



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**DENSIDAD Y MORFOLOGÍA DE LAS ESPINAS DENDRÍTICAS EN LA
CORTEZA INSULAR RELACIONADAS CON EL APRENDIZAJE NORMAL
E INCREMENTADO DE EVITACIÓN INHIBITORIA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL
GRADO ACADÉMICO DE

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

TZITZI ALHELÍ MARÍN JUÁREZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. ROBERTO AGUSTÍN PRADO ALCALÁ

Cd. Mx., 2016



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.

ÍNDICE

RESUMEN	6
<u>1. INTRODUCCIÓN</u>	7
<u>2. ANTECEDENTES</u>	8
<u>ASPECTOS GENERALES DEL APRENDIZAJE Y LA MEMORIA</u>	8
<u>APRENDIZAJE</u>	8
<u>MEMORIA</u>	10
<u>TAREA DE EVITACIÓN INHIBITORIA COMO HERRAMIENTA PARA EVALUAR EL PROCESO DE LA MEMORIA</u>	12
<u>LA CORTEZA INSULAR Y SU PARTICIPACIÓN EN LA FORMACIÓN DE MEMORIAS</u>	13
<u>ANATOMÍA Y FUNCIÓN DE LA CORTEZA INSULAR</u>	13
<u>PARTICIPACIÓN DE LA CORTEZA INSULAR EN LA MEMORIA DE EVITACIÓN INHIBITORIA</u>	17
<u>EFFECTO PROTECTOR DEL ENTRENAMIENTO INCREMENTADO EN LA TAREA DE EVITACIÓN INHIBITORIA</u>	18
<u>CAMBIOS ESTRUCTURALES ASOCIADOS AL APRENDIZAJE Y LA MEMORIA</u>	21
<u>ESPINAS DENDRÍTICAS</u>	22
<u>TIPOS DE ESPINAS Y SU FUNCIÓN</u>	23
<u>3. JUSTIFICACIÓN</u>	26
<u>4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN</u>	26
<u>5. HIPÓTESIS</u>	27
<u>6. OBJETIVOS</u>	28
<u>OBJETIVO GENERAL</u>	28
<u>OBJETIVOS PARTICULARES</u>	28
<u>7. MATERIALES Y MÉTODOS</u>	28
<u>DIAGRAMA DE TRABAJO</u>	28

<u>SUJETOS</u>	29
<u>EVITACIÓN INHIBITORIA</u>	30
<u>APARATOS</u>	30
<u>PROCEDIMIENTOS CONDUCTUALES</u>	30
<u>TINCIÓN DE GOLGI</u>	33
<u>CUANTIFICACIÓN DE ESPINAS</u>	33
<u>8. RESULTADOS</u>	36
<u>RESULTADOS CONDUCTUALES</u>	36
<u>PRUEBA DE EXTINCIÓN</u>	36
<u>PRUEBA DE EVITACIÓN INHIBITORIA (6 O 24 h DESPUÉS DEL ENTRENAMIENTO)</u>	39
<u>RESULTADOS CONDUCTUALES DE LOS SUJETOS QUE FUERON ANALIZADOS HISTOLÓGICAMENTE</u>	44
<u>RESULTADOS HISTOLÓGICOS</u>	47
<u>GRUPOS CONTROL</u>	47
<u>GRUPOS EXPERIMENTALES</u>	51
<u>9. DISCUSIÓN</u>	56
<u>10. CONCLUSIONES</u>	62
<u>11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	64
12. ANEXOS	71

AGRADECIMIENTOS

A las siguientes personas e instituciones, por el apoyo brindado para la realización de la presente tesis:

A la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, mi casa de estudios, por albergar mi formación como Bióloga.

Al Doctor Roberto Agustín Prado Alcalá por permitirme ingresar a su laboratorio, por brindarme las herramientas y la guía para la elaboración de esta tesis, y por su apoyo incondicional.

A la Doctora Andrea Cristina Medina Fragoso, por su ayuda, sus aportaciones e ideas que sirvieron para mejorar esta tesis.

Al comité de sinodales formado por los doctores Roberto Agustín Prado Alcalá, María Eugenia Garín Aguilar, Andrea Cristina Medina Fragoso, Manuel Arias Montaña y Gustavo Valencia del Toro por sus valiosas correcciones, críticas y comentarios que ayudaron a mejorar el presente trabajo.

A los integrantes del Laboratorio de Aprendizaje y Memoria del instituto de Neurobiología UNAM Campus Juriquilla. A la Doctora Gina Quirarte por su apoyo y guía. Al M.V.Z Norma Serafín López por el apoyo técnico brindado y por ayudarme con las referencias. Al Sr. Ángel Méndez y la Sra. Bertha Islas, por el cuidado de los animales. A mis compañeros quienes hicieron amena mi estancia en el laboratorio, Ame, Dani, Rogelio, Marisol, Sofi, Miguel, Lupita, Jaz, Rodrigo, Rafa y Alex. Un agradecimiento especial a Eve, Cloy, Paola, Cris Siller, Martha y Antonio quienes siempre estuvieron dispuestos a resolver mis dudas.

A la doctora Sofía Díaz Miranda, a la M. en C. Azucena Ruth Aguilar Vázquez y a los integrantes de su laboratorio, por el apoyo brindado en el tiempo que hice uso su microscopio.

A las siguientes personas de las unidades de apoyo del Instituto de Neurobiología Campus UNAM-Juriquilla

Bioterio: M.V.Z José Martín García Servín y Dra. G. Alejandra Castilla León

Cómputo: Ingenieros Ramón Martínez, Alberto Lara y Omar González

Unidad de Microscopía: Nydia Hernández Ríos y Ma. Lourdes Palma Tirado

Biblioteca: Dr. Francisco Javier Valles Valenzuela y Lic. Soledad Medina Malagón

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el donativo de investigación a Roberto A. Prado Alcalá (proyecto 237570)

Al programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico por el donativo de investigación a Roberto A. Prado Alcalá (Proyecto IN201415).

DEDICATORIA

A mi familia

Por su apoyo incondicional y por hacer de mí tal y como soy.

A mi mamá querida (sin ella yo no sería yo) por darme todo su amor y todo lo que tengo.

A mi papá por infundir la ambición del conocimiento en mí.

A la mejor hermana del mundo, por todo lo que hemos pasado juntas y por su cariño incondicional.

A los amigos que he adquirido a lo largo de la vida. En especial a mis amigas de la carrera Miriam, Yadira y Andrea, con las que compartí muchas aventuras.

A Julio Lorea Hernández por siempre apoyarme en la realización de esta tesis, por sus sabios (pero no siempre escuchados) consejos, por sus regaños, porque siempre escuchó mis propósitos, dudas y quejas y porque sin él no habría seguido adelante con este proyecto.

RESUMEN

La corteza insular (CI) participa en la formación de memorias de tareas que involucran experiencias aversivas, como la evitación inhibitoria (EI). La interferencia con la actividad de esta estructura induce deterioros en la memoria de largo plazo (MLP) de esta tarea; sin embargo, cuando se incrementa el nivel de entrenamiento se produce un efecto protector contra dichos deterioros, y aún se desconocen las bases neurobiológicas de este fenómeno. Una propuesta es que las espinas dendríticas representan el sustrato anatómico de la memoria. Las espinas dendríticas son pequeñas protuberancias que surgen de las dendritas y reciben la mayoría de las sinapsis excitadoras; por lo tanto, un incremento en el número de espinas indicaría que hay mayor número de sinapsis. Por otro lado, se ha planteado que diferentes tipos de espinas (delgada, hongo y corta) podrían estar participando en la formación de la memoria. El objetivo de este trabajo fue investigar los cambios en la densidad y tipo de espinas en la CI de ratas entrenadas en la tarea de EI, con un nivel normal o incrementado de entrenamiento. Para ello, se entrenaron ratas de la cepa Wistar con intensidades de choque de 1.0 mA o 3.0 mA y se midió la latencia de retención de la tarea a las 6 o a las 24 h después del entrenamiento. Los cerebros fueron teñidos mediante la técnica de Golgi-Cox. Después, se evaluó la densidad y tipo de espinas de dendritas basales de neuronas piramidales (capa III) de la CI. Únicamente se encontró un incremento significativo en las espinas de tipo hongo de las ratas entrenadas con la intensidad de 1.0 mA y probados a las 24 h. Estos datos sugieren que la CI está involucrada en la MLP en situaciones de entrenamiento moderado, pero no cuando las ratas son sometidas a un alto nivel de entrenamiento.

1. INTRODUCCIÓN

A través de los sentidos los organismos son capaces de interactuar con su entorno, y en ocasiones la presencia de ciertos estímulos inducen modificaciones en la conducta que pueden interpretarse como adquisición de información o conocimiento; a este proceso se le llama aprendizaje (Guillazo, Redolar-Ripoll, Torras-García, & Vale-Martínez, 2007; Varela Ruiz, Ávila Costa, & Fortoul Van der Goes, 2005).

Una vez adquirida la información, ésta es almacenada y más tarde evocada, en forma de memoria (Prado-Alcalá & Quirarte, 1998). En función de la temporalidad, la memoria se clasifica en memoria de corto plazo (MCP) y memoria de largo plazo (MLP). Se ha propuesto que la transición de una MCP a una MLP se lleva a cabo a través de un proceso llamado consolidación (Dudai, 2004). Las bases neurobiológicas de la consolidación y la memoria aún no se comprenden del todo, aunque se ha hipotetizado que la plasticidad estructural, tal como los cambios en la densidad de las espinas dendríticas, forman parte del sustrato de la memoria y el aprendizaje (DeFelipe, 2005; Horner, 1993; Leuner, Falduto, & Shors, 2003; O'Malley, O'Connell, Murphy, & Regan, 2000).

Asimismo se ha sugerido que los cambios en la morfología de las espinas dendríticas, están relacionados a un determinado proceso, ya sea el aprendizaje o la memoria (Bosch & Hayashi, 2012; Harris & Stevens, 1989) de tal manera que la presencia de espinas dendríticas con formas alargadas y delgadas están ampliamente relacionadas con los procesos de aprendizaje, mientras que, aquellas con forma de tipo hongo presentan sinapsis más estables, por lo que se les ha relacionado con los procesos de memoria de largo plazo (Bourne & Harris, 2007).

También existen diferentes reportes que han demostrado que la aplicación de diversos tratamientos químicos que interfieren con el funcionamiento del cerebro pueden producir efectos en el proceso de consolidación propiciando una deficiencia en la memoria (Prado-Alcalá & Quirarte, 2007). Por otro lado, una gran variedad de experimentos han llevado a proponer que algunas estructuras o sistemas de estructuras

son responsables del establecimiento de la MLP (Prado-Alcalá et al., 2007). Un ejemplo de estas estructuras es la corteza insular (CI), que participan en tareas de aversión al sabor y que al parecer participa en tareas de aprendizaje espacial y de evitación inhibitoria (EI) (Bermúdez-Rattoni, Introini-Collison, & McGaugh, 1991; Gutiérrez, Hernández-Echeagaray, Ramírez-Amaya, & Bermúdez-Rattoni, 1999; Zhuravin & Bures, 1991).

De forma interesante, se ha demostrado que el efecto amnésico de tratamientos farmacológicos y lesiones (reversibles e irreversibles) de algunas de las estructuras cerebrales que participan en la formación de la memoria es bloqueado si el sujeto es sometido a un entrenamiento incrementado (Durán-Arévalo, Cruz-Morales, & Prado-Alcalá, 1990; Prado-Alcalá, Medina, Serafín, & Quirarte, 2012).

En la presente tesis se evaluó si existen cambios en la densidad y el tipo de espinas dendríticas de neuronas piramidales de la CI lar de ratas, dependientes del nivel de entrenamiento (moderado e incrementado) de una tarea de EI.

2. ANTECEDENTES

ASPECTOS GENERALES DEL APRENDIZAJE Y LA MEMORIA

APRENDIZAJE

Los organismos adquieren nuevos conocimientos a partir de la información sensorial que reciben de su entorno, el aprendizaje y la memoria están involucrados en el procesamiento de dicha información; además, ambos procesos son importantes para la adaptación y la sobrevivencia de los organismos. Por definición el aprendizaje es el proceso por el cual se genera un cambio relativamente permanente en la conducta, que resulta de la experiencia, que no se debe a la fatiga, a la adaptación sensorial, a algún daño cerebral, a alguna enfermedad, a factores motivacionales, al envejecimiento, a alguna droga o a la maduración del organismo (Prado-Alcalá & Quirarte, 1998; Rescorla, 2007).

El aprendizaje puede clasificarse en aprendizaje no asociativo y asociativo. El aprendizaje no asociativo ocurre cuando un individuo es expuesto a un estímulo

aislado, por lo que el individuo aprende a conocer las características del estímulo sin asociarlo con alguna consecuencia. En este tipo de aprendizaje no es necesario que se establezca una asociación entre estímulo y una respuesta; los principales tipos de este aprendizaje son la habituación (por ejemplo, dejar de prestar atención a los ruidos cotidianos de la calle) y la sensibilización (por ejemplo, un animal responderá con más fuerza a un estímulo táctil leve después de recibir un pellizco doloroso) (Kandel, 2001).

A diferencia del aprendizaje no asociativo, el aprendizaje asociativo implica una asociación entre uno o varios estímulos y una respuesta. Los principales tipos de aprendizaje asociativo son el condicionamiento clásico y el operante.

El condicionamiento clásico consiste en el apareamiento de un estímulo neutro, que no produce respuestas reflejas (estímulo condicionado), con un estímulo que produce una respuesta refleja específica. A este segundo estímulo se le llama estímulo incondicionado; a la respuesta refleja producida por el estímulo incondicionado se le llama respuesta incondicionada. Después de un cierto número de asociaciones, el estímulo condicionado es capaz de producir, por sí solo, la respuesta refleja, que en este caso recibe el nombre de respuesta condicionada (Prado-Alcalá, 1991). El fisiólogo ruso Iván Pavlov en 1927 hizo los primeros estudios sistemáticos de este aprendizaje, usando perros como modelo experimental. En estos experimentos, se hacía sonar una campana como estímulo condicionado, justo antes de darles alimento (estímulo incondicionado). La respuesta natural de los perros ante la comida es salivar, siendo esto una respuesta incondicionada. Después de varias presentaciones del sonido de la campana antes de darles el alimento, los perros asociaron el sonido con el alimento, convirtiendo la respuesta de salivación en una respuesta condicionada. De esta forma cuando los perros escuchaban el sonido de la campana producían la respuesta condicionada de salivar.

Por su parte el condicionamiento operante, que también es llamado instrumental o aprendizaje por ensayo y error, es aquel en el que los organismos pueden estar emitiendo, espontáneamente, un número indeterminado de respuestas que forman parte de su repertorio conductual. Si alguna de esas respuestas es seguida por un evento o estímulo (favorable) para el organismo, entonces esa conducta tenderá a

repetirse. A las respuestas o conductas emitidas por un organismo se les llaman operantes y al estímulo que sigue a la respuesta se le llama reforzador (Prado-Alcalá, 1991). Los primeros estudios realizados con este tipo de aprendizaje fueron realizados por Thordinke en 1903; él privaba de alimento a gatos, después los colocaba en una caja de madera, y para encontrar comida en el exterior, tenían que aprender a abrir el pestillo de la puerta (Prado-Alcalá, 1991).

MEMORIA

La memoria es el proceso de almacenamiento o persistencia de la información adquirida, en un estado que puede ser utilizada un tiempo después (Kandel, 2001; Squire & Zola-Morgan, 1988). Este proceso implica las etapas de: a) la adquisición o aprendizaje, que ocurre cuando la nueva información ingresa al sistema nervioso para ser procesada; b) la consolidación o almacenamiento, donde la información pasa de un estado lábil a un estado estable y duradero, y en esta etapa ocurren modificaciones en el sistema nervioso; c) la evocación, que sucede cuando se recupera la información almacenada para poder ser utilizada si se requiere. Un proceso relacionado con el manejo de información aprendida es la extinción, donde hay un decremento en la frecuencia de la respuesta condicionada cuando un estímulo incondicionado es suprimido (Baddeley, 1999; Prado-Alcalá, 1991; Schacter & Wagner, 2013).

De acuerdo a la cualidad de la información almacenada, la memoria se ha catalogado en dos tipos: a) la memoria explícita (declarativa) y la memoria implícita (no declarativa) (Figura 1). La memoria explícita es la representación de los lugares, la gente y los eventos ya pasados. Su evocación requiere esfuerzo consciente y deliberado. Este tipo de memoria se ha dividido en dos: la episódica y la semántica. La memoria episódica, se refiere a la información de las experiencias personales, como el primer día en el colegio o el recordar el primer viaje a la playa, mientras que la memoria semántica hace referencia a la información que no está relacionada con experiencias personales, dando lugar a los conceptos y al conocimiento enciclopédico, como el recordar la capital de algún país o una fórmula matemática, entre otras (Bermúdez-Rattoni & Prado-Alcalá, 2001). La memoria implícita (no declarativa) o de

procedimiento, es el recuerdo inconsciente de habilidades motoras (hacer un nudo), habilidades cognitivas (realizar operaciones mentales) o habilidades perceptuales (leer rápido), e incluye el tipo de información relacionada con el aprendizaje asociativo como el condicionamiento clásico, el aprendizaje no asociativo como la sensibilización y la habituación (Milner, Squire, & Kandel, 1998; Schacter & Wagner, 2013).

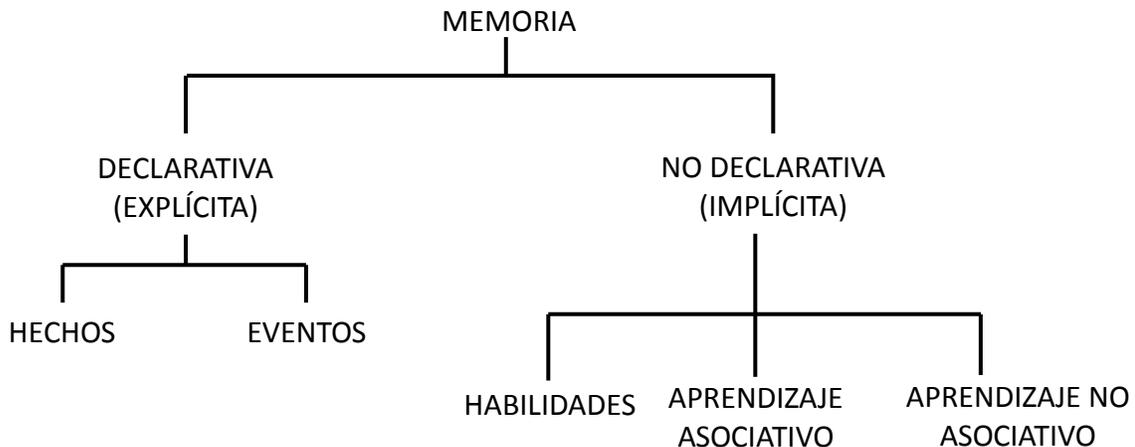


Figura 1. Diagrama de la división de la memoria en función al tipo de información almacenada (Squire & Zola-Morgan, 1988).

Por otro lado, en función del tiempo, la memoria se clasifica en memoria de corto (MCP) y largo plazo (MLP) (Prado-Alcalá & Quirarte, 2007; Schacter & Wagner, 2013). La MCP es de corta duración y nos permite manejar información inmediata, dura de unos cuantos min hasta unas h, es lábil y susceptible a la interrupción, y se cree que depende de modificaciones post-traduccionales (Schacter & Wagner, 2013). La memoria, si no es interrumpida, puede volverse más estable y perdurar a través del paso del tiempo convirtiéndose entonces en una MLP que es de una mayor duración (días, meses o años) y con la cual podemos recordar datos del pasado reciente y remoto (Almaguer-Melian & Bergado-Rosado, 2002; Prado-Alcalá et al., 2007). Se ha propuesto que la MLP se estabiliza a través de un proceso denominado consolidación, que requiere de síntesis de proteínas (Dudai, 2004).

El término consolidación es atribuido a Georg Müller y Alfons Pilzecker debido a sus trabajos de establecimiento y evocación de la memoria (Lechner, Squire, & Byrne, 1999). Ellos plantearon la hipótesis de consolidación de la memoria realizando estudios

entre 1892 y 1900; entre las aportaciones más importantes de su trabajo es asumir que la fijación de la memoria requiere de tiempo (consolidación), y es progresiva y vulnerable durante este periodo (Dudai, 2004; Lechner et al., 1999).

Durante la consolidación la información se estabiliza en una huella de memoria, se fortalece a través del tiempo y se vuelve resistente a la interrupción. Actualmente se reconocen dos tipos de consolidación: 1) la consolidación celular o sináptica, que se observa a nivel celular y durante la cual se llevan a cabo eventos bioquímicos y moleculares (cambios en vías de señalización, alteración en la síntesis de proteínas, entre otros) en los circuitos neuronales, dentro de los primeros minutos u horas posteriores al aprendizaje; y 2) la consolidación de sistemas, que involucra cambios en las interacciones entre los circuitos neuronales o sistemas involucrados en la codificación de la memoria, fortaleciendo la fuerza de la huella de memoria; este tipo de consolidación tarda semanas, meses o años para completarse (Dudai, 2004).

TAREA DE EVITACIÓN INHIBITORIA COMO HERRAMIENTA PARA EVALUAR EL PROCESO DE LA MEMORIA

El estudio del aprendizaje y la memoria se puede abordar desde punto de vista conductual, donde se observa la relación entre las variables ambientales y cambios observables en la conducta. El modo en que la información adquirida queda representada en la memoria es inferido a partir de las actividades conductuales del sujeto (Aguado-Aguilar, 2001). Es por ello que se han desarrollado paradigmas de aprendizaje como herramientas para evaluar la memoria. En estos paradigmas se entrena a los animales a ejecutar una determinada conducta y tiempo después se les coloca en condiciones similares en las que aprendieron dicha tarea y se evalúa si retuvieron o no la experiencia (Sweatt, 2010). Uno de los paradigmas más empleados en los roedores es la de evitación inhibitoria.

La evitación o prevención es un paradigma de aprendizaje, en el que una respuesta le permite al organismo posponer o evitar un estímulo aversivo (Ferrer, 2008;

Reynolds, 1973). Este paradigma presenta dos variantes, la tarea de evitación activa, en la que el sujeto tiene que realizar una respuesta motora específica, y la tarea de evitación pasiva o inhibitoria, en la que el sujeto tiene que dejar de emitir una respuesta motora (Garín-Aguilar, 2014; Huchín, 2008; Reynolds, 1973). En el presente trabajo se utilizó la tarea de EI, la cual se describirá con mayor detalle más adelante (véase material y método). Este tipo de tarea ha sido muy utilizada debido a sus características, pues se lleva a cabo en un único ensayo y se puede reconocer el momento preciso en el que el animal aprende, es decir el momento en que asocia los estímulos derivados del contexto (características físicas de la cámara de condicionamiento), el estímulo aversivo y los derivados de la actividad motora con la aplicación del choque eléctrico (Prado-Alcalá et al., 2007). Además este tipo de tareas involucra tres componentes importantes 1) el emocional, ya que emplea el uso de un choque eléctrico, 2) el espacial, que se establece mediante claves espaciales, y emplea la asociación entre estímulos ambientales y 3) la respuesta motora (Ferrer, 2008; Prado-Alcalá, Díaz del Guante, Garín-Aguilar, Díaz-Trujillo, & Quirarte, 2006; Reynolds, 1973).

LA CORTEZA INSULAR Y SU PARTICIPACIÓN EN LA FORMACIÓN DE MEMORIAS

ANATOMÍA Y FUNCIÓN DE LA CORTEZA INSULAR

Se ha observado que la actividad de algunas estructuras cerebrales, como el hipocampo, la amígdala, el estriado, la corteza entorrinal y la sustancia nigra, son indispensables para la consolidación de la memoria de la tarea de EI (Izquierdo et al., 1998; Izquierdo et al., 1992; Prado-Alcalá et al., 2007); ya que al bloquear farmacológicamente estas estructuras se logra interrumpir la consolidación. Por otro lado, una de las estructuras que no se ha estudiado detalladamente en relación con los diversos procesos involucrados en la formación de la memoria es la corteza insular, aunque se ha visto que cuando se interrumpe su actividad normal se interrumpe la consolidación de la tarea de EI.

La corteza insular (CI) es una porción de la corteza que, de acuerdo a su citoarquitectura, se ha considerado como una mesocorteza ya que se encuentra entre el límite de ser una allocorteza y una neocorteza, pues presenta un arreglo estratificado dispuesto en seis capas horizontales (de la capa I a la VI); sin embargo, en algunas regiones desaparece alguna de las capas (principalmente la IV) (Mesulam & Mufson, 1982; Ture, Yasargil, Al-Mefty, & Yasargil, 1999).

La CI en la rata se encuentra en el lóbulo temporal (áreas 13 y 14 de Krieg), en la intersección de la arteria cerebral media y la fisura rinal (Kosar, Grill, & Norgren, 1986; Krieg, 1946). Comprende el área que va desde la corteza frontal lateral hasta la corteza peririnal en dirección rostro-caudal y desde el borde de la corteza somatomotora hasta la corteza piriforme en dirección dorso-ventral (Moraga-Amaro & Stehberg, 2012; Paxinos, 1996). Histológicamente se divide en tres regiones, agranular, disgranular y granular de acuerdo a la presencia de neuronas granulares (Figura 2).

La corteza **insular granular (IG)** está situada ventralmente a la corteza somatosensorial secundaria. Se caracteriza por poseer una capa de células granulares (capa II y IV) bien desarrollada y la densidad de esta capa es resaltada por la escasa capa V directamente sobre ella. La IG juega un papel importante en la modulación de funciones viscerales (Shi & Cassell, 1998).

La corteza **insular disgranular (ID)** se encuentra dorsalmente a la fisura rinal, se distingue por la desaparición de la capa IV; las capas II y III son fácilmente discernibles como entidades separadas y contiene una capa granular difusa, la mielina cortical es baja y el nivel de AChE es menor que en el área agranular (Figura 2). La ID participa en procesos gustativos (Guzmán, 2010; Moraga-Amaro & Stehberg, 2012).

La corteza **insular agranular (IA)** (Figura 2) se sitúa en el labio dorsal del surco rinal, extendiéndose en sus profundidades. Es más delgada que la región disgranular y posee una banda intermedia más delgada que contiene pequeñas células piramidales. Se caracteriza por tener estratos celulares agranulares, una capa de fibras mielinizadas y un alto nivel de acetilcolinesterasa (AChE) intracortical. Se cree que está involucrada en la integración eficiente de estímulos sensoriales viscerales específicos que están relacionados con consecuencias de carácter límbico o motivacional (Krushel & van der

Kooy, 1988; Treede, Kenshalo, Gracely, & Jones, 1999), es por ello que en el presente estudio se eligió esta región para ser analizada.

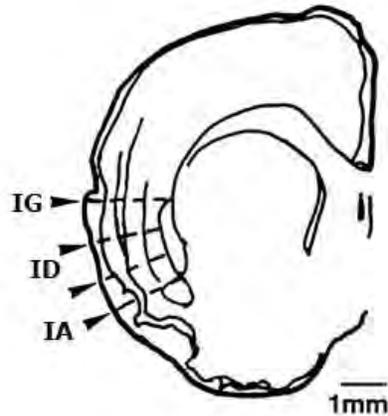


Figura 2. Corteza insular. Representación de las divisiones de la corteza insular en rata: IG, región granular; ID, región disgranular; IA, región agranular. Sección Coronal + 1.2 mm de Bregma del Atlas estereotáxico del cerebro de rata de Paxinos y Watson (1998) (Ogawa, Hasegawa, & Murayama, 1992).

La CI recibe aferencias principalmente de la amígdala, del tálamo dorsal y de las cortezas sensoriales y la corteza auditiva (Stephani, Fernandez-Baca Vaca, Maciunas, Koubeissi, & Luders, 2011). También tiene comunicación con la corteza anterior cingulada, la corteza prefrontal, la corteza orbitofrontal, el opérculo frontal y parietal, la corteza asociativa visual, los bulbos olfatorios, el hipocampo, la corteza entorrinal, la corteza perirrinal y la corteza motora (Nagai, Kishi, & Kato, 2007; Stephani et al., 2011). La CI tiene eferencias con el estriado, el núcleo accumbens, el claustró, el presubiculum y con las cortezas prefrontal, entorrinal y piriforme (Augustine, 1996). En la Cuadro 1 se enlistan las principales aferencias y eferencias. Entre las regiones de la CI también existen interconexiones, la parte granular proyecta hacia la parte disgranular. La corteza disgranular proyecta hacia la región agranular y granular. Por su parte la corteza agranular posterior tiene eferentes hacia el área agranular anterior y hacia las áreas granular y disgranular posterior (Shi & Cassell, 1998).

Cuadro 1. Principales aferencias y eferencias de la corteza insular

AFERENCIAS	EFERENCIAS	CONEXIONES RECÍPROCAS
Corteza primaria olfatoria	Estriado	Núcleo mediodorsal ventroposteromedial del tálamo
Núcleo lateral y basolateral de la amígdala	Núcleo central de la amígdala	Núcleo parabranchial
Núcleo basal magnocelular	Parte lateral del núcleo del lecho de la estría terminal	Área posterior lateral del hipotálamo
Núcleo centromedial del tálamo	Claustro	Corteza frontal lateral, piriforme y perirrinal ipsilateral
Núcleo tuberomamilares del hipotálamo	Núcleo accumbens	Corteza somatosensorial secundaria
Corteza perirrinal	Presubiculum	Núcleo del tracto solitario
Núcleos del rafe	Corteza entorrinal	Corteza entorrinal
Área tegmental ventral	Corteza media prefrontal	
<i>Locus coeruleus</i>		

La CI es una estructura a la cual se le ha atribuido gran variedad de funciones, como el gusto y la olfacción; está involucrada en reacciones viscerales y la regulación cardiovascular (Alves et al., 2013; Yasui, Breder, Saper, & Cechetto, 1991). También está involucrada en procesos sensoriales dolorosos (Bermúdez-Rattoni & McGaugh, 1991; Hanamori, Kunitake, Kato, & Kannan, 1998) y se cree que interviene en la representación de mapas afectivos influidos por entradas sensoriales específicas, especialmente aquellas reforzadas o mediadas por situaciones aversivas (Bermúdez-Rattoni, Okuda, Roozendaal, & McGaugh, 2005).

PARTICIPACIÓN DE LA CORTEZA INSULAR EN LA MEMORIA DE EVITACIÓN INHIBITORIA

Cuando se habla de corteza insular, generalmente se asocia con el procesamiento de formación de memorias gustativas, producidas por la tarea del condicionamiento aversivo al sabor; sin embargo, en diversos estudios en los que se lesionó la corteza insular, se demostró que también está involucrada en la formación de memoria de procesos no gustativos, como la tarea de aprendizaje de reconocimiento de objetos (Bermúdez-Rattoni et al., 2005) o tareas como el laberinto acuático de Morris (Gutiérrez et al., 1999), entre otras.

En cuanto a la participación de la CI en la tarea de EI, Bermúdez-Rattoni y colaboradores en 1991 realizaron un estudio donde se inactivó reversiblemente la CI, la corteza frontal (CF), la corteza parietal (CP) y el núcleo caudado ventral (NC) aplicando bilateralmente tetrodotoxina (TTX, un bloqueador de los canales de sodio sensibles al voltaje). Ellos entrenaron a las ratas en la tarea de EI e inmediatamente después se les inyectó TTX. Cuarenta y ocho h después del entrenamiento midieron la latencia de retención y observaron que la aplicación de TTX redujo la latencia de retención únicamente cuando se administró en la CI con respecto al grupo control, indicando así que estas ratas tuvieron amnesia (Figura 3). Los resultados indicaron que la retención de la tarea de EI se vio interrumpida cuando se aplica TTX directamente en la CI después del entrenamiento, sugiriendo así la importancia de esta estructura para la consolidación de la memoria de esta tarea (Bermúdez-Rattoni et al., 1991).

Por su parte Miranda y Bermúdez-Rattoni (2007) administraron escopolamina (antagonista de los receptores muscarínicos de acetilcolina) o solución salina, bilateralmente en la CI 5 min antes o inmediatamente después del entrenamiento en la tarea de EI (0.5 mA, 1.0 s). Lo que observaron fue que a las ratas a las que se les administró escopolamina en la CI mostraron latencias de retención bajas en comparación con el grupo control y el grupo de solución salina. Lo que concluyeron fue que la escopolamina interfirió tanto en la adquisición como en la consolidación de la

memoria de EI, y que la CI es necesaria para la formación de la memoria de tareas de reconocimiento espacial y contextual (Miranda & Bermúdez-Rattoni, 2007).

En otro estudio realizado por Huchín en el 2008, en el que se inyectaron distintas dosis de anisomicina (un inhibidor de síntesis de proteínas) en la CI inmediatamente después del entrenamiento de una tarea de EI, se observó que efectivamente se produjo amnesia al bloquear la síntesis de proteínas, indicando así, nuevamente, la participación de esta estructura en la consolidación de la memoria de tareas como la EI.

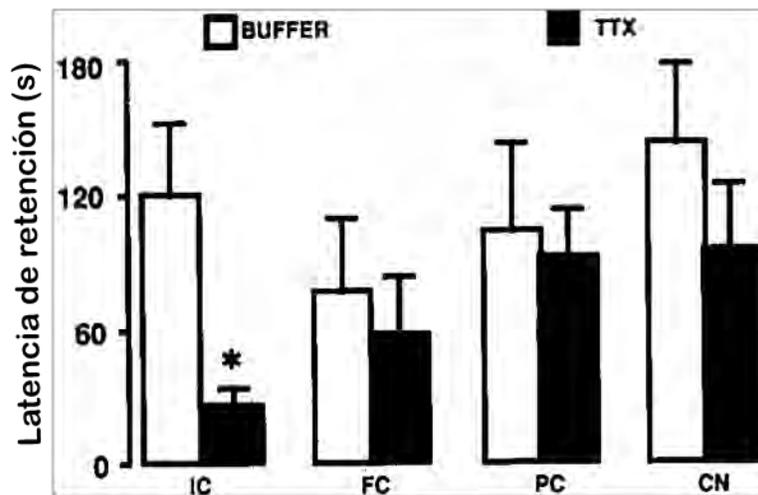


Figura 3. La TTX deteriora la memoria de EI en la corteza insular. Media y error estándar en s, de las latencias de retención de los grupos a los que se les administró, inmediatamente después del entrenamiento, TTX o solución Buffer en las estructuras cerebrales: corteza insular (IC), corteza frontal (FC), corteza parietal (CP) y núcleo caudado ventral (CN) * $p < 0.05$ con respecto al control (Bermúdez-Rattoni et al., 1991).

EFFECTO PROTECTOR DEL ENTRENAMIENTO INCREMENTADO EN LA TAREA DE EVITACIÓN INHIBITORIA

Se sabe que el estado emocional y motivacional es importante en los procesos de aprendizaje y memoria; una motivación incrementada o un estado emocional

excepcional nos ayuda a recordar eventos y sucesos que en otras condiciones hubiéramos olvidado. Por ejemplo, es difícil que una persona recuerde la ropa que llevaba puesta hace un año, pero fácilmente recordará qué vestía el día de su graduación (Almaguer-Melian & Bergado-Rosado, 2002).

Un enfoque que se le ha dado a la relación entre motivación/emoción y aprendizaje es el del efecto protector que tiene el entrenamiento incrementado. Desde hace varios años se ha visto que una experiencia incrementada de aprendizaje, es decir, una situación donde un individuo recibe un mayor número de sesiones de entrenamiento (**sobreentrenamiento**) o donde recibe intensidades de estimulación relativamente altas (**sobrerreforzamiento**), bloquea el efecto amnésico de algunos tratamientos que interfieren con la consolidación de la memoria (Prado-Alcalá et al., 2007). Para establecer cuáles son las condiciones de choque relativamente moderado o incrementado, es necesario medir la resistencia a la extinción. La extinción es la reducción progresiva en la magnitud de una respuesta condicionada cuando se omite el reforzador o estímulo incondicionado durante las pruebas de retención. De tal forma que cuanto mayor es la fuerza del aprendizaje, mayor es la resistencia a la extinción; por lo tanto, la respuesta condicionada tardará más tiempo en desaparecer (Prado-Alcalá et al., 2012).

En la tarea de EI el entrenamiento incrementado se da mediante intensidades de descarga eléctrica relativamente altas (sobrerreforzamiento), y se ha empleado para ver sus efectos ante la aplicación de diferentes fármacos que interfieren con la consolidación de la memoria. Por ejemplo, la escopolamina (antagonista de los receptores muscarínicos de acetilcolina) administrada sistemáticamente produce amnesia de la tarea de EI cuando se administran intensidades de choque eléctrico relativamente bajas. Sin embargo Cruz-Morales y colaboradores (1992) encontraron que al administrar intensidades de choque más altas en la tarea de EI, podía observarse el efecto protector (Cruz-Morales, Durán-Arévalo, Díaz del Guante, Quirarte, & Prado-Alcalá, 1992).

En otro estudio, Díaz-Trujillo y colaboradores, en el 2009, administraron por vía subcutánea cicloheximida (inhibidor de la síntesis de proteínas) 30 min antes del

entrenamiento de la tarea y observaron que con intensidades bajas de choque (0.8 mA) se produce un deterioro en la memoria en comparación con las intensidades altas (3.2 mA), las cuales presentaron el efecto protector (Díaz-Trujillo et al., 2009).

En cuanto a la corteza insular Muñoz-Sánchez (2012) realizó un estudio en el que bloqueó reversiblemente la síntesis de proteínas en la CI, administrando anisomicina bilateralmente inmediatamente después del entrenamiento. Las ratas fueron entrenadas con tres intensidades de choque, 1.0 mA (choque relativamente bajo), 3.0 mA (choque moderado) y 5.0 mA (choque relativamente alto) y fueron probadas 48 h después del entrenamiento (MLP). Los resultados mostraron que las ratas que fueron entrenadas con el choque de 1.0 mA tuvieron latencias de retención más bajas que las ratas entrenadas con los choques de 3.0 y 5.0 mA; es decir, se observó amnesia en las ratas entrenadas con 1.0 mA y con intensidades altas se observó el efecto protector del sobrerreforzamiento (Figura 4).

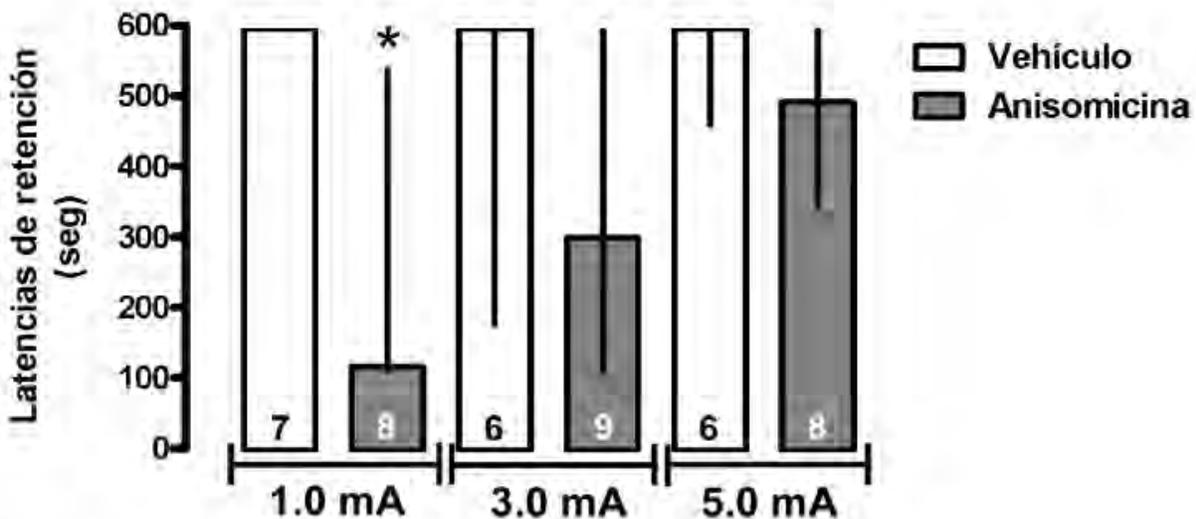


Figura 4. El entrenamiento incrementado tiene un efecto protector contra la anisomicina en la CI. Latencias de retención en s. Medianas y sus rangos intercuartilares de las latencias de retención de ratas tratadas con anisomicina o solución vehículo inmediatamente después del entrenamiento * $p < 0.05$ (tomado de Muñoz-Sánchez, 2012).

Estos resultados demostraron que la CI estaría participando en la consolidación de la memoria cuando se usan intensidades bajas y no altas y que el deterioro que

normalmente se observa en la consolidación de la memoria, cuando ocurre un bloqueo reversible de las estructuras, no ocurre si las ratas son sometidas a entrenamientos incrementados (sobrerreforzamiento) (Muñoz-Sánchez, 2012). Pero aún se desconoce cómo es que ocurre este efecto protector del entrenamiento incrementado.

CAMBIOS ESTRUCTURALES ASOCIADOS AL APRENDIZAJE Y LA MEMORIA

Desde hace mucho tiempo los científicos se han dado a la tarea de buscar los elementos estructurales y operacionales más elementales de la consolidación de la memoria y se ha propuesto que la información derivada de una experiencia de aprendizaje podría quedar almacenada en virtud de cambios en la estructura y el metabolismo de las neuronas (Prado-Alcalá et al., 2007).

Las neuronas son hábiles para procesar y transmitir información, ya que están conectadas funcionalmente en redes y se comunican a través de la transmisión sináptica (un lenguaje de señales eléctricas y químicas) (Dudai, 1989). Santiago Ramón y Cajal propuso una teoría que postula que la información se almacena mediante cambios entre las conexiones de las neuronas (Balderas, Ramírez-Amaya, & Bermúdez-Rattoni, 2004; Dudai, 1989; Leuner et al., 2003). Posteriormente, en 1949, Donald Hebb complementaría esta idea con su postulado de la sinapsis Hebbiana, en la que señala que al haber una estimulación entre dos neuronas, se producen cambios en las propiedades de la sinapsis; el postulado dice lo siguiente: „cuando el axón de la neurona A está lo suficientemente cerca para excitar a la neurona B, repetida y persistentemente se da esta excitación, algunos procesos de crecimiento o cambios metabólicos tienen lugar en una o en ambas células nerviosas, de tal manera que la eficacia de la célula A para excitar a B se incrementa" (Balderas et al., 2004). A estos cambios se les ha llamado plasticidad neuronal. Junto con la plasticidad neuronal se suscitan cambios anatómicos, ya sea en la distribución y el número de sinapsis, modificación del tamaño de la densidad postsináptica y/o cambios en el número de botones presinápticos; a estos cambios se les denominan plasticidad estructural (León-Jacinto, 2008; Yuste, 2010). Asimismo dentro de los cambios que se pueden dar en la

plasticidad estructural están los cambios en la densidad y la forma de las espinas dendríticas.

ESPINAS DENDRÍTICAS

Las espinas dendríticas son pequeñas protrusiones que se originan desde las dendritas de las neuronas. En estas estructuras ocurren la mayoría de las sinapsis excitadoras axodendríticas (Balderas et al., 2004; Repetto et al., 2014; Yuste, 2010), y representan un medio por el cual se establecen nuevos contactos entre las neuronas y/o se fortalecen los contactos ya establecidos (Leuner et al., 2003). Es por ello que las encontramos recubriendo las dendritas de la mayoría de las neuronas, principalmente en neuronas que reciben una gran cantidad de entradas de información; por ejemplo, las células de Purkinje en el cerebelo, células medianas espinosas en el estriado o las células piramidales que se encuentran en todas las regiones de la corteza cerebral (Kasai, Fukuda, Watanabe, Hayashi-Takagi, & Noguchi, 2010; Yuste, 2010).

Las espinas tienen una pequeña cabeza (~1 μm de diámetro), unida a un delgado cuello (~0.2 μm de diámetro y 0.5 μm de longitud) que conecta con el eje de la dendrita (Yuste, 2010). Están conformadas en su citoesqueleto por una red de filamentos de actina (F-actina), que sirve tanto de soporte estructural como de regulador del tráfico de proteínas y vesículas (Bosch & Hayashi, 2012). La actina es importante en la formación de las espinas, ya que presenta tasas de cambio rápidas; además, la actina juega un papel integral en la promoción de la eficiencia sináptica mediante el anclaje y el tráfico adecuado de receptores en las espinas, promoviendo así una mayor plasticidad de éstas (Georges, Hadzimichalis, Sweet, & Firestein, 2008). Algunas espinas contienen elementos de retículo endoplasmático, que se sitúan en una estructura llamada “el aparato de la espina”, el cual sirve de reservorio de receptores y canales iónicos y como captador de Ca^{2+} .

Como se mencionó antes, los cambios en la densidad de las espinas representan parte de la plasticidad estructural, por lo que un aumento en el número de espinas puede traducirse en un aumento significativo en el número de sinapsis, que a menudo se considera un paso integral en la formación de la memoria (Leuner et al., 2003; Moser, Trommald, & Andersen, 1994). Evidencia de ello son los diversos trabajos

donde se utilizaron como modelo de estudio ratas o pollos, que fueron entrenados en tareas de aprendizaje como la EI (Doubell & Stewart, 1993; O'Connell, O'Malley, & Regan, 1997; Stewart & Rusakov, 1995) y el laberinto acuático de Morris (en su versión especial) (O'Malley et al., 2000), en los cuales se evaluó la densidad de las espinas dendríticas en el hipocampo, observando un incremento significativo en los sujetos que aprendieron y recordaron la tarea.

En un estudio en el que se entrenaron ratas en la tarea de EI, y después se les realizó la prueba de retención a las 1, 3, 6 o 72 h después del entrenamiento, se midieron la densidad de las espinas dendríticas en las células granulares del giro dentado en el hipocampo. Lo que se observó fue un incremento en la densidad de las espinas a las 6 h después del entrenamiento, proponiendo que posiblemente los cambios en la densidad de las espinas dendríticas, a partir de 6 h posteriores al entrenamiento pueden estar relacionados con la consolidación de la memoria. Además, encontraron que la densidad de espinas dendríticas a las 72 h después del entrenamiento, fue similar a la densidad de espinas dendríticas observadas en los sujetos probados 1 h después del entrenamiento, indicando que el número de dendritas “regresó” a un estado basal (O'Malley, O'Connell, & Regan, 1998).

TIPOS DE ESPINAS Y SU FUNCIÓN

Las espinas constantemente aparecen, desaparecen o cambian de forma a lo largo de la vida de un organismo (Fu & Zuo, 2011). La morfología de las espinas dendríticas es de gran relevancia pues guarda una relación estrecha con la función en estas estructuras, siendo características críticas su tamaño y la forma de la cabeza (Benavides-Piccione, Ballesteros-Yáñez, DeFelipe, & Yuste, 2002). Desde el punto de vista morfológico, se han descrito principalmente cuatro formas fundamentales de espinas dendríticas: delgadas, cortas, hongo y bifurcadas (Figura 5) (Bourne & Harris, 2007; Harris & Stevens, 1989; Yuste, 2010). En un cerebro maduro, el hipocampo y la neocorteza llegan a presentar > 65% de espinas tipo delgadas, ~ 25% de espinas tipo

hongo y ~10% de espinas con formas inmaduras: cortas y filopodias (Bourne & Harris, 2007).

Estudios con microscopía electrónica han demostrado que las diferentes formas de las espinas presentan contrastes en cuanto a los componentes sinápticos que poseen. Por ejemplo, las espinas tipo delgadas son transitorias, emergen y desaparecen en unos cuantos días y presentan densidades postsinápticas (PSD) pequeñas y con una menor cantidad de receptores anclados a la membrana. Por otro lado las espinas tipo hongo presentan PSD más extensas y una mayor cantidad de receptores anclados a la membrana plasmática, lo que sugiere que la fuerza de la sinapsis es mucho mayor, en comparación con los demás tipos de espinas dendríticas (Bourne & Harris, 2007; Fu & Zuo, 2011). Con base en lo anterior se ha propuesto que las espinas con forma delgada participan principalmente en procesos de aprendizaje mientras que las espinas en forma de hongo con procesos de memoria (Bourne & Harris, 2007).

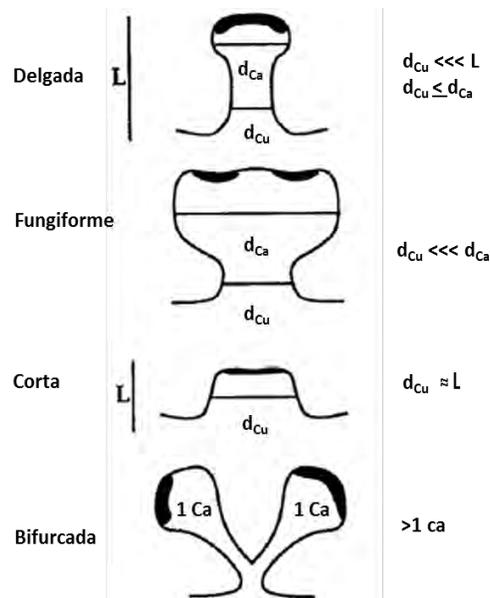


Figura 5. Esquema representativo de los diferentes tipos de espinas dendríticas y sus principales características. Se consideran espinas de tipo delgado si el cuello es largo y si el diámetro de cabeza es igual o menor que el diámetro del cuello. En las espinas de tipo hongo el diámetro del cuello es menor que el diámetro de la cabeza. En las espinas de tipo corto el diámetro del cuello es similar al total de la longitud de la espina. Finalmente, las de tipo bifurcada presentan más de una cabeza. L = longitud de la espina; d_{Cu} = diámetro del cuello; d_{Ca} = diámetro de la cabeza (Harris, Jensen, & Tsao, 1992).

Bello-Medina y colaboradores realizaron un estudio en donde entrenaron ratas en la tarea de EI con dos tipos de aprendizaje: 1) moderado (1.0 mA) e 2) incrementado (3.0 mA) y a las que se les realizó la prueba de retención 6 o 24 h después del entrenamiento. Después cuantificaron la densidad total y la densidad relativa de las espinas dendríticas en el estriado. Los resultados mostraron que la densidad total aumento con el entrenamiento moderado y con el entrenamiento incrementado la densidad total fue aún mayor. También encontraron que durante el entrenamiento moderado hubo un incremento en la proporción de espinas tipo hongo junto con un decremento en la proporción de las espinas tipo delgadas, en el estriado dorsal. Además, el entrenamiento incrementado indujo una mayor proporción de espinas tipo hongo, en comparación con el incremento del entrenamiento moderado. Estos cambios se observaron durante el proceso de consolidación (6 h) y persistieron durante la MLP (24 h) (Bello-Medina, Flores, Quirarte, & Prado-Alcalá, 2015).

En resumen, numerosas evidencias indican que el aprendizaje y la memoria están asociados a la plasticidad de espinas dendríticas en muchas estructuras cerebrales, tales como el hipocampo, amígdala y estriado. Por otro lado, se sabe que tratamientos que típicamente producen amnesia se tornan inocuos cuando los sujetos experimentales son estudiados en condiciones de entrenamiento incrementado. También está documentado que las espinas dendríticas representan la principal entrada excitadora de la mayoría de las neuronas, y que cambios duraderos de la actividad sináptica se acompañan de alteraciones en la cantidad, tamaño y forma de las espinas. Las espinas delgadas responden rápidamente a los incrementos y decrementos en la actividad sináptica, por lo que se les ha considerado como “espinas del aprendizaje”, mientras que debido a su estabilidad relativa en el tiempo, a las espinas de tipo hongo se les ha llamado “espinas de la memoria” (Bourne & Harris, 2007).

3. JUSTIFICACIÓN

Diversos estudios han demostrado que la adquisición de nueva información induce el desarrollo de las espinas dendríticas en diversas estructuras (como el hipocampo y la corteza prefrontal) en una variedad de tareas de aprendizaje (Horner, 1993; Moser et al., 1994), incluyendo la tarea de EI utilizada en el presente estudio (O'Malley et al., 1998). Sin embargo, no hay publicaciones acerca de un posible efecto directo del aprendizaje sobre las espinas dendríticas de la CI.

Por otro lado, se ha reportado que el entrenamiento incrementado genera un efecto protector contra agentes amnésicos administrados por vía sistémica o intracerebral, y se desconoce cuáles son los mecanismos neurobiológicos que sustentan este fenómeno. Es probable que los cambios en las espinas dendríticas pudieran ser parte clave en la formación de la memoria en condiciones de entrenamiento moderado e incrementado.

Con base en lo citado anteriormente, en este proyecto se pretende investigar si el entrenamiento incrementado en la tarea de EI produce cambios significativos en la densidad y tipo de espinas de las células piramidales de la CI.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Habrá cambios en la densidad total y en la proporción de tipo de espinas dendríticas de las neuronas piramidales de la corteza insular de la rata, en condiciones de entrenamiento moderado e incrementado en la tarea de EI?

5. HIPÓTESIS

La densidad total de espinas dendríticas de la corteza insular aumentará a las 6 h y 24 h después del entrenamiento moderado.

La densidad total de espinas dendríticas de la corteza insular, a las 6 h y 24 h después del entrenamiento incrementado, será mayor en comparación con el entrenamiento moderado.

La proporción del tipo de espina hongo de la corteza insular se verá incrementado a las 6 h y 24 h después del entrenamiento moderado.

La proporción del tipo de espina hongo de la corteza insular será mayor a las 6 h y 24 h después del entrenamiento incrementado en comparación con el entrenamiento moderado.

La proporción del tipo de espina delgada de la corteza insular disminuirá a las 6 h y 24 h después del entrenamiento moderado.

La proporción del tipo de espina delgada de la corteza insular disminuirá aún más a las 6 h y 24 h después del entrenamiento incrementado en comparación con el entrenamiento moderado.

La proporción de los demás tipos de espinas sufrirán cambios con el entrenamiento moderado e incrementado a las 6 h y 24 h después del entrenamiento.

6. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la densidad y el tipo de las espinas dendríticas en la corteza insular de ratas entrenadas en la tarea de evitación inhibitoria, en condiciones de entrenamiento moderado e incrementado.

OBJETIVOS PARTICULARES

Corroborar que la intensidad de choque eléctrico de 1.0 mA corresponde a la intensidad de choque de entrenamiento moderado, y que la intensidad de choque de 3.0 mA corresponde al entrenamiento incrementado mediante la prueba de extinción.

Cuantificar, en condiciones de entrenamiento moderado e incrementado, la densidad de espinas dendríticas en las neuronas piramidales de la corteza insular a las 6 h (fase de consolidación) o 24 h (MLP) después del entrenamiento de EI.

Cuantificar, en condiciones de entrenamiento moderado e incrementado, la proporción de tipo de espina dendrítica en las neuronas piramidales de la corteza insular a las 6 h (fase de consolidación) o 24 h (MLP) después del entrenamiento de EI.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

DIAGRAMA DE TRABAJO

En la Figura 6 se muestra el diseño experimental que se siguió para realizar este trabajo.

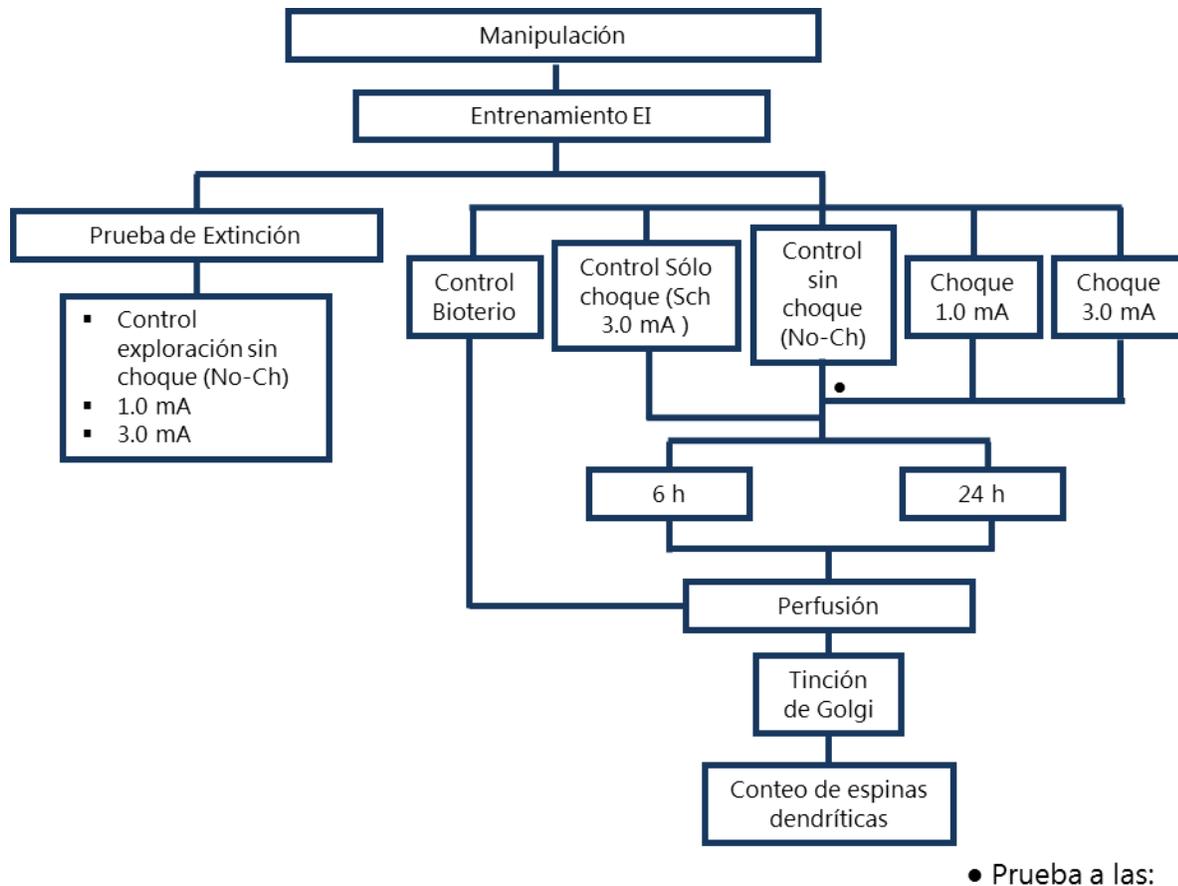


Figura 6. Diagrama del diseño experimental.

Todos los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 “Especificaciones para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio” y a las normas estipuladas en la “Guide for the care and use of laboratory animals” del NIH (National Research Council, 2011), bajo la aprobación del Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología, UNAM. Todos los procedimientos conductuales se llevaron a cabo entre las 8:00 am y 3:00 pm.

SUJETOS

Se usaron ratas macho de la cepa Wistar entre 270 y 310 g, obtenidas del Bioterio del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Las ratas fueron mantenidas individualmente en cajas-hogar de acrílico, dentro de un

cuarto con un ciclo de luz/oscuridad de 12 h (comenzando el ciclo de luz a las 7:00 am) con acceso libre a comida y agua.

EVITACIÓN INHIBITORIA

APARATOS

La caja para el condicionamiento en la tarea de El consta de dos compartimentos del mismo tamaño (30 cm x 30 cm x 30 cm), separados por una puerta deslizable. El primer compartimento (compartimento de seguridad) tiene un piso conformado por barras de acero inoxidable, iluminado por un foco de 10 W, situado en el centro de la tapa. El segundo compartimento (compartimento de castigo) no está iluminado y sus paredes anterior y posterior son de acero inoxidable, que forman una “V” hacia el centro del piso, con una separación de 1.5 cm entre las placas. Éstas se encuentran conectadas a un estimulador que genera pulsos cuadrados (Grass Instruments Co., modelo S48G, E.U.A.), conectado a una unidad de corriente constante (Grass Instruments Co., modelo CCU-1A, E.U.A.). La cámara de condicionamiento se ubicó en un cuarto sonoamortiguado, oscuro y provisto de una fuente de ruido de fondo.

PROCEDIMIENTOS CONDUCTUALES

Manipulación. Antes del entrenamiento las ratas fueron manipuladas en tres sesiones consecutivas para habituarlas al manejo del experimentador y disminuir el estrés provocado por éste. Cada sesión consistió en colocar a la rata sobre una toalla, sujetándola y tocándola cuidadosamente con ambas manos, usando guantes, durante 3 min por día, para después volver a colocarla en su caja-habitación.

Entrenamiento. En la sesión de entrenamiento se colocó la rata dentro del compartimento de seguridad, 10 s después la puerta que divide los compartimentos se abrió, y una vez que entró completamente al compartimento de castigo, la puerta se

cerró, midiéndose el tiempo que tardó en cruzar a éste (*latencia de adquisición*), y se administró un estímulo eléctrico (1.0 o 3.0 mA) durante 10 s. Cinco segundos después del inicio del choque la puerta se abrió permitiendo a la rata escapar al compartimento de seguridad. Se registró el tiempo que tardó en salir del compartimento de castigo y pasar al de seguridad (*latencia de escape*). Después de 30 s de permanencia en el compartimento de seguridad, la rata fue colocada nuevamente en su caja-habitación. También se estudió un grupo control, que fue entrenado de la misma manera que los grupos anteriores, pero que no recibió ningún choque (n = 30 por grupo).

Prueba. A la mitad de los sujetos de cada grupo se les midió la retención de la tarea a las 6 h después del entrenamiento; a la otra mitad se les midió la retención 24 h después del entrenamiento. La prueba de retención consistió en someter a las ratas al mismo procedimiento que en el entrenamiento, pero con la diferencia de que las ratas no recibieron el choque eléctrico. Se registró el tiempo que la rata tardó en pasar del compartimento de seguridad al de castigo (*latencia de retención*), y si la rata no cruzó al compartimento de castigo en 600 s, la sesión se dio por terminada y se le asignó una latencia de retención de 600 s. **Los registros** de las latencias (entrada, escape y retención), así como la aplicación de los estímulos aversivos se realizaron mediante un sistema automatizado.

Prueba de extinción. El procedimiento fue similar al realizado en la prueba de retención, es decir, sin la administración de los choques eléctricos, y se realizó durante 7 sesiones de extinción (1 por día) (grupo No-ch n= 5, 1.0 mA n=7 y 3.0 mA n=8).

En este proyecto se siguió el siguiente diseño experimental.

Experimento 1. Se midió la latencia de retención de los sujetos 6 h después del entrenamiento, e inmediatamente después fueron sacrificados y se evaluó la densidad y morfología de las espinas dendríticas. Se eligió éste lapso de tiempo ya que es el

tiempo sugerido durante el cual se está llevando a cabo el proceso de consolidación de la memoria (O'Malley et al., 1998).

Experimento 2. Se midió la latencia de retención a las 24 h después del entrenamiento, e inmediatamente después los sujetos fueron sacrificados y se evaluó la densidad y morfología de las espinas dendríticas. Se eligió este lapso de tiempo ya que es un tiempo adecuado para estudiar el proceso de memoria de largo plazo.

Por cada tratamiento se usaron los siguientes grupos control:

Grupo control de exploración, se designó como No Choque (No-Ch). Los sujetos fueron sometidos al mismo procedimiento que los sujetos entrenados, pero sólo exploraron libremente ambos compartimientos de la caja sin recibir choque eléctrico, para descartar que la permanencia y exploración en la cámara de condicionamiento, por sí misma, produjera cambios en las espinas dendríticas.

Grupo control de choque, denominado "Sólo Choque" (Sch 3.0). Los sujetos fueron colocados en el compartimento de castigo y recibieron un choque eléctrico de 3.0 mA, para determinar si los choques eléctricos, por sí mismos, producen cambios en las espinas dendríticas. El choque se administró durante 8 s, que fue el promedio de choque que recibieron los grupos entrenados.

Grupo control Bioterio (grupo Bio). Fueron sujetos intactos que no recibieron ninguna manipulación conductual y permanecieron en su caja-habitación hasta el día del sacrificio.

ANÁLISIS MORFOLÓGICO

TINCIÓN DE GOLGI

Una vez que concluyeron los procedimientos conductuales, los sujetos fueron anestesiados con una dosis letal de pentobarbital sódico (vía intraperitoneal) y se perfundieron intraventricularmente con solución salina isotónica (NaCl 0.9%). Los cerebros fueron removidos y colocados en solución de Golgi-Cox (Anexo 1), donde fueron almacenados durante 30 días. Pasado este tiempo se sustituyó la solución de Golgi-Cox por una solución de sacarosa al 30% y así se mantuvieron durante 3 días. Después se procedió a realizar cortes histológicos de 200 μm de espesor a la altura de la CI, con ayuda de un vibratomo (Campden Instruments, MA752, Reino Unido). El tejido fue colocado en laminillas gelatinizadas (2%), se colocaron en una canastilla, y fueron mantenidas en una cámara húmeda para poder efectuar el proceso de revelado, que se realizó en total oscuridad. Inicialmente se hizo un lavado en agua destilada durante 1 min. Después la canastilla se pasó a un recipiente con hidróxido de amonio y se mantuvo ahí durante 30 min. Se hizo un lavado con agua destilada durante un minuto. A continuación se introdujo durante 30 min en fijador Rapid de Kodak para película fotográfica (dilución 1:2 con agua destilada). Pasado este tiempo se lavó con agua destilada durante 1 min. El siguiente paso fue deshidratar el tejido con las siguientes concentraciones de etanol: primero 1 min al 70 %; después, 1 min al 95 %, dos veces 5 min al 100 % y finalmente se dejó 15 min con xileno. Posteriormente se montaron y fijaron los cubreobjetos con resina sintética (al 60% en Xilol, marca Hycel) sobre los cortes ya revelados y cubiertos para su secado en la oscuridad durante un mínimo de 14 días.

CUANTIFICACIÓN DE ESPINAS

La región de la corteza insular se identificó con la ayuda del atlas estereotáxico del cerebro de rata de Paxinos y Watson (2005) en las coordenadas: 1.2 mm

anteroposterior (AP); \pm 5.5 mm mediolateral (ML); 4.0 mm dorsoventral (DV) con respecto a Bregma. Una vez ubicada la región se realizó la cuantificación de las espinas dendríticas con ayuda de un microscopio óptico Optiphot-2 *Nikon* con el objetivo de 100x (Plan-Apochromat, NA 0.8) y aceite de inmersión con una retícula calibrada en el objetivo. Para cada grupo fue analizado un total de 8 cerebros. Por cada cerebro se evaluaron en total 10 neuronas piramidales, incluyendo tanto del hemisferio izquierdo como del derecho, de la capa III de la corteza insular. Para la cuantificación se eligió, de las dendritas basales una dendrita secundaria al azar, que estuviera a 100 μ m de distancia del soma. De la dendrita seleccionada se hizo la cuantificación de las espinas que quedaran dentro de un rango de 30 μ m de longitud (de acuerdo con el método de Flores y colaboradores (2005) y cada espina dendrítica fue clasificada de acuerdo a su morfología en espinas de tipo cortas, tipo delgadas, tipo hongo y tipo bifurcada (Figura 7).

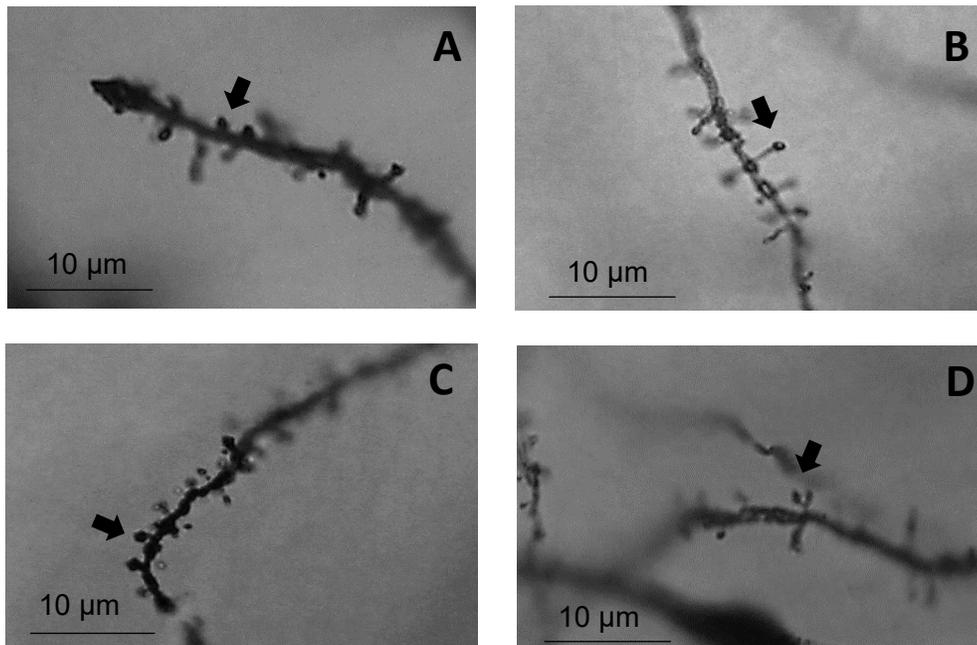


Figura 7. Microfotografía representativa de los tipos de espinas dendríticas, 100x. A) Tipo cortas; B) tipo delgadas; C) tipo hongo; D) tipo bifurcada.

ANÁLISIS DE DATOS

Para estudiar las latencias de retención de las siete sesiones de extinción de cada grupo, se utilizó una prueba de medidas repetidas de Friedman. Para comparar las latencias de cada nivel de entrenamiento por día y para comparar las latencias entre pares de días, se utilizó como prueba *post-hoc* la prueba de rangos de Wilcoxon.

Para las latencias de entrada, escape y retención obtenidas en la prueba de extinción y de evitación inhibitoria, se aplicó el análisis de varianza (ANOVA no paramétrico) de Kruskal-Wallis para detectar diferencias entre los grupos, seguido, en su caso, de la prueba U de Mann-Whitney para detectar posibles diferencias entre cada par de grupos.

Se utilizó una prueba de análisis de varianza ANOVA de una vía para analizar la densidad y el tipo de espinas. Para observar las diferencias significativas entre los grupos, se realizó la prueba *post-hoc* de Fisher, para detectar posibles diferencias entre cada par de grupos. Se hicieron dos mediciones relacionadas con las espinas: la densidad total de espinas que quedaron dentro del rango de 30 μm de longitud descrito anteriormente, y la proporción relativa de cada uno de los tipos de espina (razón del número de espinas/número total de todos los tipos de espinas en el rango de 30 μm de longitud).

8. RESULTADOS

RESULTADOS CONDUCTUALES

PRUEBA DE EXTINCIÓN

En este trabajo se hizo la predicción de que las intensidades de 1.0 y 3.0 mA producirían un nivel moderado e incrementado de entrenamiento, respectivamente. Para comprobar la certeza de esta propuesta, se procedió a medir la extinción en grupos independientes de animales entrenados con 0.0 mA (n= 5), 1.0 mA (n= 7) y 3.0 mA (n = 8). Las latencias de retención de cada grupo de entrenamiento, durante las 7 sesiones de prueba, se muestran en la Figura 8.

Al realizar una prueba de Friedman se observó que para el grupo de 1.0 mA hubo diferencias significativas [$Q(6) = 27.15$, $p = 0.0001$] a lo largo de las sesiones, indicando que la latencia de retención de este grupo fue diferente a lo largo de los días. La prueba *post-hoc* de Wilcoxon mostró que a partir de la cuarta sesión (E4) la latencia de retención presentó diferencias significativas en comparación con la sesión 1 (E1) ($p = 0.0156$). También se encontraron diferencias significativas entre la primera sesión (E1) y la última sesión (E7) ($p = 0.0156$). En ambos casos, la latencia de retención disminuyó comparándola con la primera sesión de extinción (ver figura 8). El análisis del grupo de 3.0 mA, como se esperaba, no mostró diferencias significativas a lo largo de las sesiones [$Q(6) = 2.107$, $p = 0.9096$], indicando así que las ratas tuvieron latencias de retención semejantes a lo largo de los días y que aún no se extinguía la respuesta en el día 7 (Figura 8). Con respecto al grupo que no recibió choque durante el entrenamiento (No-Ch) se encontró que no hubo diferencias significativas entre las sesiones [$Q(6) = 15.77$, $p = 0.150$], el grupo mostró latencias de retención similares a lo largo de las siete sesiones (Figura 8).

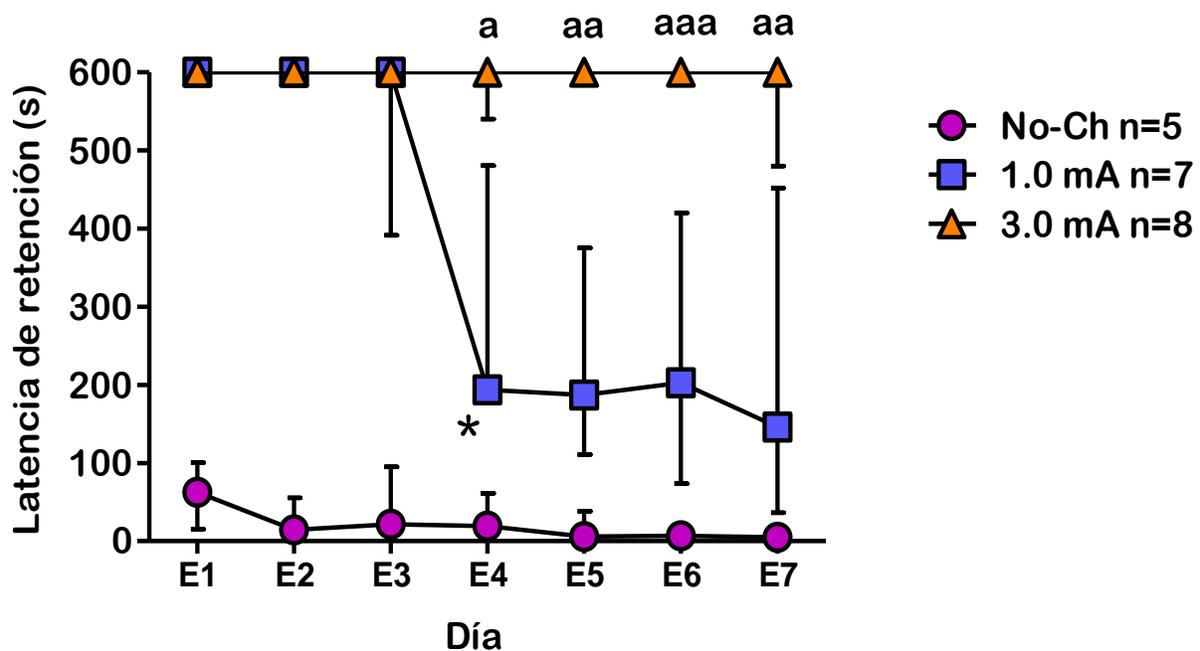


Figura 8. Curva de extinción. Medianas con los rangos intercuartiles, de las latencias de retención durante las sesiones de extinción (E1- E7) de los grupos entrenados con 0.0 mA (No-Ch, n = 5), 1.0 mA (n = 7) o 3.0 mA (n = 7). Se observa que en el grupo de 1.0 mA disminuyó la latencia de retención a partir del día de extinción E4 (* p < 0.05 con respecto al día E1). Se muestra también que hay diferencias de las latencias de retención los grupos de 1.0 y 3.0 mA durante todas las sesiones de extinción con respecto al grupo de No-Ch (p < 0.05). Se aprecia que en el día 4, 5, 6 y 7 la latencias de retención del grupo de 1.0 mA tuvieron una disminución con respecto al grupo de 3.0 mA (^a p < 0.05 ^{aa} p < 0.001, ^{aaa} p < 0.0001 con respecto al grupo de 3.0 mA).

Con la finalidad de comparar el efecto protector de la intensidad de choque dada durante el entrenamiento en cada sesión de extinción, se realizó una prueba de Kruskal-Wallis, para ver si existía alguna diferencia entre las medianas de las latencias de retención entre los grupos No-Ch, 1.0 mA y 3.0 mA. Se observó que en la sesión 1 hubo diferencias entre las intensidades [$H(2) = 14.77$, $p = 0.0006$]; al realizar la U de Mann-Whitney se encontraron diferencias significativas entre los grupos de No-Ch y de 1.0 mA ($p = 0.0025$), incluso con respecto al grupo de 3.0 mA ($p = 0.0016$). En cuanto a las latencias de retención, ésta fue menor en el grupo de No-Ch (Figura 8). La comparación de las latencias de retención entre los grupos con 1.0 y 3.0 mA no mostró diferencias ($p = 1.0$).

En la sesión 2 hubo diferencias significativas entre las medianas de las latencias de retención de los tres grupos [$H(2) = 13.69, p = 0.0011$]. La prueba *post-hoc* mostró que la latencia de retención del grupo de No-Ch fue menor que la de los otros grupos ($p < 0.05$) (Figura 8). Al comparar las latencias de retención entre los grupos de 1.0 y 3.0 mA no hubo diferencias ($p = 0.8040$).

En la sesión 3 hubo diferencias significativas entre las medianas de las latencias de retención [$H(2) = 13.29, p = 0.0013$]. La prueba *post-hoc* mostró que la latencia de retención del grupo No-Ch fue significativamente menor que la de los grupos 1.0 y 3.0 mA ($p = 0.0051$ y 0.0016 respectivamente) (Figura 8). Al comparar las latencias de retención entre los grupos 1.0 y 3.0 mA no hubo diferencias ($p = 0.4081$).

En la sesión 4 hubo diferencias significativas entre las medianas de las latencias de retención [$H(2) = 14.71, p = 0.0006$]. La U de Mann-Whitney mostró que la latencia de retención entre los grupos No-Ch y 1.0 mA fue significativamente diferente ($p = 0.0025$), asimismo cuando se comparó el grupo de No-Ch y 3.0 mA se encontró una diferencia significativa ($p = 0.0016$). En ambos casos la latencia de retención del grupo de No-Ch fue menor que la de los otros grupos (Figura 8). Al comparar las latencias de retención entre los grupos 1.0 y 3.0 mA se observó una diferencia significativa ($p = 0.0124$). El grupo de 1.0 mA tuvo una menor latencia de retención. Este resultado indicó que a partir de la cuarta sesión de extinción los sujetos del grupo de 1.0 mA empezaron a extinguir la conducta.

En la sesión 5 hubo diferencias significativas entre las medianas de las latencias de retención [$H(2) = 16.59, p = 0.0003$]. La prueba *post-hoc* mostró que la latencia de retención entre los grupos No-Ch y 1.0 mA fue significativamente diferente ($p = 0.0025$), también cuando se comparó el grupo de No-Ch y 3.0 mA ($p = 0.0016$). En ambos casos la latencia de retención del grupo de No-Ch fue menor que la de los otros grupos (Figura 8). Al comparar las latencias de retención entre los grupos 1.0 mA y 3.0 mA se observaron diferencias significativas ($p = 0.0012$). El grupo de 1.0 mA disminuyó la latencia de retención.

En la sesión 6 hubo diferencias significativas entre las medianas de las latencias de retención [$H(2) = 17.46, p = 0.0002$]. La prueba *post-hoc* mostró que la latencia de

retención entre los grupos No-Ch y 1.0 mA fue significativamente diferente ($p = 0.0057$), asimismo se observaron diferencias significativas cuando se comparó el grupo de No-Ch y 3.0 mA ($p = 0.0043$). En ambos casos la latencia de retención del grupo de No-Ch fue menor que la de los otros grupos (Figura 8). En la comparación de las latencia de retención entre los grupos 1.0 mA y 3.0 mA se observaron diferencias significativas ($p = 0.0003$). El grupo de 1.0 mA disminuyó la latencia de retención.

En última sesión de extinción (sesión 7) se observaron diferencias significativas entre las medianas de las latencias de retención [$H(2) = 15.92, p = 0.0003$]. La prueba *post-hoc* mostró que la latencia de retención entre los grupos de No-Ch y 1.0 mA fue significativamente diferente ($p = 0.0025$), también cuando se comparó el grupo de No-Ch y 3.0 mA ($p = 0.0016$). En ambos casos la latencia de retención del grupo de No-Ch fue menor que la de los otros grupos (Figura 8). La comparación de las latencia de retención entre los grupos de 1.0 mA y 3.0 mA mostró diferencias significativas ($p = 0.0022$), indicando de esta forma que el grupo de 1.0 mA disminuyó la latencia de retención, en comparación con el grupo de 3.0 mA.

Con estos resultados pudimos constatar que las ratas entrenadas con 3.0 mA tuvieron mayor resistencia a la extinción de la conducta de evitación, ya que se observó que a partir de la cuarta sesión de extinción el grupo de 1.0 mA comenzó a tener diferencias en las latencias de retención con respecto al grupo de 3.0 mA; es decir, el grupo de 1.0 mA empezó a extinguir la respuesta de evitación a partir de la sesión 4. Por lo tanto, se estableció como entrenamiento incrementado a la condición experimental de usar el choque de 3.0 mA.

PRUEBA DE EVITACIÓN INHIBITORIA (6 O 24 h DESPUÉS DEL ENTRENAMIENTO)

Una vez establecido que los choques de 1.0 mA y 3.0 mA inducen entrenamiento moderado e incrementado, respectivamente, se procedió con la prueba de retención de

EI, evaluada a las 6 h (durante el proceso de consolidación) después del entrenamiento (n = 15) y evaluada a las 24 h (MLP), después del entrenamiento (n = 15).

a) Latencia de entrada

La prueba de Kruskal-Wallis mostró que no hay diferencias significativas en las medianas de las latencia de entrada entre los grupos de No-Ch, 1.0 mA y 3.0 mA a los que se les midió la retención 6 h después del entrenamiento [$H(2) = 2.812, p = 0.2451$], ni entre los grupos a los que se les midió la retención 24 h después del entrenamiento [$H(2) = 5.801, p = 0.0550$] (Figura 9). Esto indica que los sujetos presentaron actividad motora similar en la ejecución de la tarea (entraron al compartimento en tiempos similares).

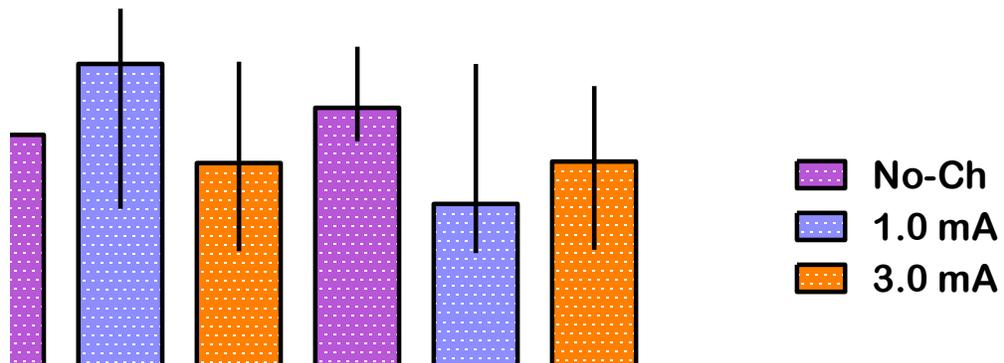


Figura 9. La latencia de entrada de los sujetos a los que se les realizó la prueba de retención a las 6 y 24 h. Medianas en s, con rangos intercuartiles, de los grupos entrenados con 0.0 (No-Ch), 1.0 o 3.0 mA (n = 15/grupo).

a) Latencia de escape

Para la latencia de escape, la prueba Kruskal-Wallis mostró diferencias significativas [$H(2) 29.37, p = 0.0001$] entre los grupos de No-Ch, 1.0 mA y 3.0 mA a los que se les midió la retención 6 h después del entrenamiento. La prueba *post-hoc*, U de Mann-

Whitney, mostró que hubo diferencias estadísticamente significativas entre el grupo No-Ch y el de 1.0 mA ($p = .0001$) y entre el grupo No-Ch y el grupo 3.0 ($p = 0.0001$). En ambos casos la latencia de escape fue mayor en el grupo de No-Ch ya que los sujetos no estaban motivados para regresar (escapar) al compartimento iluminado (Figura 10). Sin embargo para los grupos 1.0 mA y 3.0 mA no hubo diferencias significativas ($p = 0.5895$).

En cuanto a latencias de escape entre los grupos de 0.0, 1.0 y 3.0 mA a los que se les midió la retención 24 h después del entrenamiento, la prueba Kruskal-Wallis mostró diferencias estadísticamente significativas [$H(2) = 28.27$ $p = 0.0001$]. La prueba U de Mann-Whitney mostró diferencias estadísticamente significativas entre el grupo No-Ch y el grupo 1.0 mA ($p = 0.0002$), y entre el grupo No-Ch y el grupo 3.0 mA 24 h ($p = 0.0002$). En ambos casos la latencia de escape fue mayor en el grupo de No-Ch, ya que los sujetos no estaban motivados para regresar (escapar) al compartimento iluminado (Figura 10). La comparación entre los grupos de 1.0 mA y 3.0 mA no mostró diferencias significativas ($p = 0.8325$).



Figura 10. Latencias de escape. Medianas en s, con rangos intercuartiles, de los grupos entrenados con 0.0 mA (No-Ch) 1.0 mA o 3.0 mA (n = 15/grupo). Se muestra la latencia de escape de las ratas a las que se les realizó la prueba de retención 6 y 24 h después del entrenamiento. *** p < 0.0001 con respecto al No-Ch.

a) Latencia de retención

Con la prueba de Kruskal-Wallis se observaron diferencias significativas [$H(2) = 37.50, p = 0.0001$] entre los grupos de No-Ch, 1.0 mA y 3.0 mA a los que se les midió la retención 6 h después del entrenamiento. La prueba U de Mann-Whitney mostró diferencias estadísticamente significativas entre el grupo No-Ch y el grupo 1.0 mA ($p = 0.0001$) y entre el grupo No-Ch y 3.0 mA ($p = 0.0001$). En ambos casos la latencia de retención fue mayor en los grupos que recibieron choque eléctrico, manifestando así que las ratas recordaron la tarea (Figura 11). La comparación entre el grupo 1.0 mA y el grupo 3.0 mA no mostró diferencias significativas ($p = 1.000$).

En los grupos a los que les midió la retención 24 h después del entrenamiento, la prueba de Kuskal-Wallis también mostró diferencias estadísticamente significativas ($H[2] = 70.12, p = 0.0001$). La U de Mann-Whitney mostró diferencias estadísticamente

significativas entre el grupo No-Ch y el grupo 1.0 mA ($p = 0.0001$) y entre los grupos No-Ch y 3.0 mA ($p = 0.0001$). En ambos casos la latencia de retención fue mayor en los grupos que recibieron choque eléctrico, manifestando así que las ratas recordaron la tarea (Figura 11). La comparación entre los grupos 1.0 mA y 3.0 mA no mostró diferencias significativas ($p = 1.000$).

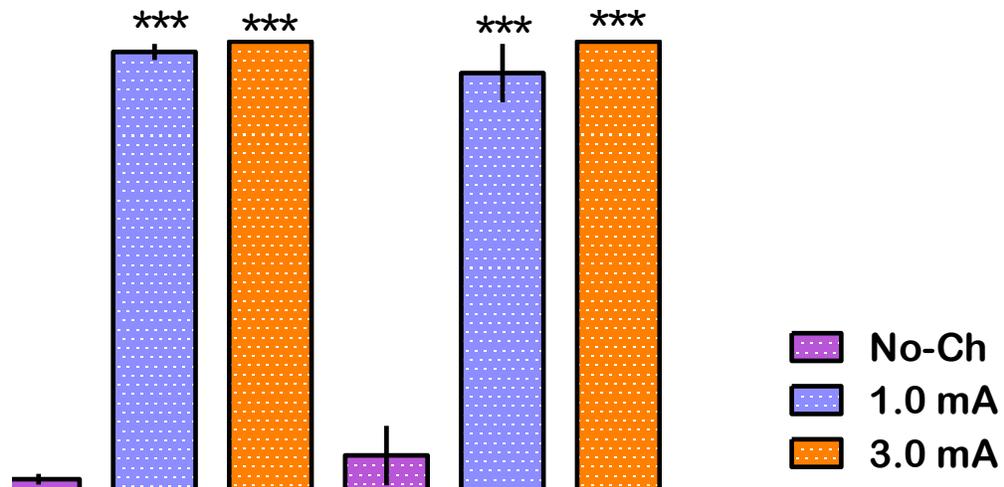


Figura 11. Latencias de retención. Medianas en s, con rangos intercuartiles, de la latencia de retención de los grupos entrenados con 0.0 (No-Ch), 1.0 o 3.0 mA ($n = 15$ /grupo) y a los que se les realizó la prueba de retención a las 6 o 24 h después del entrenamiento. *** $p < 0.0001$ con respecto al grupo de No-Ch.

Por otra parte se realizó un análisis, usando la prueba de U de Mann Whitney, para comparar cada una de las latencias obtenidas entre los grupos a los que se les realizó la prueba de retención a las 6 y 24 h, con la finalidad de observar diferencias entre ellos y constatar si la conducta varía en función al tiempo en el que fueron probados. Los resultados mostraron que no hubo diferencias entre ninguna comparación (Cuadro 2).

Cuadro 2. Comparación de las latencias de entrada, de escape y de retención entre los grupos probados 6 h y 24 h después del entrenamiento.

	<i>Latencia de entrada</i>	<i>Latencia de escape</i>	<i>Latencia de escape</i>
No-Ch 6 h vs. 24 h	p= 0.2625	p= 0.6186	p= 0.9009
1.0 mA 6 h vs. 24 h	p= 0.1463	p= 0.5895	p= 0.9720
3.0 mA 6 h vs. 24 h	p= 1	p= 0.6779	p= 0.9617

RESULTADOS CONDUCTUALES DE LOS SUJETOS QUE FUERON ANALIZADOS HISTOLÓGICAMENTE

Para realizar la cuantificación de las espinas dendríticas se seleccionaron solo 8 sujetos de los 15 que tenía cada uno de los grupos del experimento anterior; el criterio de selección fue que los 8 sujetos hubieran mostrado una latencia de retención máxima (600 s) (Figura 12). A continuación se presentan los resultados conductuales obtenidos de los sujetos seleccionados.

a) Latencia de entrada

La prueba Kruskal-Wallis mostró que no hubo diferencias significativas en la latencia de entrada [$H(2) = 0.3952$, $p = 0.8207$] entre los grupos 0.0 mA (No-Ch), 1.0 mA y 3.0 mA después del entrenamiento, pero sí se encontraron diferencias significativas en la latencia de escape entre los grupos a los que se les realizaría la prueba de retención a las 24 h después del entrenamiento [$H(2) = 10.12$, $p = 0.0063$]. La U de Mann-Whitney mostró diferencias estadísticamente significativas entre el grupo No-Ch y el grupo 1.0 mA ($p = 0.0104$), y los grupos No-Ch y 3.0 mA ($p = 0.0030$). Lo cual nos indica que las ratas de los grupos 1.0 mA y 3.0 mA mostraron menor latencia de entrada al compartimento oscuro comparado con el grupo de No-Ch (Figura 12-A).

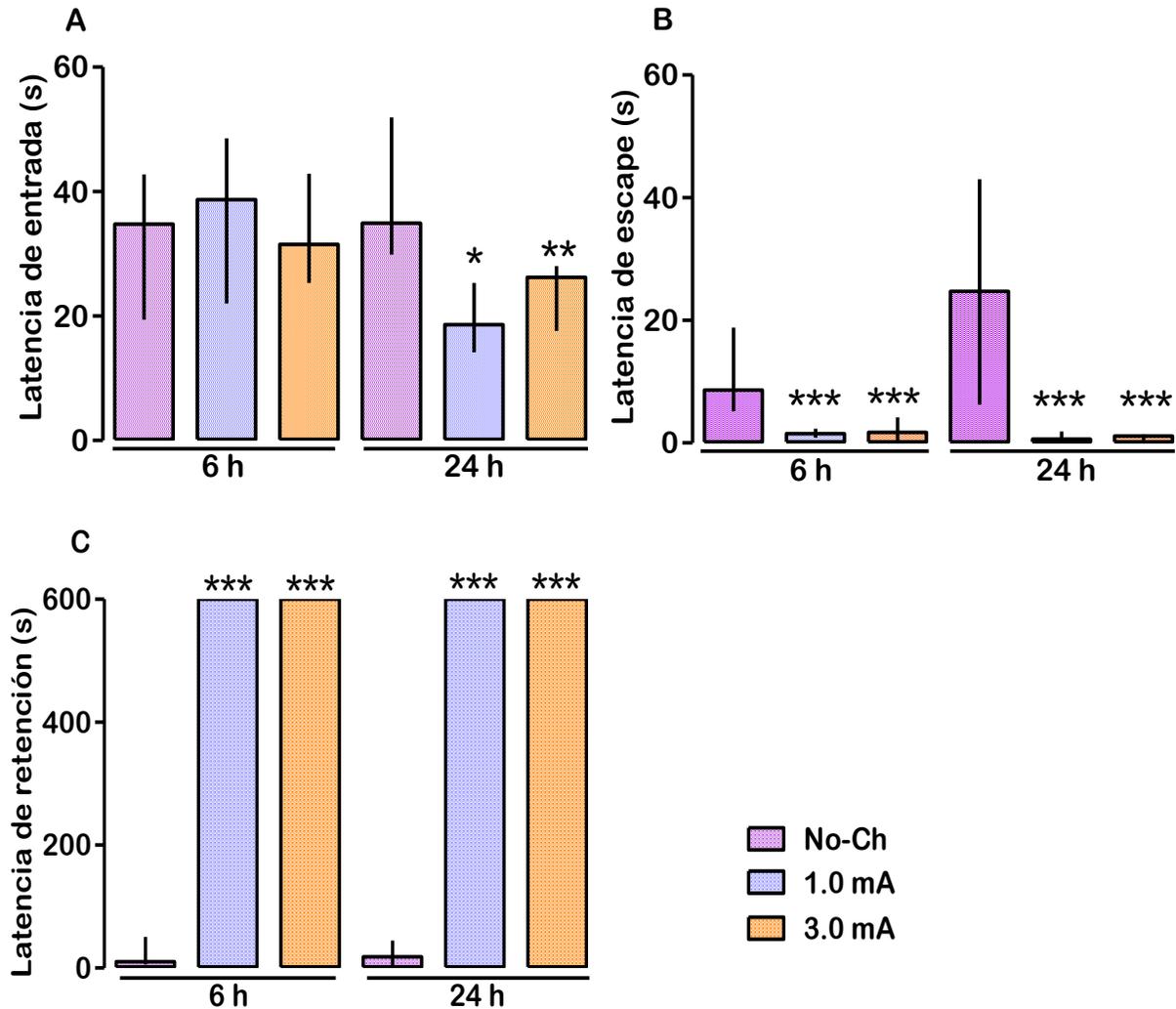


Figura 12. Medianas en s, con rangos intercuartiles, de los grupos entrenados con 0.0 (No-Ch), 1.0 o 3.0 mA (n = 8/grupo). A) Latencia de entrada. B) Latencia de escape. C) Latencia de retención. * p < 0.05, ** p < 0.001, *** p < 0.0001 con respecto al grupo control. La prueba de retención fue realizada a las 6 o 24 h después del entrenamiento, *** p < 0.0001 con respecto al grupo No-Ch.

b) Latencia de escape

La prueba de Kruskal-Wallis mostró que hubo diferencias significativas [H (2) = 15.42, p = 0.0004] en la latencia de escape entre los grupos No-Ch, 1.0 mA y 3.0 mA, a los que se les realizaría la prueba de retención a las 6 h después del entrenamiento. La prueba de U de Mann-Whitney mostró diferencias significativas entre el grupo No-Ch y el grupo 1.0 mA (p = 0.0002), y el grupo No-Ch y el grupo 3.0 mA (p = 0.0002). Los

resultados indicaron que las ratas del grupo 1.0 mA y el grupo 3.0 mA no mostraron diferencias entre ellos y además se observó que la latencia de escape al compartimento oscuro fue menor comparado con el grupo No-Ch, ya que al recibir el choque buscaron escapar a diferencia del grupo con No-Ch que no sintió ninguna estimulación aversiva (Figura 12-B).

Con respecto a los grupos considerados para realizar la prueba de retención a las 24 h después del entrenamiento, la prueba Kruskal-Wallis sí mostró diferencias significativas entre los grupos [$H(2) = 15.45$, $p = 0.0004$]. La prueba de U de Mann-Whitney indicó diferencias significativas entre el grupo No-Ch y el de 1.0 mA ($p = 0.0002$), y los grupos No-Ch y 3.0 mA ($p = 0.0002$). Las ratas de los grupos 1.0 mA y 3.0 mA no mostraron diferencias significativas entre ellos y además mostraron menor latencia de escape al compartimento oscuro, comparado con el grupo No-Ch, presentando el mismo comportamiento que las ratas a las que se les realizó la prueba 6 h después del entrenamiento (Figura 12-B).

c) Latencia de retención

La prueba Kruskal-Wallis mostró diferencias significativas [$H(2) = 19.15$, $p = 0.0001$] en la latencia de retención entre los grupos 0.0 mA, 1.0 mA y 3.0 mA, a los que se les realizó la prueba de retención a las 6 h después del entrenamiento. La prueba U de Mann-Whitney mostró diferencias entre el grupo No-Ch y el grupo 1.0 mA ($p = 0.0002$), y entre No-Ch y 3.0 mA ($p = 0.0002$). Los grupos 1.0 mA y el grupo 3.0 mA mostraron mayor latencia de retención comparados con el grupo No-Ch (Figura 12-C).

Con respecto a los grupos que se les realizó la prueba de retención a las 24 h después del entrenamiento, la prueba de Kruskal-Wallis mostró cambios estadísticamente significativos en la latencia de retención [$H(2) = 19.15$, $p = 0.0001$] entre los grupos No-Ch, 1.0 mA y 3.0 mA. La prueba de U de Mann-Whitney mostró diferencias entre el grupo No-Ch y el grupo 1.0 mA ($p = 0.0002$), y entre el grupo No-Ch y el grupo 3.0 mA ($p = 0.0002$). Los grupos 1.0 mA y 3.0 mA mostraron mayor latencia de retención comparados con el grupo de No-Ch (Figura 12-C).

RESULTADOS HISTOLÓGICOS

GRUPOS CONTROL

Se compararon los grupos control de cada experimento para determinar si hay diferencias significativas entre ellos y, en caso de no haberla, poder designar a uno de ellos como control único, contra el cual comparar todos los grupos experimentales.

1) Controles de espinas totales encontradas en 30 μm

Para la cuantificación total de espinas a lo largo de 30 μm se aplicó una prueba de análisis de varianza (ANOVA) de una vía comparando entre sí los grupos Bio, No-Ch y Sch 3.0 mA, estos grupos realizaron la prueba de retención a las 6 h después del entrenamiento y no se encontraron diferencias significativas entre ellos ($F_{(2, 21)} = 0.07357$, $p = 0.9293$). Se compararon también los grupos Bio, No-Ch y Sch 3.0 mA, estos grupos realizaron la prueba de retención a las 24 h después del entrenamiento y tampoco se observaron diferencias significativas ($F_{(2, 21)} = 2.026$, $p = 0.1568$) (Figura 13).

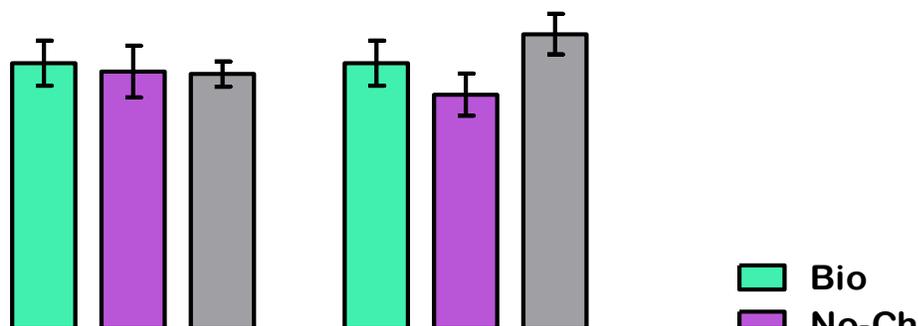


Figura 13. Cuantificación del total de espinas dendríticas encontradas en 30 μm Promedio \pm error estándar. La cuantificación de espinas de la densidad total/30 de los grupos Bio, No-Ch y Sch 3.0 mA ($n = 8/\text{grupo}$) a los que se les realizó la prueba de retención 6 o 24 h después del entrenamiento. No se observaron diferencias significativas entre los grupos.

2) Controles de espinas tipo cortas

La prueba de ANOVA de una vía mostró que no hay diferencias significativas al comparar la proporción de espinas cortas de los grupos de Bio, No-Ch y Sch 3.0 mA; estos grupos realizaron la prueba de retención 6 h después del entrenamiento ($F_{(2, 21)} = 0.7919$, $p = 0.4661$). Tampoco se observaron diferencias significativas al comparar los grupos Bio, No-Ch y Sch 3.0 mA, estos grupos realizaron la prueba de retención 24 h después del entrenamiento [$F_{(2, 21)} = 0.5105$, $p = 0.6075$] (Figura 14).

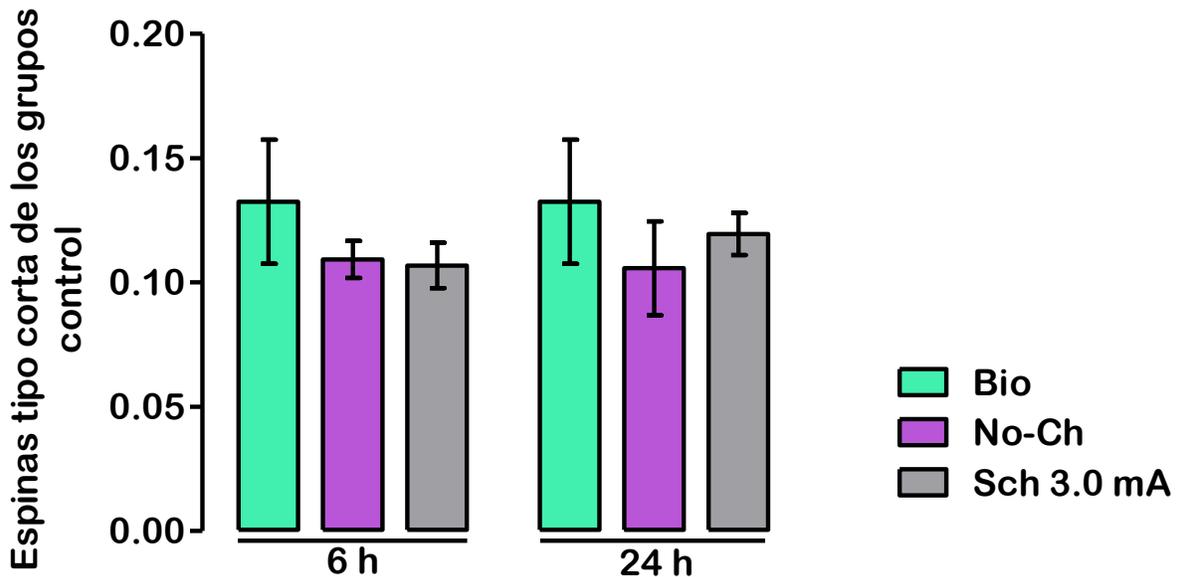


Figura 14. Densidad relativa de las espinas dendríticas tipo cortas de los grupos control. Promedio \pm error estándar, la cuantificación de espinas tipo cortas de los grupos control Bio, No-Ch y Sch 3.0 mA ($n = 8$ /grupo) a los que se les realizó la prueba de retención 6 o 24 h después del entrenamiento. No se observaron diferencias significativas entre los grupos.

3) Controles de espinas tipo delgadas

La prueba de ANOVA de una vía mostró que no hay diferencias significativas [$F_{(2, 21)} = 2.7111$, $p = 0.0897$] al comparar el promedio obtenido de las espinas tipo delgadas/total de espinas, entre los grupos control Bio, No-Ch y Sch 3.0 mA que realizaron la prueba de retención 6 h después del entrenamiento. Tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas [$F_{(2, 21)} = 0.8480$, $p = 0.4424$] al comparar los grupos Bio, No-Ch y Sch 3.0 mA que realizaron la prueba de retención 24 h después del entrenamiento (Figura 15).

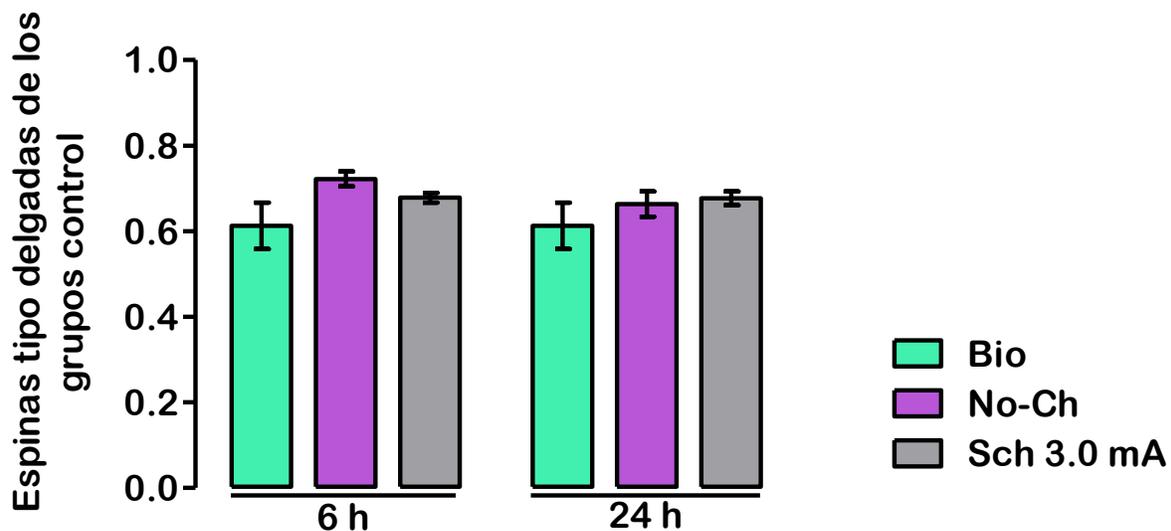


Figura 15. Densidad relativa de espinas tipo delgada de los grupos control. Promedio \pm error estándar, la cuantificación de espinas tipo delgadas de los grupos control Bio, No-Ch y Sch 3.0 mA ($n = 8/\text{grupo}$) a los que se les realizó la prueba de retención 6 o 24 h después del entrenamiento. No se observaron diferencias significativas entre los grupos.

4) Controles de espinas tipo hongo

La prueba de ANOVA de un vía mostró que no hay diferencias significativas al comparar el promedio obtenido de la densidad relativa de las espinas tipo hongo [$F_{(2, 21)}$]

= 2.080, $p = 0.1499$], entre los grupos control Bio, No-Ch y Sch 3.0 mA; estos grupos realizaron la prueba de retención 6 h después de entrenamiento. Tampoco se observaron diferencias significativas al comparar los grupos Bio, No-Ch y Sch 3.0 mA [$F_{(2, 21)} = 1.117$, $p = 0.3459$], estos grupos realizaron la prueba de retención 24 h después del entrenamiento (Figura 16).

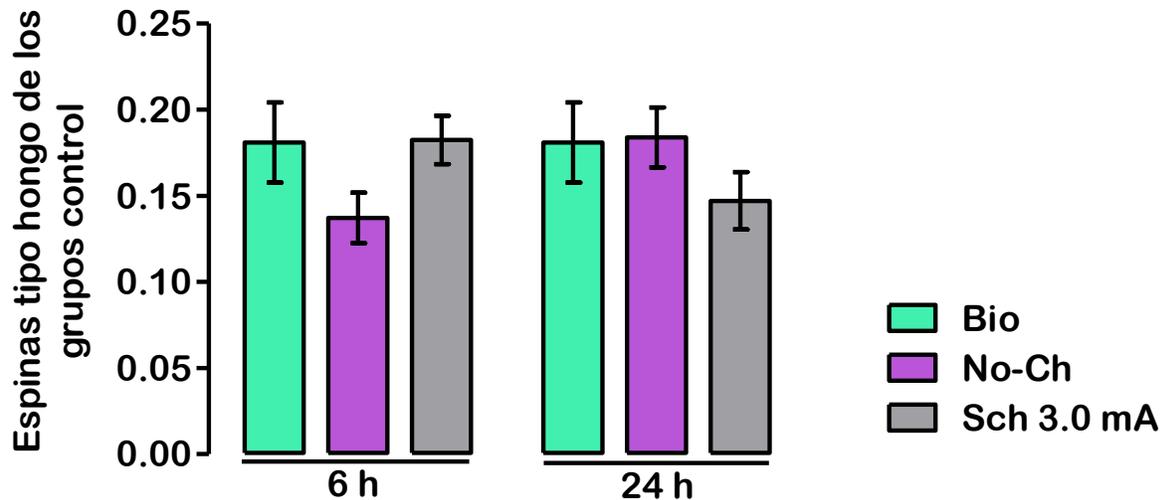


Figura 16. Densidad relativa de espinas tipo hongo de los grupos control. Promedio \pm error estándar, de la cuantificación de espinas tipo hongo de los grupos control Bio, No-Ch y Sch 3.0 mA ($n = 8$ /grupo) a los que se les realizó la prueba de retención 6 o 24 h después del entrenamiento. No se observaron diferencias significativas entre los grupos.

5) Controles de espinas tipo bifurcadas

La prueba de ANOVA de una vía mostró que no hay diferencias significativas [$F_{(2, 21)} = 1.866$, $p = 0.1795$] al comparar el promedio de la densidad relativa de las espinas tipo bifurcadas, entre los grupos control Bio, No-Ch y Sch 3.0 mA, estos grupos realizaron la prueba de retención 6 h después del entrenamiento. Tampoco se observaron diferencias significativas al comparar los grupos Bio, No-Ch y Sch 3.0 mA [F

(2, 21) = 0.08581, p = 0.9181]; estos grupos realizaron la prueba de retención 24 h después del entrenamiento (Figura 17).

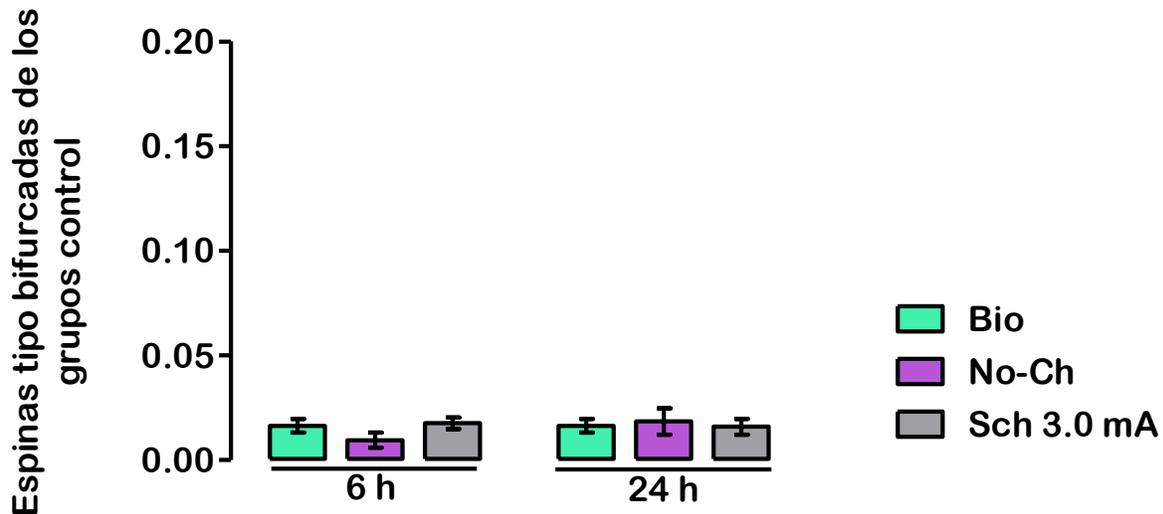


Figura 17. Densidad relativa de espinas tipo bifurcadas de los grupos control. Promedio \pm error estándar, la cuantificación de espinas tipo bifurcada de los grupos control Bio, No-Ch y Sch 3.0 mA (n= 8/grupo) a los que se les realizó la prueba de retención 6 o 24 h después del entrenamiento. No se observaron diferencias significativas entre los grupos.

GRUPOS EXPERIMENTALES

Después de realizar el análisis de los grupos control y al no observar diferencias significativas se eligió el grupo No-Ch para comparar con los grupos experimentales, debido a que este grupo fue sometido a todas las condiciones del entrenamiento de los grupos experimentales, excepto por la administración del choque eléctrico. Para este análisis estadístico se aplicó un ANOVA de una vía, tanto para las ratas que fueron sometidas a la prueba 6 h después del entrenamiento como las que fueron sometidas a la prueba 24 h después del entrenamiento.

CUANTIFICACIÓN DE ESPINAS TOTALES ENCONTRADAS EN 30 μm

En la cuantificación del número de espinas encontradas a lo largo de 30 μm , el análisis ANOVA de una vía reveló que entre los grupos No-Ch, 1.0 mA y 3.0 mA a los que se les realizó la prueba de retención 6 h después del entrenamiento no hubo diferencias estadísticamente significativas [$F_{(2)} = 2.299$, $p = 0.125$]. Los grupos No-Ch, 1.0 mA y 3.0 mA, a los que se les realizó la prueba de retención 24 h después del entrenamiento tampoco presentaron diferencias estadísticamente significativas [$F_{(2)} = 2.416$, $p = 0.113$] (Figura18).

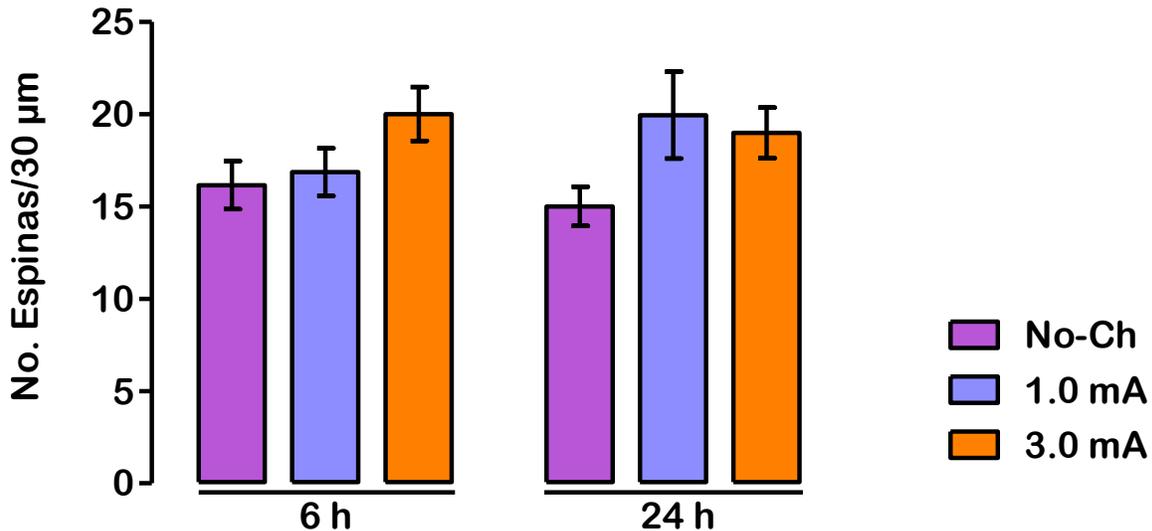


Figura 18. Densidad de espinas dendríticas. Promedio \pm error estándar, de la densidad total de espinas encontradas a lo largo de 30 μm de los grupos No-Ch, 1.0 mA y 3 mA ($n = 8/\text{grupo}$), los cuales realizaron la prueba de retención a las 6 o 24 h después del entrenamiento.

CUANTIFICACIÓN DEL TIPO DE ESPINAS ENCONTRADAS EN 30 μm

Las espinas evaluadas en la cuantificación total fueron clasificadas de acuerdo a su morfología en espinas de tipo corta, delgada, hongo y bifurcadas (Figura 5). Se obtuvo la proporción de cada tipo de espinas con respecto al total de espinas, y a continuación se muestran los resultados obtenidos.

a) Espinas tipo corta

El cálculo de la densidad relativa a partir de la cuantificación de las espinas tipo cortas reveló que no hubo diferencias estadísticamente significativas [$F_{(2)} = 0.455$, $p = 0.640$] entre los grupos entrenados con 0.0 mA (No-Ch), 1.0 mA y 3.0 mA, a los que se les realizó la prueba de retención 6 h después del entrenamiento. Los grupos entrenados con No-Ch, 1.0 mA y 3.0 mA a los que se les realizó la prueba de retención 24 h después del entrenamiento, tampoco mostró diferencias estadísticamente significativas [$F_{(2)} = 0.478$, $p = 0.626$] (Figura 19).

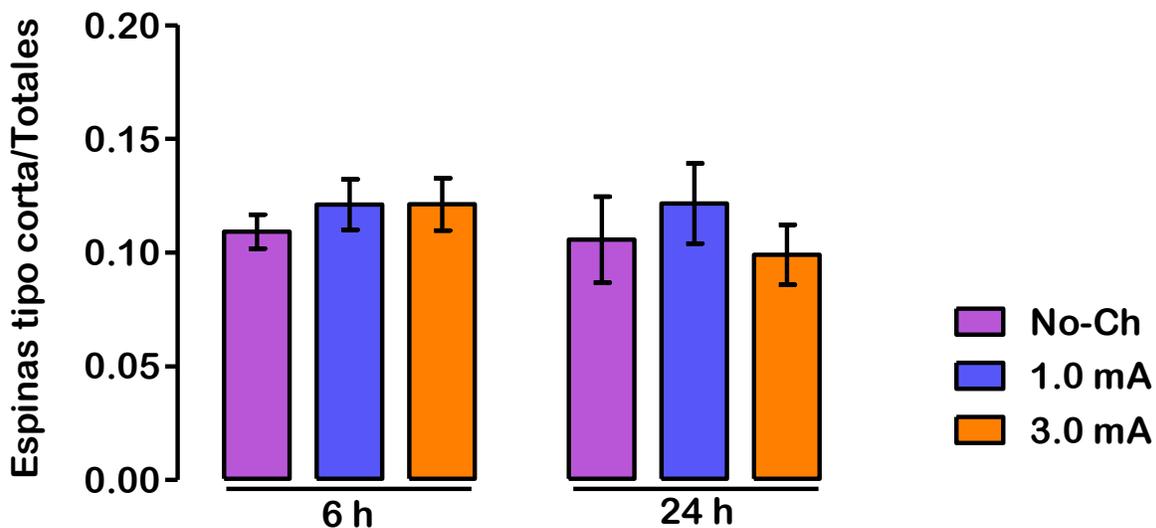


Figura 19. Densidad relativa de la cuantificación del tipo de espina corta. Promedio \pm error estándar de la proporción de espinas tipo cortas/total de espinas en 30 μm de los grupos No-Ch, 1.0 mA y 3.0 mA ($n = 8/\text{grupo}$), los cuales realizaron la prueba de retención 6 o 24 h después del entrenamiento.

b) Espina tipo delgada

El análisis ANOVA reveló que entre los grupos No-Ch, 1.0 mA y 3.0 mA, a los que se les realizó la prueba de retención 6 h después del entrenamiento, no hubo diferencias estadísticamente significativas en la proporción de espinas delgadas [$F_{(2)} = 2.815$, $p = 0.082$]. Los grupos No-Ch, 1.0 mA y 3.0 mA a los que se les realizó la prueba de retención 24 h después del entrenamiento, tampoco mostraron diferencias estadísticamente significativas [$F_{(2)} = 1.019$, $p = 0.378$] (Figura 20). No hubo diferencias en la densidad relativa de este tipo de espinas.

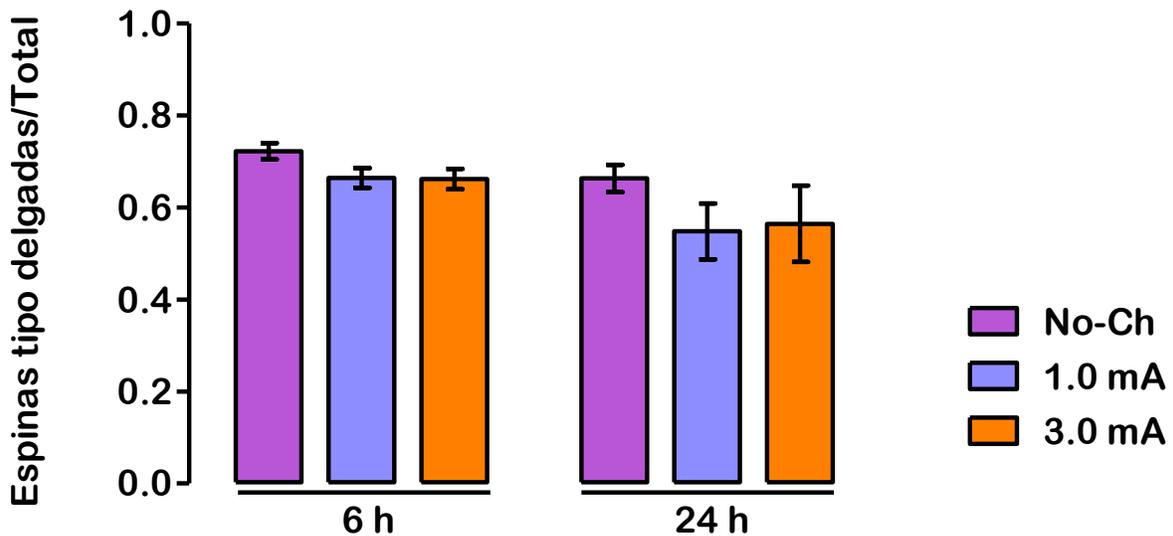


Figura 20. Densidad relativa del tipo de espina delgada. Promedio \pm error estándar de la proporción de espinas tipo delgadas/30 μm de los grupos de No-Ch, 1.0 mA y 3.0 mA ($n = 8/\text{grupo}$), los cuales realizaron la prueba de retención 6 o 24 h después del entrenamiento.

c) Espina tipo hongo

Para la densidad relativa del tipo de espina hongo el análisis ANOVA reveló que entre los grupos No-Ch, 1.0 mA y 3.0 mA, a los que se les realizó la prueba de retención 6 h después del entrenamiento, no hubo diferencias estadísticamente significativas [$F_{(2)} = 0.833$, $p = 0.448$]. Los grupos 0.0 (No-Ch), 1.0 mA y 3.0 mA, a los

que se les realizó la prueba de retención 24 h después del entrenamiento, mostraron diferencias estadísticamente significativas [$F(2) = 3.763$, $p = 0.040$] (Figura 21). La prueba *post-hoc* Fisher, mostró diferencias estadísticamente significativas entre el grupo No-Ch y el grupo 1.0 mA ($p < 0.05$) y entre el grupo 1.0 mA y el grupo 3.0 mA ($p < 0.05$). Los datos indican que hubo un incremento en la densidad relativa de este tipo de espina en los sujetos entrenados con 1.0 mA y a los que se les realizó la prueba de retención 24 h después del entrenamiento, con respecto al grupo No-Ch y 3.0 mA (Figura 21).

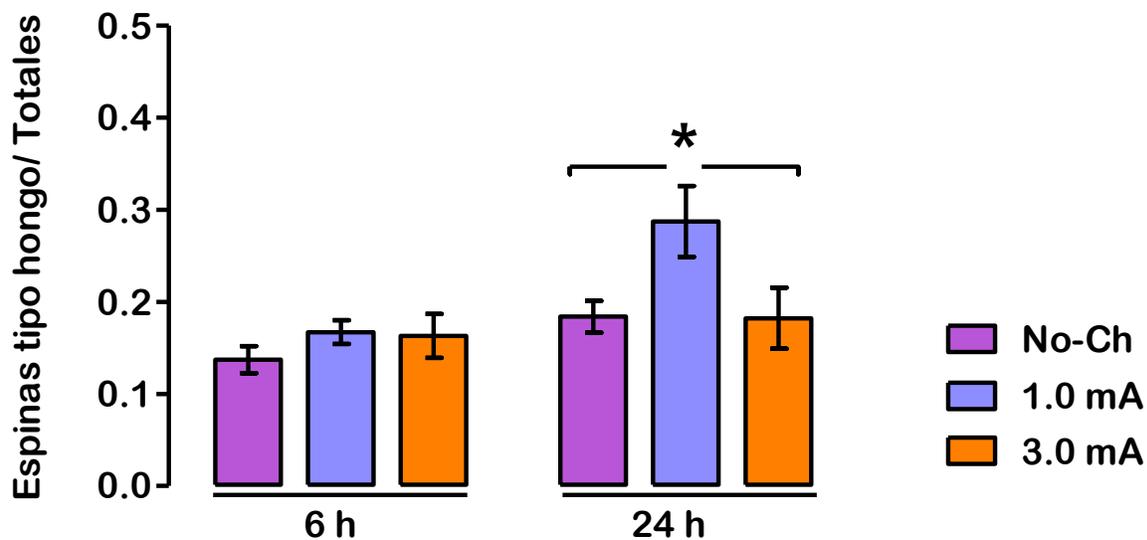


Figura 21. Densidad relativa del tipo de espina hongo. Promedio \pm error estándar de la proporción de espinas tipo hongo/30 μm de los grupos de No-Ch, 1.0 mA y 3.0 mA ($n=8/\text{grupo}$), que realizaron la prueba de retención 6 o 24 h después del entrenamiento. * significa $p < 0.05$, con respecto al grupo de No-Ch y 1.0 mA que realizaron la prueba de retención 24 h después del entrenamiento.

d) Espina tipo bifurcada

El análisis ANOVA reveló que entre los grupos No-Ch, 1.0 mA y 3.0 mA, a los que se les realizó la prueba de retención 6 h después del entrenamiento, no hubo diferencias estadísticamente significativas [$F(2) = 2.378$, $p = 0.117$]. Los grupos

entrenados con 0.0 (No-Ch), 1.0 mA y 3.0 mA, a los que se les realizó la prueba de retención 24 h después del entrenamiento, tampoco mostraron diferencias estadísticamente significativas [$F_{(2)} = 0.828$, $p = 0.450$] (Figura 22).

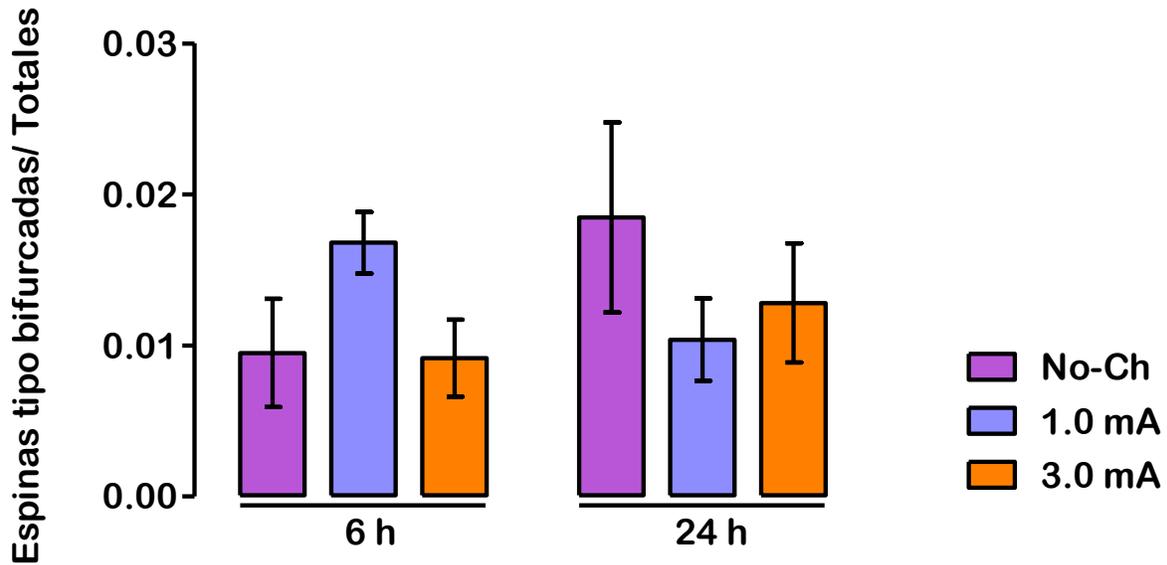


Figura 22. Densidad relativa del tipo de espina bifurcada. Promedio \pm error estándar de la proporción de espinas tipo bifurcadas/30 μ m de los grupos de No-Ch, 1.0 mA y 3.0 mA ($n = 8$ /grupo), que realizaron la prueba de retención 6 o 24 h después del entrenamiento.

9. DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo fue evaluar si el nivel de entrenamiento moderado o incrementado en la tarea de evitación inhibitoria produce cambios en la densidad y el tipo de espinas dendríticas en neuronas piramidales de la capa III de la región agranular de la corteza insular. Se propuso que los cambios plásticos podrían subyacer el efecto protector observado en el sobrerreforzamiento de una tarea aprendida. Para ello se evaluaron los cambios en la densidad y la proporción relativa del tipo de espinas dendríticas de neuronas piramidales de la corteza insular, tanto en condiciones de

entrenamiento moderado como incrementado y en dos tiempos en los que se realizó la prueba de retención (6 o 24 h después del entrenamiento).

Los resultados conductuales de esta tesis muestran que los grupos de ratas entrenadas presentaban las mismas respuestas motoras y reflejas (latencia de entrada y escape) al momento del entrenamiento, independientemente del tipo de entrenamiento al que estuvieron sometidos (moderado o incrementado).

En la prueba de extinción, los resultados mostraron que las ratas entrenadas con la intensidad de choque de 3.0 mA, aún no extinguían la respuesta condicionada en el séptimo día de la prueba de extinción. Este resultado concuerda con un estudio realizado por Garín-Aguilar y colaboradores (2012), en el que entrenaron ratas en la tarea de EI con intensidades de choque de 1.0, 2.0 o 3.0 mA y probaron su resistencia a la extinción. Ellos encontraron que después de 6 sesiones de extinción, las ratas que fueron entrenadas con el choque de 3.0 mA presentaban una excelente respuesta condicionada, mientras que las que fueron entrenadas con 1.0 mA, en la sexta sesión se comportaron como las ratas que no recibieron el choque eléctrico, es decir su conducta se extinguió totalmente. Estos datos refuerzan la idea de que el entrenamiento incrementado induce una mayor resistencia a la extinción. En otro trabajo en el que se aplicaron intensidades de choque de 1.0, 2.0 y 3.0 mA para la tarea de EI, a ratas a las que se les administró lidocaína (para inhibir la actividad eléctrica neuronal) en la sustancia nigra, el estriado y la amígdala, se observó que con intensidades bajas (1.0 o 2.0 mA) la lidocaína producía un deterioro en la memoria. Por el contrario, con el entrenamiento incrementado con 3.0 mA el deterioro no ocurría y por lo tanto las ratas recordaban la tarea (Salado-Castillo, Sánchez-Alavéz, Quirarte, Martínez García, & Prado-Alcalá, 2011). Los resultados nos llevan a inferir que el entrenamiento incrementado de 3.0 mA produce un efecto protector contra el deterioro de la memoria y una alta resistencia a la extinción.

Con respecto a los resultados de la cuantificación total de espinas, se esperaba que los sujetos que fueron entrenados en la tarea de EI presentarían un incremento en el número de espinas con respecto al grupo control, ya que en otros estudios en los que se utilizó la tarea de EI en estructuras como el hipocampo se observó un aumento en la

densidad de espinas (Doubell & Stewart, 1993; O'Connell et al., 1997; O'Malley et al., 1998; Stewart & Rusakov, 1995). También se esperaba que los grupos con entrenamiento incrementado tuvieran un aumento mayor en la densidad de espinas con respecto al entrenamiento moderado, pues en un estudio reciente, en donde se cuantifico la densidad de espinas en el estriado, se observó que el entrenamiento incrementado de la EI aumentaba la densidad de espinas dendríticas en esta región (Bello-Medina et al., 2015). Sin embargo, los resultados que se obtuvieron no presentaron diferencias estadísticamente significativas, ni en los sujetos a los que se les realizó la prueba de retención a las 6 h, ni a los que se les realizó a las 24 h. Estos resultados podrían estar indicando que la CI no juega un papel tan importante para la consolidación de este tipo de tarea. No obstante, las modificaciones estructurales pueden agruparse en dos categorías: 1) cambios en la densidad de sinapsis; y 2) cambios en la sinapsis ya existentes (Bailey & Kandel, 1993). Además, se ha propuesto que una vez que se forman nuevas espinas debido al aprendizaje y conforme pasa el tiempo, hay una reorganización en la que se eliminan viejos contactos sinápticos en las sinapsis no funcionales, lo cual se refleja en la reducción del número total de espinas dendríticas (Bailey, Kandel, & Harris, 2015). Por lo tanto, el hecho de que no se observaran diferencias significativas en la densidad total de espinas dendríticas podría deberse a que las modificaciones estructurales que ocurrieron durante la consolidación de la memoria se dieron en espinas pre-existentes, es decir, que las espinas dendríticas que ya estaban presentes sufrieron cambios en su morfofisiología, posiblemente aumentando el tamaño de su cabeza y por lo tanto el de la densidad postsináptica (Greenough & Bailey, 1988).

Una vez que evaluamos por separado cada tipo de espina, solamente encontramos un aumento en las espinas tipo hongo 24 h después del entrenamiento, pero sólo en los sujetos que fueron entrenados con 1.0 mA. Se sabe que las espinas tipo hongo son el tipo de espinas más estables, y por lo tanto se les ha asociado a procesamientos de consolidación de memoria (Bourne & Harris, 2007; Fu & Zuo, 2011); por lo que el aumento que se observó en las espinas de este tipo podrían estar indicando la participación de la CI en la consolidación de la tarea de EI en condiciones de entrenamiento moderado. Esto concuerda con lo observado en un estudio realizado

por Muñoz-Sánchez en 2012, en el que evaluó el efecto protector del entrenamiento incrementado de la tarea de EI contra el efecto bloqueador de la anisomicina en la corteza insular; sus resultados muestran que en el entrenamiento moderado (1.0 mA) la consolidación de la memoria se ve bloqueada y por lo tanto se puede inferir la participación de la CI en la consolidación de la tarea de EI con entrenamiento moderado, pero cuando hay un incremento en el entrenamiento (3.0 o 5.0 mA) la consolidación ya no se ve bloqueada, por lo que la anisomicina ya no interfiere con la formación de la memoria.

Otro trabajo que nos lleva a pensar en el tipo de participación que la CI tiene en la formación de memoria del entrenamiento de la tarea de EI, son los datos mostrados por Fornari y colaboradores (2012), que observaron que si administraban 3 ng de RU28362 (un agonista del receptor a glucocorticoides) bilateralmente en la CI, inmediatamente después de que las ratas fueran entrenadas en la tarea de EI (choque eléctrico 0.75 mA), la retención de la tarea se incrementaba, con lo cual se infirió la participación del receptor a glucocorticoides (GR, por sus siglas en inglés) en la corteza insular. En este mismo trabajo evaluaron el efecto de la administración de corticosterona, (administración subcutánea, en una dosis de 1 mg/kg) sobre la retención de la memoria generada por la tarea de EI y observaron un incremento en la retención de esta tarea. Posteriormente midieron la actividad neuronal de las ratas entrenadas, por medio de inmunohistoquímica para ver el número de células positivas que expresaban pERK1/2 (ERK fosforilada); ellos propusieron estudiar el patrón de la expresión de pERK1/2 ya que ERK (cinasa señalizadora extracelular) es una enzima que ha sido implicada tanto en la plasticidad neuronal como en la consolidación de la memoria. Observaron que el entrenamiento en EI incrementaba el número de neuronas positivas que expresaban pERK1/2, es decir que la actividad neuronal de la CI se incrementó debido al aprendizaje de la tarea de EI; pero el grupo experimental al que se le administró corticosterona (1 mg/kg) inmediatamente después del entrenamiento, tuvo un decremento en el número de células positivas que expresaban pERK1/2. Interpretaron este resultado como que hay una inactivación de la CI cuando los niveles de corticosterona son más altos, con lo cual ellos proponen que la CI debe de estar inactivada para que otra estructura sea la que se encargue del procesamiento de la

información con altos niveles de corticosterona, con esto proponen que el nivel de glucocorticoides puede activar o inhibir la actividad neuronal de la CI (Fornari et al., 2012)

Los resultados obtenidos en la presente tesis son consistentes con los de Fornari y colaboradores ya que hay evidencias de que el nivel de glucocorticoides se incrementa dependiendo de la intensidad de choque que se aplique en la tarea de EI (González-Franco D.A; comunicación personal, enero de 2015). Por otro lado, se sabe que en condiciones de estrés se activa el eje Hipotalámico-Pituitario-Adrenal y en consecuencia hay secreción de hormonas adrenales como los glucocorticoides (Akirav, Sandi, & Richter-Levin, 2001). Las ratas en este trabajo se sometieron a un entrenamiento incrementado, es decir recibieron un estímulo aversivo intenso (choque eléctrico de 3.0 mA), por lo que podemos inferir que presentaban niveles altos de corticosterona.

Además en el trabajo de Fornari las ratas a las que se les aplicó corticosterona mostraron un decremento en la expresión de pERK1/2, suprimiéndose la plasticidad sináptica y la actividad neuronal. Con base en lo anterior, en los resultados en los que no observamos cambios significativos en la densidad de las espinas, ni en el tipo de espinas de sujetos entrenados con 3.0 mA, podríamos sugerir que al no haber ERK activado no se están realizando cambios anatómicos de las espinas. Se conoce que ERK es uno de los moduladores en los cambios sinápticos, pues fosforila la cortactina, una proteína de unión de actina, la cual promueve la polimerización y remodelamiento de las fibras de actina de las espinas dendríticas (Ikeda et al., 2015).

Lo anterior nos lleva a suponer que la CI sólo está participando en la consolidación de la memoria de la EI en condiciones de **entrenamiento moderado**, para el caso del **entrenamiento incrementado** podría ser que otras estructuras son las encargadas del procesamiento de este tipo de información altamente aversiva, y por tal motivo no se observan cambios significativos en las espinas dendríticas de la CI. Esto podría ser explicado con ayuda de la teoría de los sistemas múltiples de memoria, pues a partir de diversos experimentos se ha planteado que un conjunto o varios conjuntos de estructuras participan ya sea en el aprendizaje de una tarea o en la consolidación de

la tarea, o en ambos procesos (McDonald & White, 1993; Rains, 2002). También se ha planteado la hipótesis de que dependiendo del paradigma de aprendizaje algunas estructuras serán más imprescindibles que otras, por ejemplo, diversos estudios han demostrado que el hipocampo participa en tareas que involucran componentes espaciales como es el caso del laberinto acuático (en su versión espacial); por su parte, se ha visto que la CI es esencial en la tarea de condicionamiento aversivo al sabor (CAS) (Alves et al., 2013; Braun, Lasiter, & Kiefer, 1982). Por otro lado, se ha propuesto que se pueden dar dos situaciones en los sistemas múltiples de memoria: 1) cooperatividad y 2) competitividad (McDonald & White, 1993), esta última situación podría dar respuesta a la inactivación que se observó en el trabajo de Forani y al hecho de que sólo se observaron cambios en las ratas entrenadas con 1.0 mA. Aparte de la idea de los sistemas múltiples de memoria, hay un modelo que propone que en condiciones de entrenamiento moderado diferentes estructuras que participan en la consolidación de la memoria se encuentran conectadas funcionalmente en serie, por lo tanto la información derivada de una experiencia de aprendizaje es transmitida por todas las estructuras para llegar a algún centro de integración. Por el contrario, en condiciones de entrenamiento incrementado las estructuras que originalmente estaban conectadas en serie sufren un cambio y se conectan funcionalmente en paralelo. De tal forma que aunque alguna de las estructuras del circuito no funcione normalmente o esté dañada, la actividad derivada de la experiencia de aprendizaje podrá seguir su trayecto hacia el posible centro integrador (Prado-Alcalá et al., 2006).

Ahora bien, si recordamos las conexiones de la corteza insular con otras estructuras como la amígdala, las cortezas prefrontal, perirrinal y entorrinal (Augustine, 1996; Miranda & McGaugh, 2004; Nagai et al., 2007; Stephani et al., 2011) probablemente, éstas también estén participando en la regulación de la consolidación de la memoria de la tarea de EI y que en condiciones de entrenamiento incrementado, en el que hay un aumento en los niveles de corticosterona, sean éstas las que se activen cuando la CI esta inhibida. Sin embargo, la conexión con la amígdala podría ser la más relevante para este trabajo ya que se ha demostrado que la amígdala es importante para la expresión del condicionamiento al miedo y varias estructuras cerebrales pueden activar a la amígdala durante la presentación de un estímulo de

miedo, entre ellas la CI (Miranda & McGaugh, 2004). La amígdala recibe aferencias provenientes de la CI, por lo que la CI estaría desempeñando un papel de activación de la amígdala para la mediación de comportamientos motivados por componentes aversivos. También se ha demostrado que la actividad tanto de la CI como de la amígdala son necesarias para la formación de las memorias aversivas al sabor (Alves et al., 2013). Al mismo tiempo se ha demostrado que en el procesamiento de información de la tarea de evitación inhibitoria participan tres estructuras cerebrales como son el hipocampo (componente espacial), la amígdala (componente aversivo) y el estriado (componente de procedimiento) (McDonald & White, 1993). Sin embargo, cabe recordar que la región que se evaluó fue la región agranular de la CI y se sabe que tiene conexiones principalmente con la corteza perirrinal y la corteza lateral entorrinal (Mathiasen, Hansen, & Witter, 2015), las cuales a su vez se ha visto que tienen aferencias con la amígdala y el hipocampo (Augustine, 1996).

En el presente trabajo el aumento en la proporción del tipo de espina hongo, en las ratas entrenadas con 1.0 mA y a las que se les realizó la prueba 24 h después del entrenamiento, sugiere que este tipo de espina de la CI ésta participando en la MLP de la EI en condiciones de entrenamiento moderado, pues sabemos que las espinas hongo presentan sinapsis más estables, por lo que se les considera como “espinas de memoria”. El que no se observara un aumento en condiciones de entrenamiento incrementado podría sugerir que se activa otra estructura cerebral, aunque sería importante analizar las demás regiones (granular y disgranular) de la CI para ver el comportamiento de éstas en condiciones de los dos tipos de entrenamiento.

10. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en esta tesis indican que:

1. A las 6 y a las 24 h, el entrenamiento moderado de la tarea de evitación inhibitoria no indujo cambios en la densidad total de espinas dendríticas en la corteza insular.

2. A las 6 y las 24 h, el entrenamiento incrementado de la tarea de evitación inhibitoria no indujo cambios en la densidad total de espinas dendríticas en la corteza insular.
3. A las 6 h, el entrenamiento moderado de la tarea de evitación inhibitoria no indujo cambios en la densidad relativa de ningún tipo de espina dendrítica en la corteza insular.
4. A las 6 h, el entrenamiento incrementado de la tarea de evitación inhibitoria no indujo cambios en la densidad relativa de ningún tipo de espina dendrítica en la corteza insular.
5. A las 24 h, el entrenamiento moderado de la tarea de evitación inhibitoria solamente indujo un aumento en la densidad relativa de espinas dendríticas de tipo hongo en la corteza insular.
6. A las 24 h, el entrenamiento incrementado de la tarea de evitación inhibitoria no indujo cambios en la densidad relativa de ningún tipo de espinas dendríticas en la corteza insular.

De lo anterior se desprende que:

7. Las espinas dendríticas de tipo hongo de la corteza insular están involucradas en la memoria de largo plazo de la tarea de evitación inhibitoria, mediada por un entrenamiento moderado, pero no están involucradas en la memoria de largo plazo mediada por un entrenamiento incrementado.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguado-Aguilar, L. (2001). Aprendizaje y memoria. *Revista de Neurología*, 32(4), 373-381
- Akirav, I., Sandi, C., & Richter-Levin, G. (2001). Differential activation of hippocampus and amygdala following spatial learning under stress. *European Journal of Neuroscience*, 14(4), 719-725. doi: 10.1046/j.0953-816x.2001.01687.x.
- Almaguer-Melian, W., & Bergado-Rosado, J. A. (2002). Interacciones entre el hipocampo y la amígdala en proceso de plasticidad sináptica. Una clave para entender las relaciones entre motivación y memoria. *Revista de Neurología*, 35(6), 586-593
- Alves, F. H., Gomes, F. V., Reis, D. G., Crestani, C. C., Correa, F. M., Guimaraes, F. S., & Resstel, L. B. (2013). Involvement of the insular cortex in the consolidation and expression of contextual fear conditioning. *The European Journal of Neuroscience*, 38(2), 2300-2307. doi: 10.1111/ejn.12210
- Augustine, J. R. (1996). Circuitry and functional aspects of the insular lobe in primates including humans. *Brain Research. Brain Research Reviews*, 22(3), 229-244. doi: 10.1016/S0165-0173(96)00011-2
- Baddeley, A. (1999). *Memoria humana. Teoría y práctica*. Madrid: McGraw-Hill
- Bailey, C. H., & Kandel, E. R. (1993). Structural changes accompanying memory storage. *Annual Review of Physiology*, 55, 397-426. doi: 10.1146/annurev.ph.55.030193.002145
- Bailey, C. H., Kandel, E. R., & Harris, K. M. (2015). Structural components of synaptic plasticity and memory consolidation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(7), a021758. doi: 10.1101/cshperspect.a021758
- Balderas, I., Ramírez-Amaya, V., & Bermúdez-Rattoni, F. (2004). Cambios morfológicos asociados a la memoria. *Revista de Neurología*, 38(10), 944-948. doi: [Memory-linked morphological changes]
- Bello-Medina, P. C., Flores, G., Quirarte, G. L., & Prado-Alcalá, R. A. (2015, 6 al 10 de Septiembre, 2015). *Cambios estructurales en el estriado provocados por la consolidación y memoria de evitación inhibitoria sobrerreforzada*. Paper presented at the LVIII Congreso Nacional Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas, San Miguel de Allende, Guanajuato
- Benavides-Piccione, R., Ballesteros-Yáñez, I., DeFelipe, J., & Yuste, R. (2002). Cortical area and species differences in dendritic spine morphology. *Journal of Neurocytology*, 31(3-5), 337-346. doi: 10.1023/A:1024134312173
- Bermúdez-Rattoni, F., Introini-Collison, I. B., & McGaugh, J. L. (1991). Reversible inactivation of the insular cortex by tetrodotoxin produces retrograde and anterograde amnesia for inhibitory avoidance and spatial learning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(12), 5379-5382
- Bermúdez-Rattoni, F., & McGaugh, J. L. (1991). Insular cortex and amygdala lesions differentially affect acquisition on inhibitory avoidance and conditioned taste aversion. *Brain Research*, 549(1), 165-170. doi: 10.1016/0006-8993(91)90616-4

- Bermúdez-Rattoni, F., Okuda, S., Roozendaal, B., & McGaugh, J. L. (2005). Insular cortex is involved in consolidation of object recognition memory. *Learning & Memory*, 12(5), 447-449. doi: 10.1101/lm.97605
- Bermúdez-Rattoni, F., & Prado-Alcalá, R. A. (2001). *Memoria ¿En dónde está y cómo se forma?* México, D.F.: Trillas
- Bosch, M., & Hayashi, Y. (2012). Structural plasticity of dendritic spines. *Current Opinion in Neurobiology*, 22(3), 383-388. doi: 10.1016/j.conb.2011.09.002
- Bourne, J., & Harris, K. M. (2007). Do thin spines learn to be mushroom spines that remember? *Current Opinion in Neurobiology*, 17(3), 381-386. doi: 10.1016/j.conb.2007.04.009
- Braun, J. J., Lasiter, P. S., & Kiefer, S. W. (1982). The gustatory neocortex of the rat. *Physiological Psychology*, 10(1), 13-45. doi: 10.3758/bf03327004
- Cruz-Morales, S. E., Durán-Arévalo, 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. doi: 10.1016/0163-1047(92)90248-3
- DeFelipe, J. (2005). Santiago Ramón y Cajal y el nacimiento de la neurociencia moderna. En Secretaría General Técnica Subdirección General de Información y Publicaciones (Ed.), *Ramón y Cajal y la ciencia española* (pp. 9-32). España: Ministerio de Educación y Ciencia
- Díaz-Trujillo, A., Contreras, J., Medina, A. C., Silveyra-Leon, G. A., Antaramian, A., Quirarte, G. L., & Prado-Alcalá, R. A. (2009). Enhanced inhibitory avoidance learning prevents the long-term memory-impairing effects of cycloheximide, a protein synthesis inhibitor. *Neurobiology of Learning and Memory*, 91(3), 310-314. doi: 10.1016/j.nlm.2008.10.006
- Doubell, T. P., & Stewart, M. G. (1993). Short-term changes in the numerical density of synapses in the intermediate and medial hyperstriatum ventrale following one-trial passive avoidance training in the chick. *The Journal of Neuroscience*, 13(5), 2230-2236
- Dudai, Y. (1989). *The neurobiology of memory: Concepts, findings, trends*. New York, NY: Oxford University Press
- Dudai, Y. (2004). The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annual Review of Psychology*, 55, 51-86. doi: 10.1146/annurev.psych.55.090902.142050
- Durán-Arévalo, M., Cruz-Morales, S. E., & Prado-Alcalá, R. A. (1990). Is acetylcholine involved in memory consolidation of over-reinforced learning? *Brain Research Bulletin*, 24(6), 725-727. doi: 10.1016/0361-9230(90)90129-N
- Ferrer, A. A. (2008). *Estudio de la medición del sistema histaminérgico en el efecto producido por la amitriptilina sobre la evitación inhibitoria en ratones*. (Tesis Doctoral), Universitat de Valencia, Valencia, España
- Flores, G., Alquicer, G., Silva-Gómez, A. B., Zaldivar, G., Stewart, J., Quirion, R., & Srivastava, L. K. (2005). Alterations in dendritic morphology of prefrontal cortical and nucleus accumbens neurons in post-pubertal rats after neonatal excitotoxic lesions of the ventral hippocampus. *Neuroscience*, 133(2), 463-470. doi: 10.1016/j.neuroscience.2005.02.021
- Fornari, R. V., Wichmann, R., Atucha, E., Desprez, T., Eggens-Meijer, E., & Roozendaal, B. (2012). Involvement of the insular cortex in regulating

- glucocorticoid effects on memory consolidation of inhibitory avoidance training. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 6, 10. doi: 10.3389/fnbeh.2012.00010
- Fu, M., & Zuo, Y. (2011). Experience-dependent structural plasticity in the cortex. *Trends in Neurosciences*, 34(4), 177-187. doi: 10.1016/j.tins.2011.02.001
- Garín-Aguilar, M. E. (2014). *Efecto de la inactivación reversible del hipocampo dorsal sobre la retención de una tarea de evitación inhibitoria sobrerreforzada*. (Doctorado), Universidad Nacional Autónoma de México, Juriquilla, Qro.
- Georges, P. C., Hadzimechalis, N. M., Sweet, E. S., & Firestein, B. L. (2008). The yin-yang of dendrite morphology: Unity of actin and microtubules. *Molecular Neurobiology*, 38(3), 270-284. doi: 10.1007/s12035-008-8046-8
- 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. doi: 10.1098/rstb.2007.2096
- Guillazo, G., Redolar-Ripoll, D. A., Torras-García, M., & Vale-Martínez, A. (2007). *Fundamentos de neurociencia* (1 st ed.). España: Editorial UOC
- Gutiérrez, H., Hernández-Echeagaray, E., Ramírez-Amaya, V., & Bermúdez-Rattoni, F. (1999). Blockade of N-methyl-D-aspartate receptors in the insular cortex disrupts taste aversion and spatial memory formation. *Neuroscience*, 89(3), 751-758. doi: 10.1016/S0306-4522(98)00360-1
- Guzmán, R. K. R. (2010). *Neuroquímica de la adquisición y consolidación de la memoria gustativa de aversión en la corteza insular y amígdala*. (Doctorado), Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico
- Hanamori, T., Kunitake, T., Kato, K., & Kannan, H. (1998). Responses of neurons in the insular cortex to gustatory, visceral, and nociceptive stimuli in rats. *Journal of Neurophysiology*, 79(5), 2535-2545
- Harris, K. M., Jensen, F. E., & Tsao, B. (1992). Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: Implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation. *The Journal of Neuroscience*, 12(7), 2685-2705
- Harris, K. M., & Stevens, J. K. (1989). Dendritic spines of CA 1 pyramidal cells in the rat hippocampus: Serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics. *The Journal of Neuroscience*, 9(8), 2982-2997
- Horner, C. H. (1993). Plasticity of the dendritic spine. *Progress in Neurobiology*, 41(3), 281-321. doi: 10.1016/0301-0082(93)90002-A
- Huchín, R. T. C. (2008). *Efectos sobre la consolidación de la memoria producidos por el bloqueo de la síntesis de proteína en la corteza insular*. (Tesis de Maestría en Ciencias), Universidad Nacional Autónoma de México, Juriquilla, Qro.
- Ikeda, M., Hojo, Y., Komatsuzaki, Y., Okamoto, M., Kato, A., Takeda, T., & Kawato, S. (2015). Hippocampal spine changes across the sleep-wake cycle: Corticosterone and kinases. *The Journal of Endocrinology*, 226(2), M13-27. doi: 10.1530/joe-15-0078
- Izquierdo, I., Barros, D. M., Mello e Souza, T., de Souza, M. M., Izquierdo, L. A., & Medina, J. H. (1998). Mechanisms for memory types differ. *Nature*, 393(6686), 635-636. doi: 10.1038/31371
- 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. doi: 10.1016/0163-1047(92)90847-W
- Kandel, E. R. (2001). The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science*, 294(5544), 1030-1038. doi: 10.1126/science.1067020
- Kasai, H., Fukuda, M., Watanabe, S., Hayashi-Takagi, A., & Noguchi, J. (2010). Structural dynamics of dendritic spines in memory and cognition. *Trends in Neurosciences*, 33(3), 121-129. doi: 10.1016/j.tins.2010.01.001.
- Kosar, E., Grill, H. J., & Norgren, R. (1986). Gustatory cortex in the rat. I. Physiological properties and cytoarchitecture. *Brain Research*, 379(2), 329-341. doi: 10.1016/0006-8993(86)90787-0
- Krieg, W. J. (1946). Connections of the cerebral cortex; the albino rat; topography of the cortical areas. *The Journal of Comparative Neurology*, 84, 221-275. doi: 10.1002/cne.900840205
- Krushel, L. A., & van der Kooy, D. (1988). Visceral cortex: Integration of the mucosal senses with limbic information in the rat agranular insular cortex. *The Journal of Comparative Neurology*, 270(1), 39-54, 62-33. doi: 10.1002/cne.902700105
- Lechner, H. A., Squire, L. R., & Byrne, J. H. (1999). 100 years of consolidation - Remembering Muller and Pilzecker. *Learning & Memory*, 6(2), 77-87. doi: 10.1101/lm.6.2.77
- León-Jacinto, U. (2008). *Cambios anatómicos en el hipocampo de la rata sometida a dos pruebas de aprendizaje*. (Tesis de Maestría en Ciencias), Universidad Nacional Autónoma de México, Querétaro
- 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
- Mathiasen, M. L., Hansen, L., & Witter, M. P. (2015). Insular projections to the parahippocampal region in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 523(9), 1379-1398. doi: 10.1002/cne.23742
- McDonald, R. J., & White, N. M. (1993). A triple dissociation of memory systems: Hippocampus, amygdala, and dorsal striatum. *Behavioral Neuroscience*, 107(1), 3-22. doi: 10.1037/a0034883.
- Mesulam, M. M., & Mufson, E. J. (1982). Insula of the old world monkey. I. Architectonics in the insulo-orbito-temporal component of the paralimbic brain. *The Journal of Comparative Neurology*, 212(1), 1-22. doi: 10.1002/cne.902120102
- Milner, B., Squire, L. R., & Kandel, E. R. (1998). Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron*, 20(3), 445-468. doi: 10.1016/S0896-6273(00)80987-3
- Miranda, M. I., & Bermúdez-Rattoni, F. (2007). Cholinergic activity in the insular cortex is necessary for acquisition and consolidation of contextual memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, 87(3), 343-351. doi: 10.1016/j.nlm.2006.09.010
- Miranda, M. I., & McGaugh, J. L. (2004). Enhancement of inhibitory avoidance and conditioned taste aversion memory with insular cortex infusions of 8-Br-cAMP: Involvement of the basolateral amygdala. *Learning & Memory*, 11(3), 312-317. doi: 10.1101/lm.72804

- Moraga-Amaro, R., & Stehberg, J. (2012). The insular cortex and the amygdala: Shared functions and interactions *The amygdala - A discrete multitasking manager*. InTech
- 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
- Muñoz-Sánchez, S. (2012). *Efectos de la inhibición de la síntesis de proteínas en la corteza insular sobre la consolidación de un aprendizaje incrementado en la tarea de evitación inhibitoria*. (Tesis de Maestría en Ciencias), Universidad Nacional Autónoma de México, Juriquilla, Qro.
- Nagai, M., Kishi, K., & Kato, S. (2007). Insular cortex and neuropsychiatric disorders: A review of recent literature. *European Psychiatry*, 22(6), 387-394. doi: 10.1016/j.eurpsy.2007.02.006
- National Research Council. (2011). *Guide for the care and use of laboratory animals* (8th ed.). Washington, DC: The National Academies Press.
- O'Connell, C., O'Malley, A., & Regan, C. M. (1997). Transient, learning-induced ultrastructural change in spatially-clustered dentate granule cells of the adult rat hippocampus. *Neuroscience*, 76(1), 55-62. doi: 10.1016/S0306-4522(96)00387-9
- 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. doi: 10.1016/S0306-4522(00)00182-2
- 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. doi: 10.1016/S0306-4522(98)00178-X
- Ogawa, H., Hasegawa, K., & Murayama, N. (1992). Difference in taste quality coding between two cortical taste areas, granular and dysgranular insular areas, in rats. *Experimental Brain Research*, 91(3), 415-424. doi: 10.1007/BF00227838
- Paxinos, G. (1996). *The rat nervous system* (4th ed.). San Diego: Elsevier Academic Press.
- Paxinos, G., & Watson, C. (2005). *The rat brain in stereotaxic coordinates* (4th ed.). San Diego: Academic Press.
- 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., Díaz del Guante, M. A., Garín-Aguilar, M. E., Díaz-Trujillo, A., Martínez-García, M. I., & Quirarte, G. L. (2007). Reorganización cerebral inducida por la experiencia incrementada de aprendizaje en investigación en neurociencias. En R. de Celis (Ed.), *Homenaje al Dr. Alfredo Feria Velasco* (pp. 221-224). Guadalajara: Bios-Médica Editores y Diseño, S.A. de C.V.
- Prado-Alcalá, R. A., Díaz del Guante, M. A., Garín-Aguilar, M. E., Díaz-Trujillo, A., & Quirarte, G. L. (2006). La reconsolidación de la memoria: Un concepto desafortunado. En L. A. Oblitas (Ed.), *Atlas de psicología de la salud*. México: Psicom editores.

- Prado-Alcalá, R. A., Medina, A. C., Serafin, N., & Quirarte, G. L. (2012). Intense emotional experiences and enhanced training prevent memory loss induced by post-training amnesic treatments administered to the striatum, amygdala, hippocampus or substantia nigra. *Reviews in the Neurosciences*, 23(5-6), 501-508. doi: 10.1515/revneuro-2012-0061
- Prado-Alcalá, R. A., & Quirarte, G. L. (1998). De la memoria y el cerebro. En R. De la Fuente & J. Alvarez-Leefmans (Eds.), *Biología de la mente* (pp. 245-256). México: El colegio Nacional y Fondo de Cultura Económica.
- Prado-Alcalá, R. A., & Quirarte, G. L. (2007). La consolidación de la memoria, un siglo después. *Revista de Neurología*, 45(5), 284-292
- Rains, D. (2002). *Principios de neuropsicología humana*: McGraw-Hill Interamericana.
- Repetto, D., Camera, P., Melani, R., Morello, N., Russo, I., Calcagno, E., . . . Defilippi, P. (2014). p140Cap regulates memory and synaptic plasticity through Src-mediated and citron-N-mediated actin reorganization. *The Journal of Neuroscience*, 34(4), 1542-1553. doi: 10.1523/jneurosci.2341-13.2014
- Rescorla, R. A. (2007). Learning: A pre-theoretical concept. En H. L. Roediger, Y. Dudai & S. M. Fitzpatrick (Eds.), *Science of memory: Concepts* (pp. 37-40). New York: Oxford University Press.
- Reynolds, G. S. (1973). *Compendio de conocimiento operante*. México: Editorial Ciencia de la Conducta.
- Salado-Castillo, R., Sánchez-Alavéz, M., Quirarte, G. L., Martínez García, M. I., & Prado-Alcalá, R. A. (2011). Enhanced training protects memory against amnesia produced by concurrent inactivation of amygdala and striatum, amygdala and substantia nigra, or striatum and substantia nigra. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 5, 83. doi: 10.3389/fnbeh.2011.00083
- Schacter, D. L., & Wagner, A. D. (2013). Learning and Memory. En E. Kandel, J. Schwartz, T. M. Jessell, S. A. Siegelbaum & A. J. Hudspeth (Eds.), *Principles of Neural Science* (5th ed., pp. 1441-1460): McGraw-Hill Education
- Shi, C. J., & Cassell, M. D. (1998). Cascade projections from somatosensory cortex to the rat basolateral amygdala via the parietal insular cortex. *The Journal of Comparative Neurology*, 399(4), 469-491. doi: 10.1002/(SICI)1096-9861(19981005)399:4<469::AID-CNE3>3.0.CO;2-#
- Squire, L. R., & Zola-Morgan, S. (1988). Memory: Brain systems and behavior. *Trends in Neurosciences*, 11(4), 170-175. doi: 10.1016/0166-2236(88)90144-0
- Stephani, C., Fernandez-Baca Vaca, G., Maciunas, R., Koubeissi, M., & Luders, H. O. (2011). Functional neuroanatomy of the insular lobe. *Brain Structure & Function*, 216(2), 137-149. doi: 10.1007/s00429-010-0296-3
- Stewart, M. G., & Rusakov, D. A. (1995). Morphological changes associated with stages of memory formation in the chick following passive avoidance training. *Behavioural Brain Research*, 66(1-2), 21-28. doi: 10.1016/0166-4328(94)00119-Z
- Sweatt, J. D. (2010). *Mechanisms of memory* (2 ed.). San Diego: Academic Press.
- Treede, R.-D., Kenshalo, D. R., Gracely, R. H., & Jones, A. K. P. (1999). The cortical representation of pain. *PAIN*, 79(2-3), 105-111. doi: 10.1016/S0304-3959(98)00184-5
- Ture, U., Yasargil, D. C., Al-Mefty, O., & Yasargil, M. G. (1999). Topographic anatomy of the insular region. *Journal of Neurosurgery*, 90(4), 720-733. doi: 10.3171/jns.1999.90.4.0720

- Varela Ruiz, M., Ávila Costa, M. R., & Fortoul Van der Goes, T. I. (2005). *La memoria: Definición, función y juego para la enseñanza de la medicina* (1st ed.). México: Editorial Médica Panamericana
- Yasui, Y., Breder, C. D., Saper, C. B., & Cechetto, D. F. (1991). Autonomic responses and efferent pathways from the insular cortex in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 303(3), 355-374. doi: 10.1002/cne.903030303
- Yuste, R. (2010). *Dendritic spines*. Cambridge, MA: The MIT Press.
- Zhuravin, I. A., & Bures, J. (1991). Extent of the tetrodotoxin induced blockade examined by pupillary paralysis elicited by intracerebral injection of the drug. *Experimental Brain Research*, 83, 687-690. doi: 10.1007/BF00229849

12. ANEXOS

Anexo1. Solución de Golgi-Cox (Robbin Gibbs and Bryan Kolb, University of Lethbridge, Alberta)

Solución A

37.5 g de $K_2Cr_2O_7$

750 mL de dH_2O caliente

Revolver y calentar la solución

Solución B

37.5 g $HgCl_2$

750 mL dH_2O caliente

Revolver y calentar casi hasta ebullición

Solución C

30 g de K_2CrO_4

600 mL de dH_2O fría

1° Mezclar las tres soluciones junto con 1500 mL de dH_2O .

2 ° Almacenar en un frasco ámbar por 5 días en completa oscuridad.

3 ° Filtrar y usar.