interval effect [ $F(11,242) = 190.81, P < 0.0005$ ], while the treatment [ $F(2,22) = 0.69, P > 0.50$ ] and the interaction [ $F(22, 242) = 0.79, P > 0.75$ ] yielded no significant effects. The same was true when motor activity was measured 48 h later, i. e., there was a significant time interval effect [ $F(11,242) = 138.94, P < 0.0005$ ], while the treatment [ $F(2,22) = 0.96, P > 0.40$ ] and the interaction [ $F(22, 242) = 1.03, P > 0.43$ ] yielded no significant effects.

## DISCUSSION

The main finding of this study was that increasing the intensity of the IA training foot-shock decreases the memory deficits produced by infusion of TTX into the dorsal hippocampus. When a low foot-shock was used long-term memory was highly impaired: the retention latency of the 1.0 mA TTX group was not higher than its training latency. The retention score of the 2.0 mA TTX group was significantly higher than that of the 1.0 mA TTX group but lower than its own VEH control group and that of the 3.0 mA groups. At the other end, the 3.0 mA TTX group's retention score was as high as that of its VEH control group. The findings of the low-



**FIGURE 5.** Median scores (with interquartile range) of duration of horizontal displacement (A), frequency of rearing (B), and total duration of rearing (C), measured inside of the safe compartment of the conditioning box 30 min after training. No significant differences were found among the groups in any of these measurements. See text for details.



**FIGURE 6.** Cumulative spontaneous motor activity counts were measured at 5-min intervals in a 60-min session in an intact group of rats, and 30 min after TTX or isotonic saline solution (VEH) were infused into the dorsal hippocampus (A). A second session was programmed 48 h later (B). TTX did not produce any motor disturbances at the times when in the previous experiments training and escape latencies, as well as when retention (at 30 min and 48 h) latencies were recorded. All groups showed the same capacity of habituation.

intensity foot-shock groups are consistent with those of many experimental studies reporting evidence that the hippocampus is crucial for long-term memory of spatial/contextual learning (Jarrard, 1993; Maren and Holt, 2000; White and Salinas, 2003; Eichenbaum, 2004; Izquierdo et al., 2008) and, more specifically, for long-term memory of IA learning (Ambrogio Lorenzini et al., 1996; Stublely-Weatherly et al., 1996; Izquierdo et al., 1997; Martínez et al., 2002; Martel et al., 2010). The protective effect of enhanced training of IA reported here is also in agreement with earlier work showing that post-training TTX administration to the hippocampus of rats that had been trained with low-intensity foot-shocks showed amnesia, as expected; however, those rats that had been trained with a higher intensity displayed retention scores that were as high as those of control rats (Quiroz et al., 2003). An equivalent protective effect on memory has been described for other tasks that are dependent, mainly, on the STR and caudate nucleus in rats and cats, respectively. Amnesia of lever pressing for positive reinforcers is produced after temporary inactivation of these structures by potassium chloride. Overtraining, however, totally overcomes this detrimental effect (Prado-Alcalá et al., 1979, 1980).

Even though the results of the Quiroz et al. study (2003) and these results are equivalent, they differ from a conceptual and methodological point of view. In the first case the drug was administered immediately after training while in this study it was administered 30 min before training took place. This procedural difference allows for the important inference that the protective effect of increased training is not due to an acceleration of the consolidation process because with the pre-training injections the animals were trained while the hippocampal activity was blocked. If the protective effect against the amnesic effects of TTX seen after its post-training administration had been due to accelerated consolidation, then such protection should have been absent with the pre-training injections for the reason that the animals were trained while the hippocampal activity was blocked.

It is not clear how training with high-intensity foot-shocks might act to enable memory despite inactivation of the dorsal hippocampus. Some evidence suggests that intense training may induce morphological reorganization. A significant increase in mossy fiber terminals and synaptic density in the CA3 stratum oriens region was produced by three sessions (overtraining) in the spatial version of the Morris water maze, whereas no such changes were observed in rats with just one training session (Ramírez-Amaya et al., 1999). Furthermore, it was recently shown that when animals are trained in IA with a relatively high foot-shock, there is a high resistance to extinction, and pruning of dendritic spines is seen in the proximal and medial segments of the apical dendrite of the CA1 field, whereas the spine count in the distal dendrite remains normal. After training with a relatively low foot-shock, behavioral extinction ensues and pruning is evident in the three segments of the apical dendrite. These results suggest that enhanced training may protect against amnesic treatments by a mechanism involving the maintenance of spines in the distal dendrite of CA1 (Garín-Aguilar et al., 2012).

There is substantial evidence indicating that multiple brain areas are involved in the formation of memory of the IA task (e.g., Ambrogio Lorenzini et al., 1999; Prado-Alcalá et al., 2012), and it has been proposed that different sets of brain structures can support memory at different periods. Thus, experimental evidence strongly suggests that in the case on step-down IA the hippocampus and AMY become engaged in memory processing before the entorhinal and parietal cortices do (Izquierdo et al., 1997). It might be the case that memory is spared after inactivation of the hippocampus when a foot-shock of relatively high intensity is used in training because other structures take over the process of memory consolidation. A similar interpretation was advanced earlier by Bucherelli and Tassoni (1992) who found that bilateral TTX inactivation of the parabrachial nucleus was effective up to 8 days after acquisition in producing amnesia in rats that had been trained with



0.8 mA, while no detrimental effects were evident 2 days after training with 1.2 mA.

Pre-training administration of drugs, as used in this work may, however, confound the results, leading to erroneous interpretations. The pharmacological state of the hippocampus during training, produced by the TTX, differed from that during retention testing as testing occurred in a non-drugged state. Thus, it was important to determine whether our procedure of TTX administration produced state-dependency. Experiment 2 clearly showed that such was not the case: When TTX was infused into the hippocampus both before training and before retention testing, thus producing the same pharmacological state, the amnesic effect was comparable to that produced by pre-training infusion alone (Fig. 3).

Another important issue is that of whether the TTX interfered with memory consolidation or with the processes involved in the acquisition of the conditioned response. An experimental strategy to tackle this problem was used in Experiment 3. Pre-training TTX did not impede acquisition of the task, as optimal retention was displayed at the retention test carried out 30 min post-training. However, amnesia became evident when the same animals were given a second test of retention 48 h later. It is interesting to note that the animals were trained with 1.0 mA and that in the 30-min retention test the VEH control group showed the highest possible score (600 s), just as the TTX group did, while in the 48-h test it had a score of 293.59 s (Fig. 4). These data seem to indicate that the relatively low intensity of the foot-shock was sufficient to induce good learning but it did not produce a strong long-term memory trace. The latter finding agrees well with the 48-h median retention latency displayed by the 1.0 mA group of Experiment 1 (243.9 s) and that of the VEH group of Experiment 2 (268.69 s). These results reflect the reliability of the training procedures.

The possibility that the high latencies observed in the 30 min post-training session might have been due to immobilization produced by the foot-shock can be ruled out because those animals that received 1.0 mA during training displayed horizontal activity, frequency of rearing, and total duration of rearing that were undistinguishable from those of the 0 mA group (Fig. 5). These results agree well with those of Netto and Izquierdo (1985) who showed that there was a fair amount of ambulatory and rearing activities, both immediately and 24 h after training of IA with a relatively low intensity of foot-shock. They also found that training with a higher intensity of foot-shock did produce a significant reduction of motor activity; in our case, however, motor activity remained at the level of the 0 mA control group even after training with the highest current (3.0 mA) (Fig. 5).

Taken together, the results of Experiment 3 indicate that the animals had learned this task, and that the deficiencies in retention seen in Experiments 1 and 2 were due to a deficiency in memory consolidation.

In the first three experiments, the foot-shocked control and TTX-treated groups had comparable step-through and escape latencies. Thus the 48-h retention deficits produced by the TTX were not due to changes in response threshold to the foot-shock or to motor disabilities. Nevertheless, when short-term memory

was measured (Experiment 3), the experimental animals were still under the influence of the TTX and, thus, the high latencies to cross to the shock compartment might have been due to akinesia and not to good recall of the task. Experiment 4 showed that the spontaneous motor activity of the group treated with the TTX was indistinguishable from that of the VEH and the intact groups at any of the 12 5-min intervals that comprised both the post-treatment and the 48 h recording sessions. This result agrees well with earlier reports: hippocampal inactivation by TTX did not change locomotion (Klement et al., 2005) or total distance in a place avoidance task (Kubík et al., 2006). These findings clearly suggest that the intrahippocampal infusion of TTX did not interfere with acquisition or with processes underlying the formation of short-term memory. These results also indicate that the low retention score of the TTX group seen at the 48 h retention test was not due to proactive impairing effects on motor activity that might have been produced by the drug (Fig. 5).

The lack of differences in motor activity among the groups also indicates that blockade of hippocampal activity did not impede the acquisition nor the long-term storage of non-associative learning, i.e., habituation.

Taken together, the findings support the view that the dorsal hippocampus is involved in memory consolidation of the aversively motivated IA task when it is trained with relatively low foot-shock intensities. However, when intense foot-shock was used in training memory was formed even when the activity of the dorsal hippocampus was impaired before, during, and after acquisition of the task, by the pre-training intra-hippocampal administration of TTX. Thus, these findings suggest that the protective effect of intense training against the amnesic effect of TTX infused into the hippocampus is not due to acceleration of the consolidation process. A parsimonious interpretation of these data is that after a strong learning experience hippocampal activity is no longer essential for the formation of long-term memory, and that other cerebral regions become involved in the functions that the hippocampus had in the consolidation process.

## Acknowledgments

The authors thank Ángel Méndez, Norma Serafín, Cloy X. Ruiz López, Omar González, Martín García, Ramón Martínez Olvera, and Teresita de Jesús Pérez Cruz for their excellent technical assistance. This work was carried out in partial fulfillment of the requirements to obtain the Doctor's Degree (Doctorado en Ciencias Biomédicas, UNAM) by M. E. Garín-Aguilar.

## REFERENCES

- Ambrogio-Lorenzini C, Baldi E, Bucherelli C, Sacchetti B, Tassoni G. 1996. Role of dorsal hippocampus in acquisition, consolidation and retrieval of rat's passive avoidance response: A tetrodotoxin functional inactivation study. *Brain Res* 730:32–39.
- Ambrogio-Lorenzini CG, Baldi E, Bucherelli C, Sacchetti B, Tassoni G. 1999. Neural topography and chronology of memory



- consolidation: A review of functional inactivation findings. *Neurobiol Learn Mem* 71:1–18.
- Bivens LW, Ray OS. 1966. Effects of electroconvulsive shock and strychnine sulphate on memory consolidation. *Proc. Fifth Internat. Congr. College Internat. Neuropsychopharmacol* 1030–1034.
- Boehnke SE, Rasmusson DD. 2001. Time course and effective spread of lidocaine and tetrodotoxin delivered via microdialysis: An electrophysiological study in cerebral cortex. *J Neurosci Methods* 105:133–141.
- Bucherelli C, Tassoni G. 1992. Duration of retrograde amnesia induced by tetrodotoxin inactivation of the parabrachial nuclei is inversely related to the intensity of footshock in rat's passive avoidance response. *Behav Brain Res* 49:175–180.
- Choudhary G, Yotsu-Yamashita M, Shang L, Yasumoto T, Dudley SC Jr. 2003. Interactions of the C-11 hydroxyl of tetrodotoxin with the sodium channel outer vestibule. *Biophys J* 84:287–294.
- Cobos-Zapíaín GG, Salado-Castillo R, Sánchez-Alavez M, Quirarte GL, Roldán-Roldán G, Díaz del Guante MA, Prado-Alcalá RA. 1996. High level of footshock during inhibitory avoidance training prevents amnesia induced by intranigral injection of GABA antagonists. *Neurobiol Learn Mem* 65:202–206.
- Cruz-Morales SE, Durán-Arévalo M, Díaz del Guante MA, Quirarte G, Prado-Alcalá R. A. 1992. A threshold for the protective effect of over-reinforced passive avoidance against scopolamine-induced amnesia. *Behav Neural Biol* 57:256–259.
- Díaz-Trujillo A, Contreras J, Medina AC, Silveyra-Leon GA, Antaramian A, Quirarte GL, Prado-Alcalá RA. 2009. Enhanced inhibitory avoidance learning prevents the long-term memory-impairing effects of cycloheximide, a protein synthesis inhibitor. *Neurobiol Learn Mem* 91:310–314.
- Durán-Arévalo M, Cruz-Morales SE, Prado-Alcalá RA. 1990. Is acetylcholine involved in memory consolidation of over-reinforced learning? *Brain Res Bull* 24:725–727.
- Eichenbaum H. 2004. Hippocampus: Cognitive processes and neural representations that underlie declarative memory. *Neuron* 44:109–120.
- Garin-Aguilar ME, Diaz-Cintra S, Quirarte GL, Aguilar-Vazquez A, Medina AC, Prado-Alcala RA. 2012. Extinction procedure induces pruning of dendritic spines in CA1 hippocampal field depending on strength of training in rats. *Front Behav Neurosci* 6:12.
- Izquierdo I, Medina JH. 1997. Memory formation: The sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol Learn Mem* 68:285–316.
- Izquierdo I, Quillfeldt JA, Zanatta MS, Quevedo J, Schaeffer E, Schmitz PK, Medina J H. 1997. Sequential role of hippocampus and amygdala, entorhinal cortex and parietal cortex in formation and retrieval of memory for inhibitory avoidance in rats. *Eur J Neurosci* 9:786–793.
- Izquierdo I, Bevilacqua LM, Rossato J, da Silva WC, Bonini J, Medina JH, Cammarota M. 2008. The molecular cascades of long-term potentiation underlie memory consolidation of one-trial avoidance in the CA1 region of the dorsal hippocampus, but not in the basolateral amygdala or the neocortex. *Neurotox Res* 14:273–294.
- Jarrard LE. 1993. On the role of the hippocampus in learning and memory in the rat. *Behav Neural Biol* 60:9–26.
- Klement D, Pašáľková E, Fenton AA. 2005. Tetrodotoxin infusions into the dorsal hippocampus block non-locomotor place recognition. *Hippocampus* 15:460–471.
- Kubík S, Stuchlík A, Fenton AA. 2006. Evidence for hippocampal role in place avoidance other than merely memory storage. *Physiol Res* 55:445–452.
- Lazaro-Muñoz G, LeDoux JE, Cain CK. 2010. Sidman instrumental avoidance initially depends on lateral and basal amygdala and is constrained by central amygdala-mediated Pavlovian processes. *Biol Psychiatry* 67:1120–1127.
- Lechner HA, Squire LR, Byrne JH. 1999. 100 years of consolidation-Remembering Muller and Pilzecker. *Learn Mem* 6:77–87.
- Maren S, Holt W. 2000. The hippocampus and contextual memory retrieval in Pavlovian conditioning. *Behav Brain Res* 110:97–108.
- Martel G, Jaffard R, Guillou JL. 2010. Identification of hippocampus-dependent and hippocampus independent memory components in step-down inhibitory avoidance tasks. *Behav Brain Res* 207:138–143.
- Martínez I, Quirarte GL, Díaz-Cintra S, Quiroz C, Prado-Alcalá RA. 2002. Effects of lesions of hippocampal fields CA1 and CA3 on acquisition of inhibitory avoidance. *Neuropsychobiology* 46:97–103.
- McGaugh JL. 1966. Time-dependent processes in memory storage. *Science* 153:1351–1358.
- McGaugh JL. 2000. Memory—a century of consolidation. *Science* 287:248–251.
- McGaugh JL, Herz MJ. 1972. *Memory Consolidation*. San Francisco: Albion Publishing Company.
- Müller GE, Pilzecker A. 1900. Experimentelle beiträge zur lehre vom gedächtnis. *Zeitschr Psychol* 1:1–288.
- Netto CA, Izquierdo I. 1985. On how passive is inhibitory avoidance. *Behav Neural Biol* 43:327–330.
- Parent MB, Tomaz C, McGaugh JL. 1992. Increased training in an aversively motivated task attenuates the memory-impairing effects of posttraining N-methyl-D-aspartate-induced amygdala lesions. *Behav Neurosci* 106:789–797.
- Parent MB, West M, McGaugh JL. 1994. Memory of rats with amygdala lesions induced 30 days after footshock-motivated escape training reflects degree of original training. *Behav Neurosci* 108:1080–1087.
- Paxinos G, Watson C. 2007. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 6th ed. San Diego: Academic Press.
- Prado-Alcalá RA, Cobos-Zapíaín GC. 1977. Learning deficits induced by cholinergic blockade of the caudate nucleus as a function of experience. *Brain Res* 138:190–196.
- Prado-Alcalá RA, Cobos-Zapíaín GG. 1979. Interference with caudate nucleus activity by potassium chloride. Evidence for a 'moving' engram. *Brain Res* 172:577–583.
- Prado-Alcalá RA, Kaufmann P, Moscona R. 1980. Scopolamine and KCl injections into the caudate nucleus. Overtraining-induced protection against deficits of learning. *Pharmacol Biochem Behav* 12:249–253.
- Prado-Alcalá RA, Medina AC, Serafín N, Quirarte GL. 2012. Intense emotional experiences and enhanced training prevent memory loss induced by post-training amnesic treatments administered to the striatum, amygdala, hippocampus or substantia nigra. *Rev Neurosci* 23:501–508.
- Quiroz C, Martínez I, Quirarte GL, Morales T, Díaz-Cintra S, Prado-Alcalá RA. 2003. Enhanced inhibitory avoidance learning prevents the memory-impairing effects of post-training hippocampal inactivation. *Exp Brain Res* 153:400–402.
- Ramírez-Amaya V, Escobar ML, Chao V, Bermúdez-Rattoni F. 1999. Synaptogenesis of mossy fibers induced by spatial water maze overtraining. *Hippocampus* 9:631–636.
- Salado-Castillo R, Sanchez-Alavez M, Quirarte GL, Martínez García MI, Prado-Alcala RA. 2011. Enhanced training protects memory against amnesia produced by concurrent inactivation of amygdala and striatum, amygdala and substantia nigra, or striatum and substantia nigra. *Front Behav Neurosci* 5:83.
- Solana-Figueroa R, Salado-Castillo R, Quirarte GL, Galindo LE, Prado-Alcalá RA. 2002. Enhanced inhibitory avoidance training protects against the amnesic effect of p-chloroamphetamine. *Life Sci* 71:391–399.

- Stubley-Weatherly L, Harding JW, Wright JW. 1996. Effects of discrete kainic acid-induced hippocampal lesions on spatial and contextual learning and memory in rats. *Brain Res* 716: 29–38.
- Thatcher RW, Kimble DP. 1966. Effect of amygdaloid lesions on retention of an avoidance response in overtrained and non-overtrained rats. *Psychonomic Sci* 6:9–10.
- Weingartner H, Parker ES. 1984. *Memory consolidation*. Psychobiology of cognition. Hillsdale: Lawrence Erlbaum Associates.
- White NM, Salinas JA. 2003. Mnemonic functions of dorsal striatum and hippocampus in aversive conditioning. *Behav Brain Res* 142:99–107.
- Zhuravin IA, Bures J. 1991. Extent of the tetrodotoxin induced blockade examined by pupillary paralysis elicited by intracerebral injection of the drug. *Exp Brain Res* 83:687–690.