



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

CAMBIOS ESTRUCTURALES EN LAS NEURONAS DE PROYECCIÓN DEL ESTRIADO
RELACIONADOS CON LA CONSOLIDACIÓN Y EVOCACIÓN DE LA MEMORIA DE UN
ENTRENAMIENTO INCREMENTADO

T E S I S

QUE PARA OPTAR EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. PAOLA CRISTINA BELLO MEDINA

TUTOR

DR. ROBERTO AGUSTÍN PRADO ALCALÁ
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

COMITÉ TUTOR

DRA. MARTHA LILIA ESCOBAR RODRÍGUEZ
FACULTAD DE PSICOLOGÍA
DR. JORGE LARRIVA SAHD
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

JURIQUILLA, QUERETARO
NOVIEMBRE DE 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.

Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de Neurobiología

Los miembros del Jurado certificamos que la tesis elaborada por: Paola Cristina Bello Medina, cuyo título es: “Cambios estructurales en las neuronas de proyección del estriado relacionados con la consolidación y evocación de la memoria de un entrenamiento incrementado” se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Doctora en Ciencias y cumple los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Dra. Sofía Yolanda Díaz Miranda
Presidente

Dr. Roberto Agustín Prado Alcalá
Secretario

Dra. Selva Rivas Arancibia
Vocal

Dr. José Fernando Peña Ortega
Vocal

Dr. Gabriel Roldán Roldán
Vocal

Aprobado por el Comité Académico

RESUMEN

Existe evidencia que indica que los tratamientos farmacológicos que normalmente afectan la consolidación de la memoria llegan a ser inefectivos cuando los animales son sometidos a un entrenamiento incrementado. Este efecto ha sido observado con la administración de varios tratamientos farmacológicos que interfieren con la actividad neuronal de algunas estructuras cerebrales como el hipocampo, la amígdala, la corteza insular, la corteza prefrontal y el estriado dorsal. Los mecanismos que pudieran estar implicados en este fenómeno son desconocidos. Se puede plantear la hipótesis que el entrenamiento incrementado promueve la transferencia de información a una red neuronal más amplia. Los resultados de esta tesis demostraron que, en ratas, la tarea de evitación inhibitoria (EI) induce espinogénesis de tipo hongo en las neuronas medianas espinosas (MSNs, por sus siglas en inglés) del estriado dorsal, este aumento es dependiente de la intensidad del entrenamiento. También se encontró que la proporción de las espinas tipo larga disminuyó. Estos cambios fueron evidentes 6 h después del entrenamiento y persistieron al menos durante 24 h. Cabe resaltar que el choque eléctrico por sí solo no indujo espinogénesis. La densidad de espinas en las MSNs en el núcleo accumbens también aumentó, pero este incremento no fue de acuerdo con la intensidad del proceso asociativo involucrado en la tarea de EI, sino que simplemente se produjo en respuesta a la administración del estímulo aversivo. Estos hallazgos sugieren que las espinas tipo hongo de las MSNs del estriado dorsal reciben información que está involucrada en la actividad integrativa necesaria para la consolidación de la memoria, y que el entrenamiento incrementado facilita la transferencia de información del estriado dorsal a otras regiones cerebrales. Una dinámica similar en la formación de espinas dendríticas fue observada 6 horas después de la evocación de la memoria, es decir, incremento en la densidad de espinas, en general, y en las espinas tipo hongo, en particular, en la región dorsal del estriado asociada a la recuperación de la memoria consolidada, mientras que en el núcleo accumbens, este aumento en la densidad y en las espinas tipo hongo se produjo por la aplicación del estímulo aversivo. Esto implica, que el proceso de evocación es una etapa de la memoria dinámica en la que estos cambios estructurales en las MSNs podrían estar ocurriendo, facilitando así la salida de la información a otras regiones cerebrales.

ABSTRACT

A growing body of evidence indicates that treatments that typically impair memory consolidation become ineffective when animals are given intense training. This effect has been obtained by treatments interfering with the neural activity of several brain structures, including the dorsal striatum. The mechanisms that mediate this phenomenon are unknown. One possibility is that intense training promotes the transfer of information derived from the enhanced training to a wider neuronal network. We now report that, in rats, inhibitory avoidance (IA) induces mushroom spinogenesis in the medium spiny neurons (MSNs) of dorsal striatum, which is dependent upon the intensity of the foot-shock used for training. That is, the effect is seen only when high intensity foot-shock is used in training. We also found that the relative density of thin spines was reduced. These changes were evident at 6 h after training, and persisted for at least 24 h afterwards. Importantly, foot-shock alone did not increase spinogenesis. Spine density in MSNs in the accumbens was also increased, but the increase did not correlate with the associative process involved in IA; rather, it resulted from the administration of the aversive stimulation alone. These findings suggest that mushroom spines of MSNs of the dorsal striatum receive afferent information which is involved in the integrative activity necessary for memory consolidation, and that intense training facilitates transfer of information from dorsal striatum to other brain regions through augmented spinogenesis. On the other hand, we investigated if there are changes in the density and shape of dendritic spines in MSN in dorsal and nucleus accumbens produced during retrieval of IA that had been trained with moderate and strong foot-shocks. The results showed that in dorsal striatum there was an increase in the density and in mushroom spine ratio, which were proportional to the intensity of training. However, in the ventral striatum there was an increase in the density and in mushroom spine ratio associated with the non-contingent administration of the foot-shocks. These results are probably due to the dorsal striatum is processing contextual and procedural information from the cortex and hippocampus, whereas the ventral striatum seems to process information derived from the aversive stimulation. These results probably reflect processing, during retrieval, of contextual and procedural information of moderate and intense IA training in dorsomedial and dorsolateral striatum, whereas the ventral striatum seems to process information derived from the aversive stimulation.

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** y al **Instituto de Neurobiología**, en especial a mi tutor, el **Dr. Roberto Agustín Prado Alcalá** por darme la oportunidad de continuar y finalizar mis estudios de Doctorado en su laboratorio en un momento muy complicado. Aprendí mucho bajo su asesoría... ¡Muchas gracias!

A la **Dra. Gina Lorena Quirarte**, por TODO el apoyo que recibí de su parte en el inicio de esta etapa que al comienzo se tornaba un poco complicada, sin embargo, fue muy formativa. De una forma muy especial le agradezco su acertada colaboración académica y por hacerme sentir parte de su equipo de trabajo.

Mi comité tutor, formado por la **Dra. Martha Escobar Rodríguez**, el **Dr. Jorge Larriva Sahd**, por sus valiosos aportes y por la orientación en el desarrollo de este proyecto de investigación.

Al comité sinodal, formado por la **Dra. Sofía Díaz Miranda**, la **Dra. Selva Rivas Arancibia**, el **Dr. Fernando Peña Ortega** y el **Dr. Gabriel Roldán Roldán**, por todas las observaciones y sugerencias que fueron aportadas para enriquecer la escritura de esta tesis.

Al **Dr. Gonzalo Flores** y a su técnico académico **Rubén Vásquez**, por la colaboración académica que se logró establecer, pero sobre todo por compartir su espacio de trabajo conmigo en la realización de la técnica de tinción Golgi-Cox.

A la **Dra. Andrea Cristina Medina Fragoso** y a la **M.V.Z Norma Serafín López** por el apoyo técnico que fue vital para el desarrollo de este proyecto de investigación. Cris, gracias por los ánimos, la solidaridad y las críticas constructivas. *Normita*, gracias por las revisiones, opiniones y críticas constructivas que enriquecen mi formación académica y personal... Sin olvidarme de agradecer por los aventones que facilitaron algunos de mis días. También Extiendo un agradecimiento muy especial al **Sr. Ángel Méndez** y a la **Sra. Bertha Islas** por todas la colaboración con el manejo de las ratas que fueron indispensables para el desarrollo de esta tesis.

Al **Doctorado en Ciencias Biomédicas**, en especial a la **Dra. Aurea Orozco** por toda la paciencia en este proceso que en algún momento llegó a hacerse muy caótico.

A las entidades que contribuyeron con financiación:

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**, por auspiciar el proyecto de investigación N° 237570, así como por haberme concedido la beca de Doctorado N°: 234103.

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

A la **Unidad de Enseñanza y Posgrado**, en especial a **Leonor Casanova Rico** por toda la colaboración y apoyo otorgado a la hora de resolver dudas e inquietudes con respecto al posgrado. Leo, gracias por tu orientación.

A las unidades de apoyo del Instituto de Neurobiología:

A la **Unidad de Microscopía**, en especial a la Ing. **Elsa Nydia Hernández Ríos**, por el préstamo del microscopio de luz transmitida y por hacer de la unidad mi segundo hogar durante el análisis de las muestras. Pero, sobre todo, por escucharme y compartir mi sufrimiento cuando dejaba de funcionar ese microscopio.

A todo el personal de la **Biblioteca** del campus Juriquilla. *Dr. Francisco Javier Valles Valenzuela.*

El personal de **Bioterio**. *M.V.Z. José Martín García Servín y a la Dra. Alejandra Castilla León*

A la **Unidad de Videoconferencia**. *María de Lourdes Lara Ayala y Sandra Hernández García.*

A mi familia, amigos y compañeros

A mis padres Héctor y Gladys, a mis hermanos Giovanni, Stivell y Alexander, a mis tíos Martín † , Yoany, Adriana, Ruth, Nena, Chavela, a mi abuelita Soledad (y demás familiares que en este momento seguramente no llegan a mi mente sus nombres), porque son el motor de mi vida y me impulsan a superarme cada día más. Por enseñarme a ser disciplinada, perseverante y proactiva... GRACIAS.

A mi esposo Alexander por toda la paciencia, por el tiempo que no le brindé por estar trabajando intensamente, por las críticas constructivas tan sinceras, por el gran amor que me tiene y porque siempre estuvo dispuesto a dejar de hablar de la neurogénesis hipocampal en el adulto para empezar a discutir sobre la espinogénesis en el estriado. ¡GRACIAS TOTALES!

A mis amigos Colombianos residentes en Colombia y en México y a mis amigos Mexicanos que me han alegrado más de un día y han logrado que me distraiga de vez en cuando de la ciencia.

Un agradecimiento muy especial para todas esas personas que conocí en los primeros tres años de mi Doctorado en el laboratorio de Redes Neuronales Plásticas, muchas gracias Dr. Víctor Ramírez, Carlos Lozano, Cutberto Dorado, Rafael Olivares, Teresita Arredondo, Dámaris Rangel, Edgar Morales, Iván Gallegos, Giovanna Velásquez, Katia Anaya, Joel Ricci, Alejandro, Mariana. Aprendí muchas cosas de ustedes, tanto lo que se debe como lo que no se debe hacer tanto en el ámbito académico como profesional... De una u otra forma enriquecieron el desarrollo de mi ámbito personal.

A mis amigos y compañeros del Laboratorio de Aprendizaje y Memoria que en algún momento han estado: Jorge, Yavé, Karla, Yec, Ara, Gema, Fany, Odalis, Lalo, Pen, Viry, Alhelí, Robbi, Anaí, Raúl; a todos los que aún están: Sofía, Cristina, Evelina, Clyo, Renata, Rogelio, Daniela, América, Marisol, Iván, Erika, Antonio, Jazmín y de una forma muy especial a Rafael y Martha; todos ellos me han aportado un granito de arena en el entendimiento de la

dinámica de un laboratorio con tantos integrantes, las cosas divertidas, aquellas que no tanto, pero sobre todo gracias por las críticas constructivas y los comentarios dados a lo largo de toda mi formación académica.

Por último (no porque sean menos importantes) agradezco a todas las personas que conocí en el Instituto de Neurobiología y CFATA: Laura, Erika, Jesús, Isaac, Isra, Azu, Elena, Ernesto, Karla, Lupita, Ale, con los que compartí excelentes momentos durante estos últimos 5 años. ¡Gracias por tantas risas!

DEDICATORIA

A mis padres Héctor y Gladys, por el apoyo infundido y por toda la educación que me han dado con tanto cariño.

A mis hermanos Giovanni, Stivell y Alexander, para que puedan seguir adelante con grandes metas trazadas y que el ejemplo que ahora les estoy dando sea superado por sus logros personales, académicos y profesionales.

A mi colega, compañero, amigo y esposo, a Diego Alexander, por todo el apoyo, la fortaleza y todo el cariño que me ha dado en este largo camino recorrido.

“En la vida no hay cosas que temer, sólo hay cosas que comprender”

Marie Salomea Curie

ABREVIATURAS

EI: Evitación inhibitoria

MSN: Neurona mediana espinosa

EDM: Estriado dorsomedial

EDL: Estriado dorsolateral

NAc: Núcleo accumbens

NAcC: Núcleo accumbens core

NAcS: Núcleo accumbens shell

MAPK: Proteína quinasa activada por mitógenos

PKC: Proteína quinasa C

PKA: Proteína quinasa A

MCP: Memoria de corto plazo

MLP: Memoria de largo plazo

PSD: Densidad post-sináptica

MAP2: Proteína asociada a microtúbulos

CaMKII: Proteína quinasa Ca^{+2} /calmodulina II

GR: Receptor a glucocorticoides

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	II
ABSTRACT.....	III
AGRADECIMIENTOS.....	IIIIV
DEDICATORIA	III
ABREVIATURAS	IIIIX
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	4
1. Aprendizaje y memoria.....	4
2. Plasticidad sináptica	8
2.1 Espinas dendríticas	8
3. Estriado dorsal.....	16
3.1 Participación del estriado dorsal en el aprendizaje y la memoria	19
4. Estriado ventral: núcleo accumbens.....	22
4.1 Participación del núcleo accumbens en el aprendizaje y la memoria.....	24
5. El entrenamiento incrementado produce un efecto protector de la memoria	25
III. HIPÓTESIS GENERALES.....	28
IV. OBJETIVO GENERAL.....	29
V. MATERIAL Y MÉTODO GENERAL	29
1. ANIMALES	29
2. TAREA DE EVITACIÓN INHIBITORIA.....	30
2.1 Aparato.....	30
2.2 Entrenamiento	31
2.3 Prueba de retención	31
2.4 Extinción.....	31

3. ANÁLISIS HISTOLÓGICO.....	32
3.1 Obtención de tejidos cerebrales	32
3.2 Tinción de Golgi-Cox.....	32
4. ANÁLISIS MORFOMÉTRICO.....	33
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	35
5.1 Conducta.....	35
5.2 Histología	35
VI. EXPERIMENTO 1: Cambios estructurales producidos durante la consolidación de la memoria y la memoria de largo plazo de la tarea de evitación inhibitoria moderada o sobrerreforzada, en el estriado dorsal y núcleo accumbens.....	36
1. Hipótesis.....	36
2. Objetivos.....	37
3. Método y diseño experimental.....	37
4. Resultados.....	40
4.1 Conducta.....	40
4.2 Densidad total de espinas dendríticas de las MSNs del estriado dorsal y núcleo accumbens.....	43
4.2.1 Estriado dorsolateral	43
4.2.2 Estriado dorsomedial	44
4.2.3 Núcleo accumbens core.....	46
4.2.4 Núcleo accumbens shell	46
4.3 Morfología de las espinas dendríticas de las MSNs del estriado dorsal y núcleo accumbens.....	47
4.3.1 Estriado dorsolateral	47
4.3.1.1 Espinas dendríticas tipo larga en el estriado dorsolateral.....	47
4.3.1.2 Espinas dendríticas tipo hongo en el estriado dorsolateral.....	48
4.3.1.3 Espinas dendríticas tipo corta en el estriado dorsolateral.....	48

4.3.1.4 Espinas dendríticas tipo bifurcada en el estriado dorsolateral	50
4.3.1.5 Espinas dendríticas tipo multi-cabeza en el estriado dorsolateral	50
4.3.1.6 Espinas dendríticas no clasificadas en el estriado dorsolateral	51
4.3.2 Estriado dorsomedial	51
4.3.2.1 Espinas dendríticas tipo larga en el estriado dorsomedial	51
4.3.2.2 Espinas dendríticas tipo hongo en el estriado dorsomedial	52
4.3.2.3 Espinas dendríticas tipo corta en el estriado dorsomedial	53
4.3.2.4 Espinas dendríticas tipo bifurcada en el estriado dorsomedial	53
4.3.2.5 Espinas dendríticas tipo multi-cabeza en el estriado dorsomedial.....	55
4.3.2.6 Espinas dendríticas no clasificadas en el estriado dorsomedial	55
4.3.3 Núcleo accumbens core.....	56
4.3.3.1 Espinas dendríticas tipo larga en el núcleo accumbens core	56
4.3.3.2 Espinas dendríticas tipo hongo en el núcleo accumbens core	56
4.3.3.3 Espinas dendríticas tipo corta en el núcleo accumbens core	57
4.3.3.4 Espinas dendríticas tipo bifurcada en el núcleo accumbens core.....	59
4.3.3.5 Espinas dendríticas tipo multi-cabeza en el núcleo accumbens core	59
4.3.3.6 Espinas dendríticas no clasificadas en el núcleo accumbens core.....	60
4.3.4 Núcleo accumbens shell.....	60
4.3.4.1 Espinas dendríticas tipo larga en el núcleo accumbens shell	60
4.3.4.2 Espinas dendríticas tipo hongo en el núcleo accumbens shell	61
4.3.4.3 Espinas dendríticas tipo corta en el núcleo accumbens shell	62
4.3.4.4 Espinas dendríticas tipo bifurcada en el núcleo accumbens shell	62
4.3.4.5 Espinas dendríticas tipo multi-cabeza en el núcleo accumbens shell.....	64
4.3.4.6 Espinas dendríticas no clasificadas en el núcleo accumbens shell	64
4.4 Resumen de los resultados del experimento 1.....	65

5. Discusión	66
VII. EXPERIMENTO 2: Cambios estructurales producidos durante la evocación de la memoria de evitación inhibitoria moderada o sobrerreforzada, en el estriado dorsal y núcleo accumbens	74
1. Hipótesis	74
2. Objetivos	74
3. Método y diseño experimental	75
4. Resultados	77
4.1 Conducta	77
4.2 Densidad total de espinas dendríticas de las MSNs del estriado dorsal y núcleo accumbens	78
4.2.1 Estriado dorsolateral	78
4.2.2 Estriado dorsomedial	78
4.2.3 Núcleo accumbens core	79
4.2.4 Núcleo accumbens shell	79
4.3 Morfología de las espinas dendríticas de las MSN del estriado dorsal y núcleo accumbens	81
4.3.1 Estriado dorsolateral	81
4.3.1.1 Espinas dendríticas tipo larga en el estriado dorsolateral	81
4.3.1.2 Espinas dendríticas tipo hongo en el estriado dorsolateral	81
4.1.3.3 Espinas dendríticas tipo corta en el estriado dorsolateral	83
4.1.3.4 Espinas dendríticas tipo bifurcada en el estriado dorsolateral	83
4.1.3.5 Espinas dendríticas tipo multi-cabeza en el estriado dorsolateral	83
4.1.3.6 Espinas dendríticas no clasificadas en el estriado dorsolateral	84
4.1.4 Estriado dorsomedial	84
4.1.4.1 Espinas dendríticas tipo larga en el estriado dorsomedial	84
4.1.4.2 Espinas dendríticas tipo corta en el estriado dorsomedial	84

4.1.4.3 Espinas dendríticas tipo bifurcada en el estriado dorsomedial	86
4.1.4.4 Espinas dendríticas tipo multi-cabeza en el estriado dorsomedial.....	86
4.1.4.5 Espinas dendríticas no clasificadas en el estriado dorsomedial	86
4.1.5 Núcleo accumbens core.....	87
4.1.5.1 Espinas dendríticas tipo larga en el núcleo accumbens core	87
4.1.5.2 Espinas dendríticas tipo hongo en el núcleo accumbens core	87
4.1.5.3 Espinas dendríticas tipo corta en el núcleo accumbens core	89
4.1.5.4 Espinas dendríticas tipo bifurcada en el núcleo accumbens core.....	89
4.1.5.5 Espinas dendríticas tipo multi-cabeza en el núcleo accumbens core	89
4.1.5.6 Espinas dendríticas no clasificadas en el núcleo accumbens core.....	90
4.1.6 Núcleo accumbens shell	90
4.1.6.1 Espinas dendríticas tipo larga en el núcleo accumbens shell	90
4.1.6.2 Espinas dendríticas tipo hongo en el núcleo accumbens shell	90
4.1.6.3 Espinas dendríticas tipo corta en el núcleo accumbens shell	91
4.1.6.4 Espinas dendríticas tipo bifurcada en el núcleo accumbens shell	91
4.1.6.5 Espinas dendríticas tipo multi-cabeza en el núcleo accumbens shell.....	93
4.1.6.6 Espinas dendríticas no clasificadas en el núcleo accumbens shell	93
4.3 Resumen de los resultados del experimento 2.....	94
5. Discusión	95
VIII. CONCLUSIONES.....	98
IX. PERSPECTIVAS	99
X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	100
XI. ÍNDICE DE FIGURAS	119
XII. ÍNDICE DE TABLAS.....	121
XIII. APENDICE 1: Artículo publicado derivado de esta tesis	122

I. INTRODUCCIÓN

Existe gran cantidad de evidencias que indican que los tratamientos que comúnmente producen amnesia llegan a ser inefectivos cuando los animales son sometidos a un entrenamiento incrementado, es decir, a un mayor número de sesiones de entrenamiento o niveles relativamente altos de estimulación aversiva (Prado-Alcalá et al., 2012). Se ha demostrado que el estriado dorsal está involucrado en la adquisición, consolidación y evocación de la memoria de varias experiencias de aprendizaje (Divac & Öberg, 1979; Packard & Knowlton, 2002; Prado, 1995; White, 2009). La interferencia con la actividad colinérgica del estriado dorsal, así como la inactivación reversible de esta estructura cerebral inducida después del entrenamiento moderado deteriora la formación de la memoria. Sin embargo, estos tratamientos son inefectivos cuando los animales son sometidos a un entrenamiento incrementado (Giordano & Prado-Alcalá, 1986; Pérez-Ruiz & Prado-Alcalá, 1989; Prado-Alcalá & Cobos-Zapíaín, 1977, 1979; Salado-Castillo et al., 2011). Este efecto protector contra la amnesia ha sido reportado en varias tareas conductuales (Prado-Alcalá, Medina, Serafin López, & Quirarte, 2012). Estos resultados sugieren que el entrenamiento intenso puede producir cambios estructurales y funcionales en el estriado dorsal, los cuales pueden evitar el deterioro en la formación de la memoria. A lo largo de esta tesis emplearemos indistintamente las denominaciones “entrenamiento intenso”, “entrenamiento incrementado” y “sobrerreforzamiento” para referirnos al tipo de aprendizaje que protege a la memoria contra tratamientos amnésicos, ya que así han sido utilizados en la literatura en este campo.

El estriado dorsal es homogéneo histológicamente; sin embargo, se ha observado una diferenciación funcional a lo largo del eje medial-lateral relacionado con la consolidación de la memoria (Salado-Castillo, Díaz del Guante, Alvarado, Quirarte, & Prado-Alcalá, 1996). El estriado dorsomedial (EDM) está predominantemente involucrado en el aprendizaje espacial-contextual y en las conductas dirigidas a una meta (Lozano, Serafín, Prado-Alcalá, Roozendaal, & Quirarte, 2013; White & McDonald, 2002). Por otro lado, el estriado dorsolateral (EDL) participa en la formación de la memoria de procedimiento (Devan & White, 1999; Packard & Knowlton, 2002).

Experimentos previos sugieren que la consolidación de la memoria puede producir cambios en la densidad y morfología de las espinas dendríticas en el hipocampo, la amígdala y la corteza cerebral (Aceti, Vetere, Novembre, Restivo, & Ammassari-Teule, 2015; Eyre, Richter-Levin, Avital, & Stewart, 2003; Heinrichs et al., 2013; Leuner, Falduo, & Shors, 2003; Moser, Trommald, & Andersen, 1994; O'Malley, O'Connell, Murphy, & Regan, 2000; O'Malley, O'Connell, & Regan, 1998; Restivo, Vetere, Bontempi, & Ammassari-Teule, 2009). Con respecto a la espinogénesis estriatal, se ha reportado que en las ratas expuestas a un ambiente enriquecido se produce un aumento en la densidad total de espinas dendríticas en las MSNs, lo cual es una muestra de las modificaciones neuronales dependientes de la experiencia en esta región (Comery, Shah, & Greenough, 1995a; Comery, Stamoudis, Irwin, & Greenough, 1996).

La tarea de evitación inhibitoria es una tarea estresante. Los eventos estresantes inducen la liberación de corticosterona, la cual puede facilitar la consolidación de la memoria de una variedad de tareas conductuales. Por ejemplo, se ha observado que la liberación de la corticosterona se correlaciona positivamente con la intensidad del aprendizaje (Cordero, Merino, & Sandi, 1998; Luine, Martinez, Villegas, Magarinos, & McEwen, 1996; McGaugh, Cahill, & Roozendaal, 1996; Oitzl & Kloet, 1992; Sandi, Loscertales, & Guaza, 1997; Shors, Weiss, & Thompson, 1992). La activación de los receptores a glucocorticoides en el estriado dorsal, la amígdala, el hipocampo y la corteza insular facilitan la consolidación de la memoria de la tarea de evitación inhibitoria (Cottrell & Nakajima, 1977; Fornari et al., 2012).

Aún no existen reportes acerca de los mecanismos que subyacen la espinogénesis en el estriado, experimentos relacionados muestran que la administración de corticosterona en rebanadas de hipocampo dorsal, induce un aumento en la densidad de espinas en las primeras cuatro horas después del tratamiento, este fenómeno es dependiente de la dosis de corticosterona. Este efecto no se observó después del bloqueo de los receptores NMDA o de las quinasas PI3K, MAPK, PKC, PKA (Komatsuzaki et al., 2012). De manera similar, la administración de dexametasona, un agonista específico de los receptores a glucocorticoides, también produjo un aumento en las espinas tipo larga y hongo. Este efecto fue bloqueado por el RU-38486, un antagonista del receptor a glucocorticoides (Komatsuzaki et al., 2005). Por lo tanto, estos efectos rápidos en la génesis de las espinas tipo hongo indican que la espinogénesis fue inducida por la vía no genómica, a través de los receptores

a glucocorticoides localizados en la membrana y de la activación de las diferentes vías de señalización de las quinasas (Joëls, Sarabdjitsingh, & Karst, 2012; Pasricha, Joëls, & Karst, 2011; Tasker, 2011).

Teniendo en cuenta lo anterior, planteamos la hipótesis de que tanto en el EDM como en el EDL, el entrenamiento incrementado podría inducir un aumento en la formación de espinas tipo hongo, las cuales son consideradas el sustrato de la memoria a largo plazo debido a su longevidad y a sus características morfológicas y funcionales (Ashby, Maier, Nishimune, & Henley, 2006; Bourne & Harris, 2007; Matsuzaki et al., 2001). De esta forma, estos cambios estructurales en las MSNs podrían representar las bases neurofisiológicas del efecto protector del entrenamiento incrementado contra los tratamientos amnésicos que son administrados en el estriado dorsal (Giordano & Prado-Alcalá, 1986; Pérez-Ruiz & Prado-Alcalá, 1989; Salado-Castillo, 2011). Este aumento en las espinas tipo hongo podría constituir un mecanismo para almacenar o retransmitir información derivada de la experiencia de aprendizaje incrementado; en contraste, el nivel de entrenamiento bajo o moderado podría inducir un aumento limitado de este tipo de espinas dendríticas, lo cual no sería suficiente para superar el efecto amnésico inducido con tratamientos farmacológicos en el estriado dorsal. Una vez que la actividad normal es recuperada, el aumento en la densidad de espinas tipo hongo podría mantener la consolidación de esta memoria fortalecida. A su vez, cuando los animales son sometidos a la prueba de retención, la entrada de información al estriado dorsal podría activar fácilmente a las MSNs y de esta forma facilitar la salida de información a otras regiones cerebrales.

II. ANTECEDENTES

1. Aprendizaje y memoria

Diferentes capacidades y habilidades determinan la posibilidad de los animales para adaptarse al medio ambiente y garantizar su supervivencia y la de su especie. Esto depende de la información que es procesada mnemónicamente proveniente de las interacciones con el medio ambiente. El aprendizaje y la memoria son procesos cognitivos que ocurren en el sistema nervioso central de todos los animales.

Las diversas definiciones de *aprendizaje* coinciden en que este proceso es un cambio relativamente permanente en la conducta de un sujeto, que resulta de la experiencia. Al limitar el aprendizaje a cambios relativamente permanentes, se excluyen modificaciones de la conducta debidas a factores de motivación, a la adaptación sensorial, a la fatiga y enfermedades. Al señalar que la práctica, el entrenamiento o la experiencia son las condiciones esenciales del aprendizaje, se excluyen cambios de la conducta que son resultado de la maduración, la senectud o de variables fisiológicas (Bower & Hilgard, 1989).

La *memoria* ha sido propuesta como el almacén de la información adquirida, la cual se puede recuperar a lo largo del tiempo (Kandel, 2001). Existen diferentes clasificaciones de los tipos de memoria en función de características particulares.

Se ha descrito una clasificación de la memoria según el tipo de información que se esté procesando y almacenando. En esta clasificación la memoria puede ser declarativa (explícita), dependiente primordialmente hipocampo; o puede ser no declarativa (implícita), la cual es dependiente de una variedad de estructuras entre las cuales se encuentra el estriado; tal es el caso de conductas de procedimiento, como hábitos o destrezas motoras. El hipocampo, la amígdala, el cerebelo están involucrados en el condicionamiento clásico e instrumental, y la neocorteza en el priming (Squire, 1992) (Fig. 1).

Otra de las clasificaciones que ha sido ampliamente estudiada por los cambios funcionales y estructurales que implica, es aquella que hace énfasis en el periodo en el cual la información puede ser recuperada por el organismo. Este es el caso de la memoria de corto plazo (MCP) y la memoria de largo plazo (MLP) (Díaz del Guante, Rivas, Prado-Alcalá, & Quirarte, 2004; McGaugh, Cahill, Ferry, & Roozendaal, 2000). La MCP, como su nombre lo dice, es una memoria que tiene muy corta duración, es decir, se puede recuperar en una ventana temporal que va de segundos a minutos siendo muy frágil y fácilmente modificable (Eichenbaum, 2003). La MLP involucra información que se mantiene almacenada durante días, meses, años e incluso toda la vida, siendo una memoria relativamente permanente (Dudai, 2004).

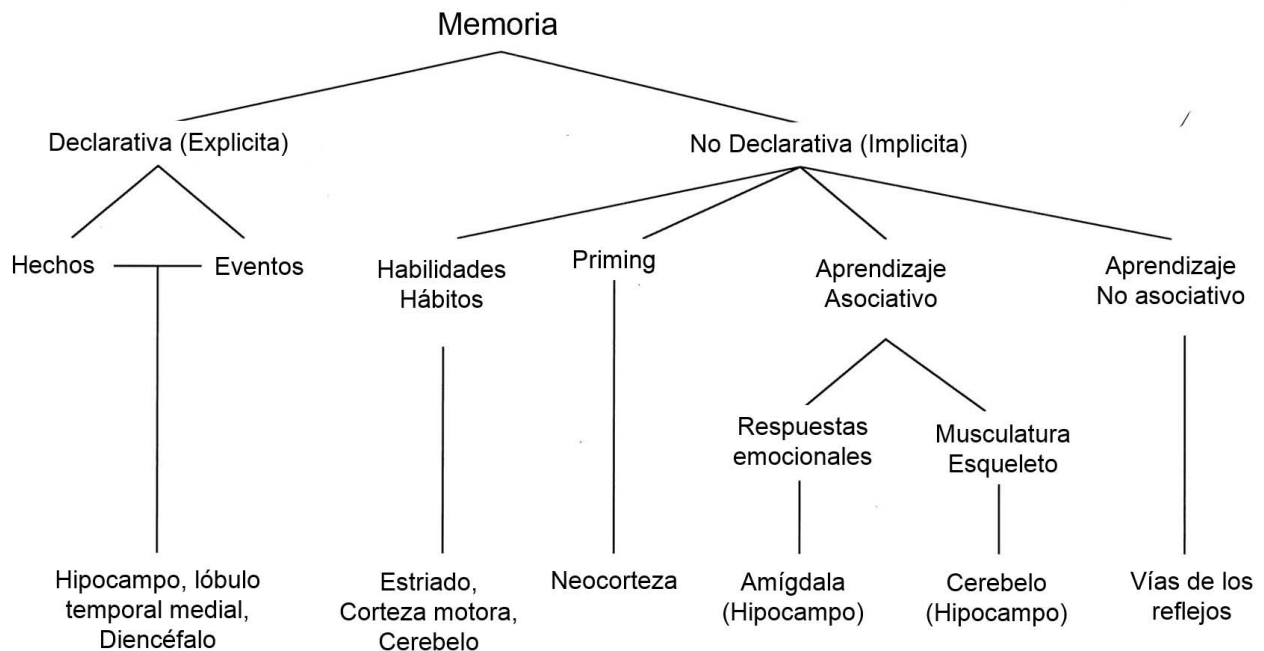


Figura 1. Sistema de clasificación de la memoria según el tipo de información. Se muestra varias estructuras que participan en la formación de circuitos neuronales para la ejecución de varias conductas. Modificado de Squire, (1992).

En 1990, Müller y Pielzecker (Müller & Pilzecker, 1990) introdujeron el concepto de *consolidación*, que implica el proceso en el cual una MCP puede pasar a una MLP. Durante la consolidación se desencadena una serie de mecanismos moleculares, como la expresión de genes y síntesis de proteínas de novo (Kandel, 2001).

Se ha descrito que durante la consolidación se genera una progresiva estabilización post-adquisición de la información que lleva hacia el almacenamiento a largo plazo, que es dependiente del tiempo y durante la cual la memoria es lábil siendo susceptible de ser alterada cuando se interfiere con la actividad cerebral, pudiéndose mejorar o inhibir la formación de la MLP (Dudai, 2004; McGaugh, 1966; Prado-Alcalá, & Quirarte, 2007) (Fig. 2).

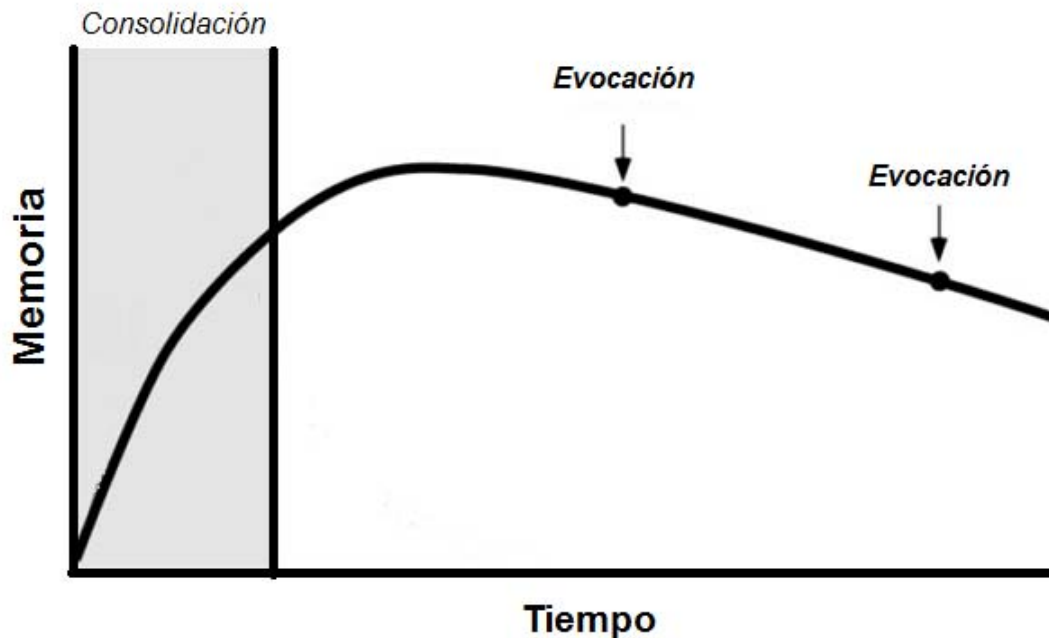


Figura 2. Representación esquemática de la clasificación temporal de la memoria. MCP: Memoria de corto plazo; MLP: Memoria de largo plazo; también se muestran las diferentes etapas de la memoria (adquisición, consolidación y evocación). Modificada de Dudai, (2004).

Una vez que la memoria que ha sido consolidada, la única forma de corroborar su existencia es a través de un proceso conocido como *evocación*. La evocación es un proceso complejo que implica la salida de la información almacenada y la rápida toma de decisiones en donde el organismo debe extraer la información relacionada con el contexto actual y ejecutar la conducta más coherente con respecto a la experiencia previa (Tulving & Thomson, 1973). La evocación es un proceso cognitivo que convierte las memorias pasivas a memorias activas y permite la modificación de dicha información almacenada (Dudai, 2004).

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

Se ha demostrado que la administración de anisomicina (inhibidor de la síntesis de proteínas) directamente en el hipocampo, 3, 4.5, o 6 horas después del entrenamiento en la tarea de evitación inhibitoria de un solo ensayo, interfiere con el proceso de consolidación de la memoria. Sin embargo, si la anisomicina se administra 7.5 horas después de la sesión de adquisición, no afecta la retención de esta tarea. Estos resultados sugieren que el proceso de consolidación de la tarea de evitación inhibitoria sigue ocurriendo hasta 6 horas después de que los animales son entrenados (Igaz, Vianna, Medina, & Izquierdo, 2002) (Fig. 3).

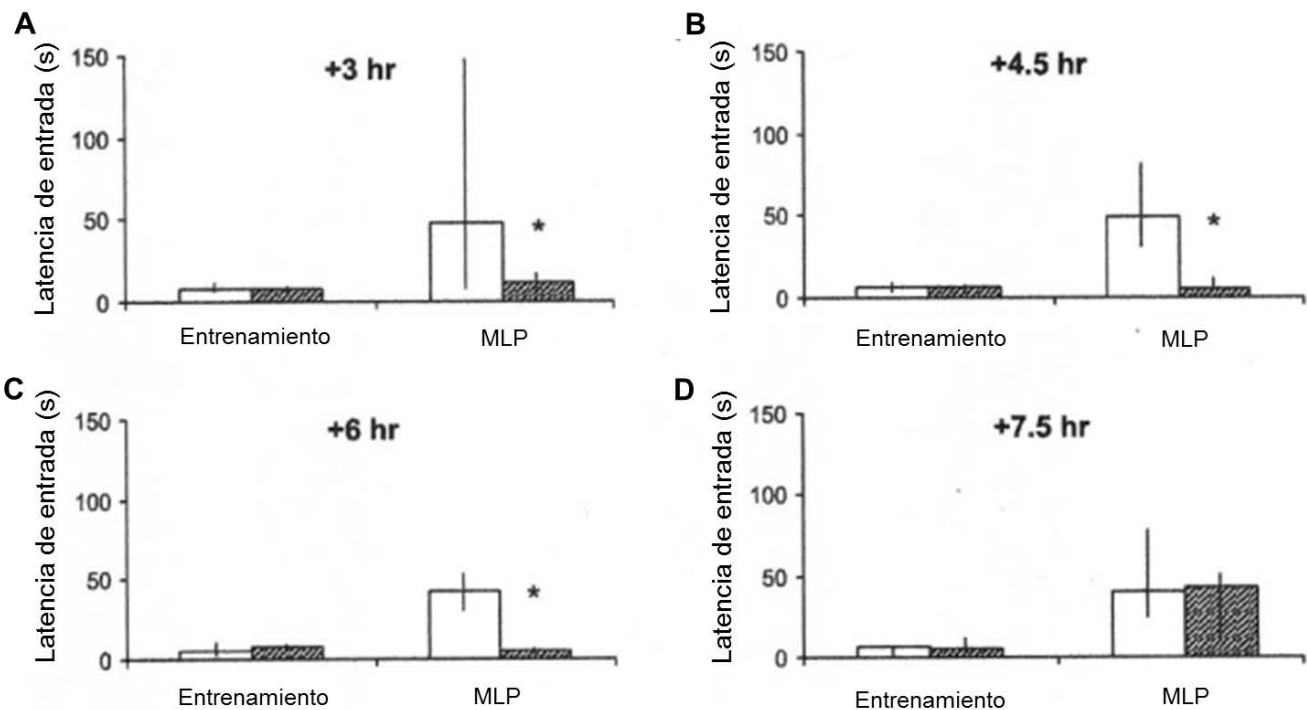


Figura 3. Administración de anisomicina en el CA1 del hipocampo dorsal (80 µg por hemisferio) (barras con líneas) o solución salina (barras blancas) a diferentes tiempos después del entrenamiento en la tarea de evitación inhibitoria. Los datos están expresados en medianas con rangos intercuartiles. Modificada de Igaz et al., (2002).

Durante las diferentes etapas de la memoria, principalmente la consolidación y la evocación, se pueden producir cambios funcionales o estructurales relacionados con la eficiencia sináptica, lo cual incrementa la fuerza con la que se puede reproducir un patrón de actividad en el sistema nervioso central derivado de la experiencia. De esta manera el almacenamiento de la información es más duradero, persistente y robusto.

2. Plasticidad sináptica

Se puede definir a la plasticidad sináptica como *cambios en la eficiencia sináptica que permiten el fortalecimiento de las conexiones funcionales entre las neuronas* (Lynch, 2004). La plasticidad sináptica ocurre a todos los niveles, desde las modificaciones en la funcionalidad de un canal iónico, hasta las características morfológicas de las neuronas, como es el caso de los cambios estructurales en las conexiones sinápticas (dinámica conformacional de espinas dendríticas). Estos cambios pueden persistir durante ventanas temporales que van en el orden de milisegundos hasta años.

Durante las diferentes etapas del procesamiento de la información, entre ellas, el aprendizaje, la consolidación y evocación de la memoria pueden producir cambios en la organización sináptica, es decir, en la conectividad de diferentes neuronas en los ensambles neuronales, a lo que se conoce como *plasticidad estructural*.

En el marco de la plasticidad estructural se han estudiado ampliamente diferentes aspectos anatómicos como la densidad de botones presinápticos y postsinápticos. Además, en el estudio de las espinas dendríticas, se ha tenido en cuenta varias de sus características como la morfología, la densidad y la función.

2.1 Espinas dendríticas

Son pequeñas protrusiones que emergen de las dendritas de muchas neuronas, que corresponden únicamente a sinapsis excitatorias. Se han caracterizado por tener diversas

longitudes y formas (Harris & Kater, 1994). Las espinas dendríticas son altamente dinámicas, por lo tanto, son consideradas como un “*hot site*” de la plasticidad sináptica (Fiala, Spacek, & Harris, 2002; Sala & Segal, 2014). Las espinas juegan tres papeles esenciales en el sistema nervioso central: (1) mantenimiento de la potenciación a largo plazo, (2) regulación de la dinámica de calcio y (3) amplificación de las señales sinápticas (Sala & Segal, 2014).

Una característica de las sinapsis excitatorias es su alto nivel de variabilidad estructural. Este fenómeno es regulado por la actividad neuronal, y el tamaño de la cabeza de las espinas dendríticas se ha correlacionado con la fuerza sináptica y la estabilidad de la sinapsis a largo plazo (Holtmaat et al., 2005).

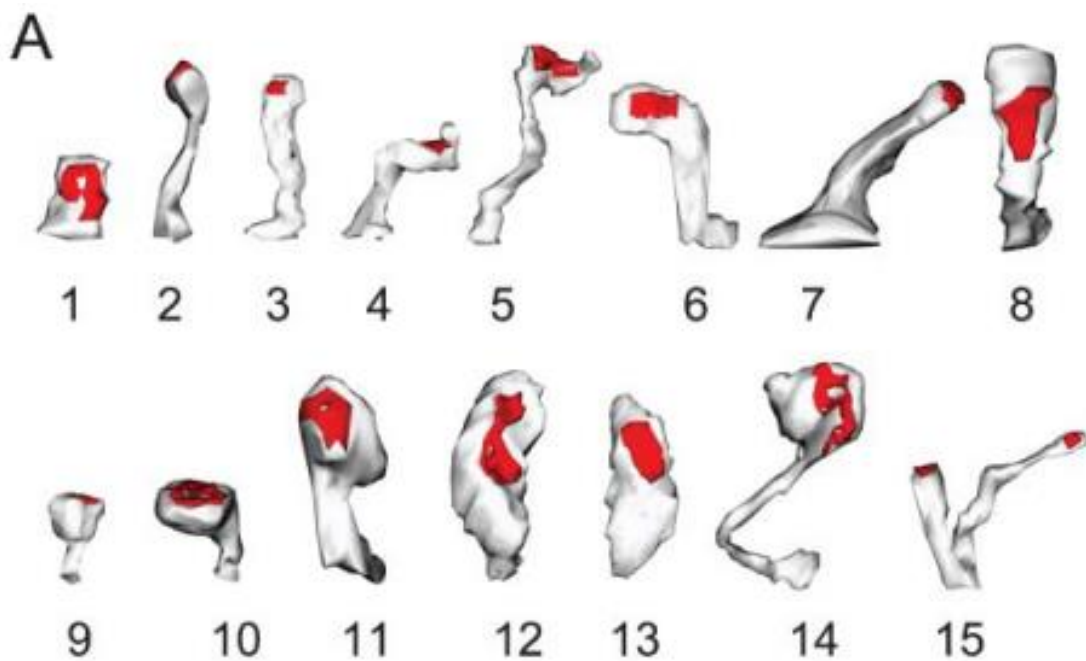


Figura 4. Reconstrucción tridimensional de espinas dendríticas. **A.** Diferentes tipos de espinas dendríticas: corta (1), larga (2), hongo (9-11) y ramificada (15). También se pueden observar formas atípicas u otros tipos de espinas (3-8, 12-14). Modificada de Arellano, Benavides-Piccione, Defelipe y Yuste (2007).

Las espinas dendríticas están formadas por una cabeza esférica ($\sim 1 \mu\text{m}$ de diámetro), unidas a un cuello ($< 0.5 \mu\text{m}$ de diámetro y $> 0.5 \mu\text{m}$ de longitud) (Yuste, 2009). Las espinas dendríticas tienen una gran variedad de formas, y en 1970 se les clasificó de acuerdo a su

morfología en tres tipos esenciales: larga, corta y hongo (Peters & Kaiserman-Abramof, 1970).

Las espinas tipo *larga* se caracterizan por ser delgadas, cuello largo y cabeza redondeada pequeña. Las espinas tipo *hongo* se definen con una gran cabeza, cuello corto y muy delgado. Las espinas tipo *corta* se caracterizan por no tener una cabeza y cuello definidos (Peters & Kaiserman-Abramof, 1970). En 2007, Arellano y colaboradores reportaron un nuevo tipo de espina, la *ramificada*, la cual se define por presentar una bifurcación cerca de la base del cuello y tener dos cabezas (Arellano, Benavides-Piccione, Defelipe & Yuste, 2007) (Fig. 4). También se ha reportado las espinas dendríticas tipo *multi-cabeza*, las cuales se caracterizan por tener tres o más cabezas; este tipo de espina dendrítica han sido reportado en neuronas GABAérgicas como las neuronas Maritnotti de la corteza (Yasuo Kawaguchi, Karube, & Kubota, 2006) y las neuronas medianas espinosas del núcleo accumbens (Comery, Stamoudis, Irwin, & Greenough, 1996; Robinson y Kolb, 1997).

Como se mencionó anteriormente hay características propias de las espinas dendríticas que pueden variar según la morfología. A continuación se muestra las dimensiones de los diferentes tipos de espinas dendríticas en la rata adulta (Tabla 1).

Dimensiones	Tipo de espina dendrítica		
	<i>Larga</i>	<i>Hongo</i>	<i>Corta</i>
Área total (μm^2)	0.59 ± 0.29	2.70 ± 0.93	0.45 ± 0.14
Área cabeza (μm^2)	0.40 ± 0.15	2.40 ± 0.92	-
Área de PSD total (μm^2)	0.05 ± 0.02	0.30 ± 0.10	0.07 ± 0.02
Volumen total (μm^3)	0.04 ± 0.02	0.29 ± 0.13	0.03 ± 0.01
Longitud total (μm)	0.98 ± 0.42	1.50 ± 0.25	0.44 ± 0.15
Diámetro del cuello (μm)	0.10 ± 0.03	0.20 ± 0.07	0.32 ± 0.13
Diámetro de la dendrita (μm)	0.62 ± 0.26	0.81 ± 0.24	0.78 ± 0.36

Tabla 1. Características morfométricas de los principales tipos de espinas dendríticas: Larga, hongo, corta. Modificado de Harris, Jensen y Tsao (1992).

Las espinas dendríticas están compuestas de varios subdominios especializados que les permiten ejercer diferentes funciones en la transmisión sináptica. Inmediatamente después de la membrana postsináptica se encuentra una estructura engrosada con apariencia de disco conocida como la *densidad postsináptica* (PSD, *Post-synaptic density*).

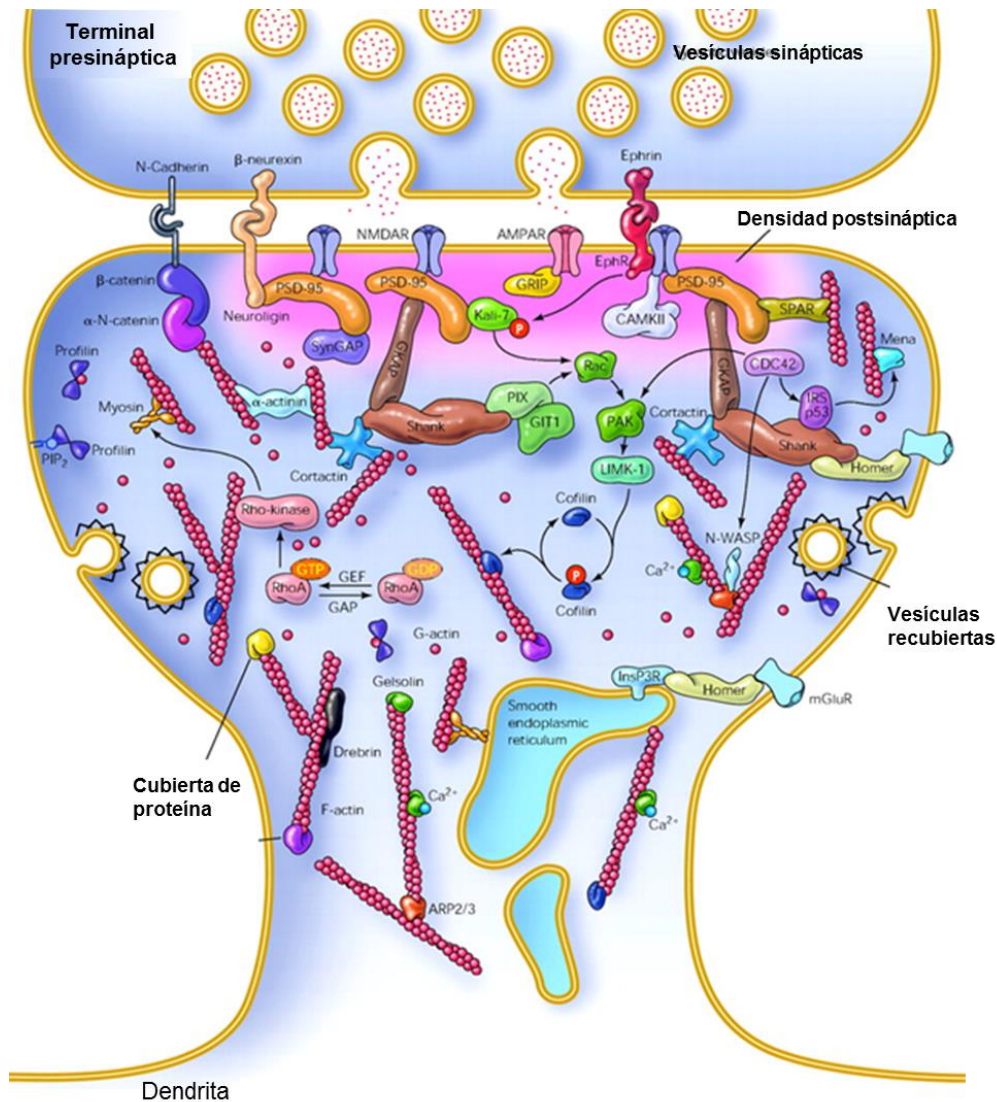


Figura 5. Componentes importantes de las espinas dendríticas. El glutamato es liberado de las vesículas presinápticas y los receptores AMPA y NMDA son agrupados en la zona activa postsináptica (densidad postsináptica, en rosa). Más allá de la PSD la membrana de la espina dendrítica contiene receptores a glutamato acoplados a proteínas G (mGluR) y zonas de endocitosis para el reciclamiento de proteínas de membrana. Los receptores se unen a las moléculas de andamiaje como la PSD-95, la cual activa complejos de señalización (reguladores de RhoGTPasas o proteínas quinasas). Los filamentos de actina proveen la principal base estructural de la forma de la espina dendrítica. Modificado de Calabrese, Wilson y Halpain (2006).

La PSD contiene numerosas proteínas, incluyendo receptores, canales iónicos, proteínas de andamiaje, moléculas de señalización enzimática, elementos de citoesqueleto, proteínas de endocitosis y exocitosis (Harris & Weinberg, 2012; Kennedy, 2000; Sheng & Hoogenraad, 2007). El tamaño de la PSD se correlaciona positivamente con el número de vesículas presinápticas (Harris & Stevens, 1988), con el número de vesículas ancladas, el tamaño de la zona activa presináptica (Schikorski y Stevens, 1999) y el número de receptores postsinápticos (Nusser, Cull-Candy, & Farrant, 1997) (Fig. 5).

Una gran cantidad de espinas también contiene poliribosomas, los cuales median la síntesis de proteínas local (Bourne & Harris, 2007; Ostroff, Fiala, Allwardt, & Harris, 2002; Steward & Schuman, 2001) así como compartimentos endosomales, los cuales sirven como centro de reciclaje local de receptores de membrana, que se lleva a cabo durante la formación o eliminación de las espinas y en la plasticidad sináptica relacionada con la memoria (Cooney, Hurlburt, Selig, Harris, & Fiala, 2002; Park et al., 2006). Otro organelo celular encontrado en las espinas dendríticas son los retículos endoplásmicos rugosos, los cuales están involucrados con la regulación de calcio intracelular almacenado en pequeños reservorios. La elevación de la concentración de Ca^{+2} en las espinas dendríticas da inicio a la transducción de señales bioquímicas que promueve la plasticidad sináptica, incluyendo la LTP (Long-term potentiation) o LTD (Long-term depression) (Malenka & Nicoll, 1993).

Con la técnica de microscopía electrónica se ha observado que en las espinas dendríticas hay una gran cantidad de filamentos de actina. La polimerización de la actina es la responsable de la forma de la espina dendrítica (Honkura, Matsuzaki, Noguchi, Ellis-Davies, & Kasai, 2008). Asimismo, se ha encontrado una variedad de proteínas asociadas a la actina, tales como la miosina, debrina, fodrina, espinofilina, neuroabin 1 y cortactina (Ethell & Pasquale, 2005). La actina y sus moléculas asociadas podrían jugar un papel importante en algunas funciones, como el transporte de proteínas y vesículas, regulación de la morfología de la espina y el anclaje de proteínas de membrana.

Las espinas dendríticas son compartimentos que contienen muchas proteínas, además de las mencionadas anteriormente, también se encuentran las proteína de citoesqueleto, como la proteína asociada a microtúbulos (MAP2, microtubule-associated

protein 2) (Caceres, Payne, Binder, & Steward, 1983); moléculas de adhesión como la N-caderina, las integrinas (Tang, Hung, & Schuman, 1998) y la molécula de adhesión celular neuronal (NCAM) (Persohn & Schachner, 1990); proteínas quinasas como quinasa dependiente a calcio-calmodulina 2 (CaMKII) (Kelly, McGuinness, & Greengard, 1984), la proteína quinasa C (PKC) (Wolf, Burgess, Misra, & Sahyoun, 1986), fosfatasas como la proteína fosfatasa 1 (PP1) (Ouimet, da Cruz e Silva, & Greengard, 1995); proteasas, canales y receptores (Yuste & Bonhoeffer, 2001) (Fig. 5).

La densidad de espinas dendríticas se va estabilizando conforme ocurre la maduración del cerebro, es decir que durante el desarrollo y en la etapa neonatal, la densidad de espinas dendríticas es alta y va disminuyendo conforme aumenta la edad. Sin embargo, una vez que el individuo llega a su edad adulta la densidad de espinas dendríticas se estabiliza. En el cerebro adulto se ha demostrado que hay una estrecha relación entre la morfología de la espina y su función (Yuste, Majewska, & Holthoff, 2000).

Se ha propuesto que las espinas tipos **larga** y **hongo** están relacionadas con diferentes etapas del procesamiento de información como son el aprendizaje (Holtmaat et al., 2005; Kasai, Matsuzaki, Noguchi, Yasumatsu, & Nakahara, 2003; Zuo, Yang, Kwon, & Gan, 2005) y la memoria (Bourne & Harris, 2008; Kasai et al., 2003). La función de las espinas tipo **corta** se desconoce aún. No obstante, se ha hipotetizado que regulan la excitabilidad neuronal (González-Burgos, 2012) pues se ha visto que este tipo de espinas facilitan la difusión de calcio a la dendrita (Hayashi & Majewska, 2005). Se ha observado que las espinas tipos **bifurcada y multi-cabeza** son una forma de espina inmadura (Harris et al., 1992; Peters & Kaiserman-Abramof, 1970), sin embargo, se ha sugerido que estos tipos de espinas dendríticas podrían dar lugar a sinapsis más eficientes, pues generan doble entrada de información en la misma espina dendrítica, ya que en cada cabeza pueden hacer contacto sináptico axones diferentes (Harris et al., 1992; Sorra & Harris, 1998; Trommald & Hulleberg, 1997).

La morfología y la densidad de las espinas dendríticas pueden variar en respuesta a muchos factores, tales como la exposición a ambiente enriquecido, manipulaciones farmacológicas, estatus hormonal, aprendizaje y memoria (Fiala et al., 2002; Yuste & Bonhoeffer, 2001).

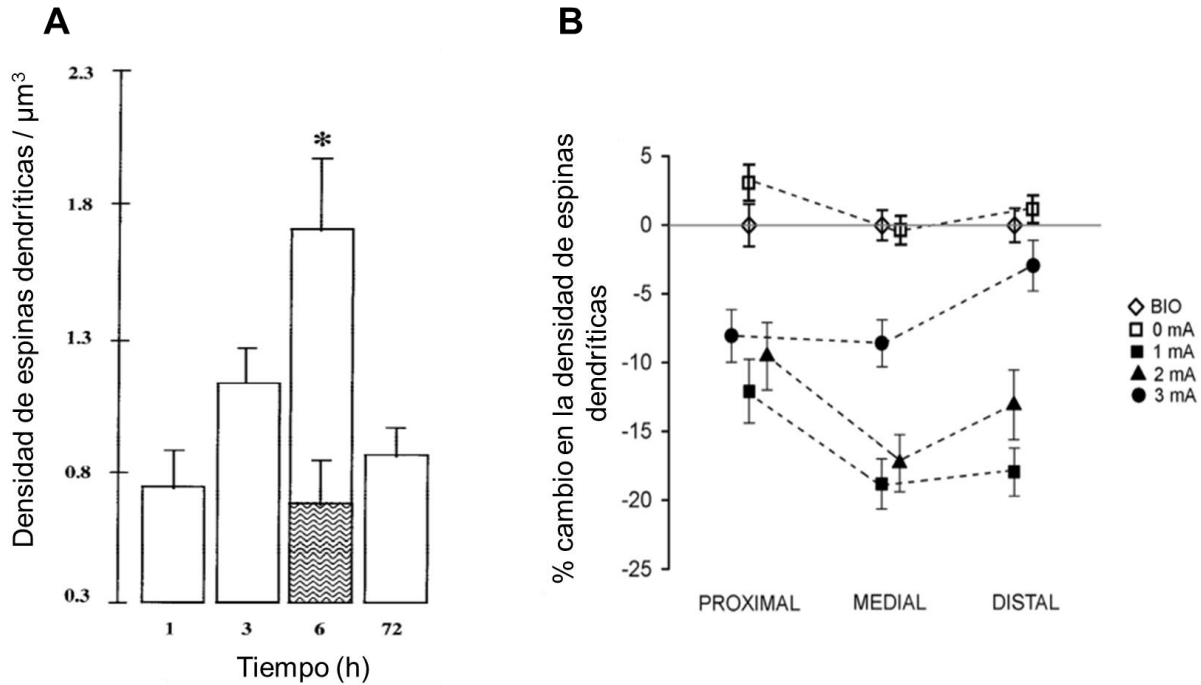


Figura 6. Densidad de espinas dendríticas después de la tarea de evitación inhibitoria. **A.** Densidad de espinas dendríticas en la capa molecular de las células granulares del giro dentado de rata adulta después del entrenamiento en la tarea de evitación inhibitoria. El asterisco indica diferencias significativas con respecto a los grupos 1 y 72 horas. La barra con patrón de líneas indica la densidad de espinas dendríticas en un grupo control. Modificado de O'Malley et al., (1998). **B.** Porcentaje de cambio en la densidad de espinas dendríticas (normalizado con respecto al grupo bioterio) encontradas en cada uno de los tres segmentos de la dendrita apical de neuronas de CA1 del hipocampo dorsal, 24 h después de la sexta sesión de extinción de la tarea de evitación inhibitoria. Modificado de Garín-Aguilar et al., (2012).

Uno de los cambios estructurales que han sido propuestos como sustrato de la MLP está relacionado con un cambio en la densidad de espinas dendríticas (Horner, 1993). Hay evidencia que muestra que el aprendizaje y la memoria inducen un aumento en la densidad de espinas dendríticas en el hipocampo en una gran variedad de tareas conductuales tales como el laberinto acuático de Morris, el condicionamiento de miedo al contexto (Horner, 1993; Moser, Trommald, & Andersen, 1994; Rusakov et al., 1997) y la tarea de evitación

inhibitoria (O'Malley, O'Connell, & Regan, 1998). En este último caso, la densidad de espinas en las células granulares del giro dentado del hipocampo aumentó 6 horas después del entrenamiento y regresó a niveles basales 72 horas después de la sesión de entrenamiento (O'Malley et al., 1998) (Fig. 6A).

Durante la fase de extinción, en animales que fueron entrenados en la tarea de evitación inhibitoria con diferentes intensidades de choque eléctrico (1.0, 2.0 ó 3.0 mA), se encontró una disminución en la densidad de espinas con respecto a aquellos animales que no fueron entrenados o que recibieron una intensidad baja o moderada del estímulo aversivo en todos los segmentos de la dendrita apical de las neuronas de CA1; sin embargo, aquellos animales a los que se les administró la intensidad de choque eléctrico alta, no mostraron esa disminución. Lo cual muestra una resistencia a la poda de las espinas dendríticas. A su vez, conductualmente se observó una mayor resistencia a la extinción en las ratas entrenadas con el choque más alto, lo cual correlacionó con la persistencia de las espinas dendríticas en la región distal de la dendrita apical de las neuronas de CA1 (Garín-Aguilar et al., 2012) (Fig. 6B).

También se ha observado un aumento en la densidad de espinas dendríticas en otras estructuras cerebrales, como la corteza prefrontal medial durante la formación de la memoria reciente y remota en una tarea de condicionamiento de miedo al contexto (Aceti, Vetere, Novembre, Restivo, & Ammassari-Teule, 2015; Restivo, Vetere, Bontempi, & Ammassari-Teule, 2009), la amígdala basolateral después del condicionamiento del miedo y durante el proceso de extinción de dicha tarea (Heinrichs et al., 2013) y en las células de Purkinje de la corteza del cerebelo durante un aprendizaje motor (Gonzalez-Tapia, Velazquez-Zamora, Olvera-Cortes, & Gonzalez-Burgos, 2015). Sin embargo, se han publicado pocos trabajos relacionados con algunas estructuras cerebrales como el estriado; es este caso, se ha reportado cambios en la densidad de espinas dendríticas después de una experiencia de ambiente enriquecido (Comery et al., 1996), administración directa de anfetaminas (Robinson & Kolb, 1997) y en enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson (Toy et al., 2014).

3. Estriado dorsal

El estriado, también conocido como caudado-putamen, es una región cerebral que es parte de los ganglios basales (Fig. 7A). Funcionalmente el estriado dorsal puede dividirse en dos regiones: estriado dorsomedial y estriado dorsolateral.

Anatómicamente el estriado presenta una distribución celular homogénea; las células estriatales se dividen en tres grandes tipos: las neuronas medianas espinosas (MSNs), las interneuronas grandes sin espinas y las interneuronas medianas sin espinas (Kreitzer, 2009). Las MSNs toman su nombre de su apariencia anatómica y representan > 90 % de las neuronas del estriado. Con el uso de métodos de transporte axonal retrogrado se ha reportado que las MSNs son las neuronas de proyección del estriado (Grofová, 1975). Mientras que las neuronas restantes, es decir, las interneuronas distribuyen sus axones localmente.

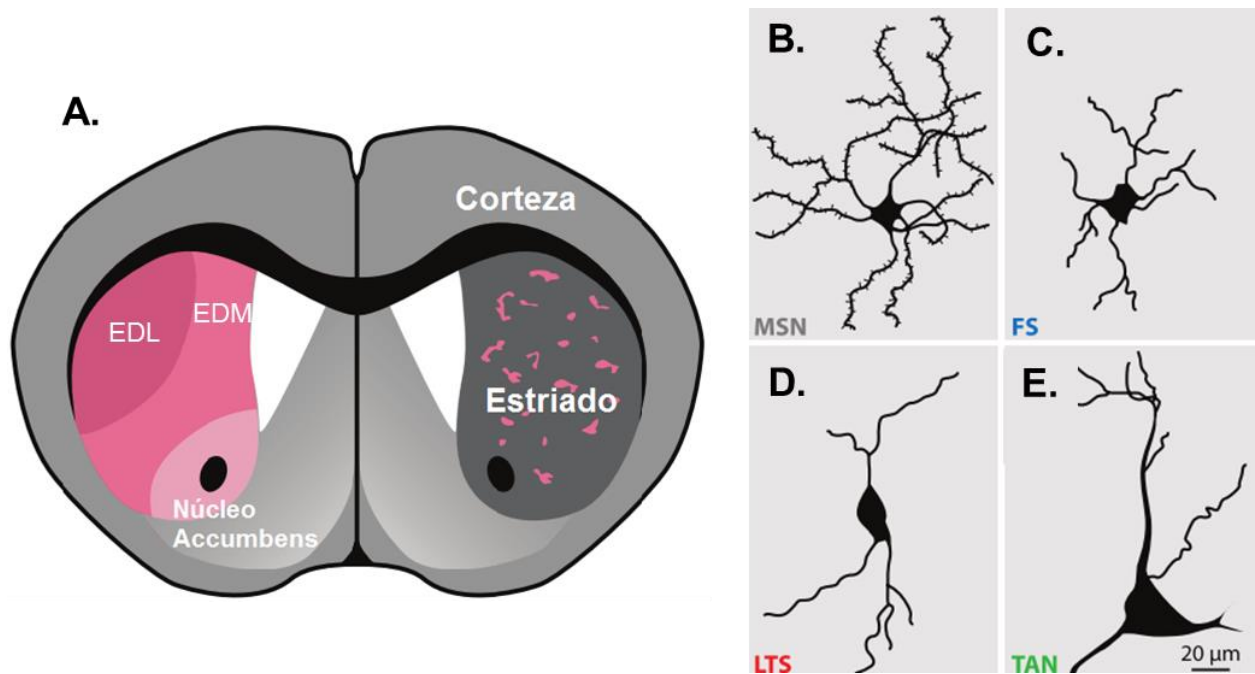


Figura 7. A. Esquema de un corte coronal de cerebro de roedor en donde se muestra la localización de la corteza, el estriado y el núcleo accumbens. En el hemisferio derecho se muestran en color rosado los parches estriatales y en el hemisferio izquierdo se muestra la división de estriado en estriado dorsomedial (EDM), dorsolateral (EDL) y núcleo accumbens. B. Neurona mediana espinosa (MSNs), C. Interneurona de disparo rápido (FS), D. Interneurona de disparo de umbral bajo (LTS), E. Interneurona colinérgica (TAN). Modificado de Kreitzer, (2009).

El soma de las MSNs tiene un diámetro de 12-20 μm , presentan de 5 a 8 ramificaciones dendríticas de forma radial que poseen una alta densidad de espinas dendríticas. Toda la neurona puede extenderse hasta ocupar un área de 200 μm aproximadamente (Kawaguchi, Wilson, & Emson, 1990). Estas neuronas son GABAérgicas y se pueden diferenciar en dos tipos: estriatonigrales (vía directa) y estriatopalidales (vía indirecta) (Smith, Bevan, Shink, & Bolam, 1998).

Las interneuronas estriatales se clasifican en dos tipos, según la neuroquímica: (1) las interneuronas grandes sin espinas, las cuales utilizan acetilcolina como neurotransmisor, son fácilmente identificables por su gran tamaño, el soma tiene un diámetro $> 40 \mu\text{m}$ y son acetilcolinesterasa positivas (Fibiger, 1982); (2) las interneuronas medianas sin espinas son GABAérgicas (Yasuo Kawaguchi, Wilson, Augood, & Emson, 1995), expresan GAD67, parvalbumina-positivas, somatostatina-positivas, neuropéptido Y, óxido nítrico sintetasa positivas y calretinina-positivas (Kreitzer, 2009).

Desde un punto de vista funcional, estos tipos de células también pueden clasificarse en cuanto a sus patrones de disparo de potenciales de acción. Las células parvalbumina-positivas presentan tasas de disparo rápido de manera sostenida, por lo que también pueden ser nombradas como interneuronas de disparo rápido (FS, por sus siglas en inglés). Mientras que las somatostatina-positivas y las calretinina-positivas, tienen tasas de disparo menores, son conocidas como interneuronas de umbral bajo (LTS) (Tepper & Bolam, 2004) (Figura 7B).

El estriado se organiza diferencialmente teniendo en cuenta marcadores neuroquímicos, ciertos marcadores hacen visibles los parches diferenciados, mientras que otros marcadores expresan una matriz que se encuentra rodeando a los parches (Herkenham & Pert, 1981) (Figura 7A).

Los parches también denominados estriosomas, representan $\sim 10\%$ del volumen estriatal, y se distinguen por una unión densa del receptor μ -opioide, una alta actividad para marcadores de sustancia P y una actividad escasa para marcadores colinérgicos como la

acetilcolinesterasa (Dubé, Smith, & Bolam, 1988; Graybiel & Ragsdale, 1978; Herkenham & Pert, 1981). Por su parte, la matriz es relativamente abundante en marcadores colinérgicos, particularmente, acetilcolinesterasa y colina acetiltransferasa (ChAT), así como la presencia de una alta inmunoreactividad para calbindina y somatostatina (Gerfen, 1984; Gerfen, Baimbridge & Miller, 1985; Graybiel, 1986; Graybiel & Ragsdale, 1978).

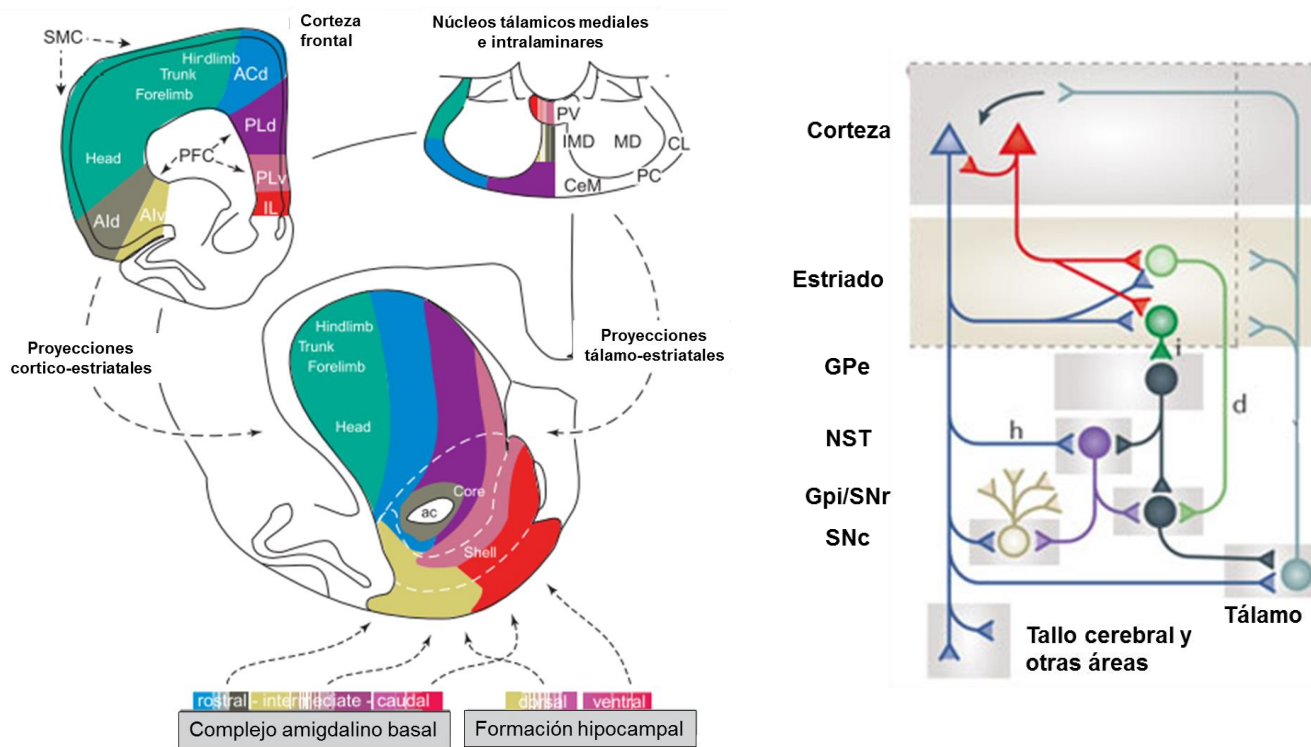


Figura 7. Conectividad del estriado. En la izquierda se muestra un corte coronal del estriado de rata en el que se muestra la división funcional basada en el criterio de conectividad. En la derecha se muestra un esquema que muestra las aferencias y eferencias del estriado. Abreviaturas: ac, comisura anterior; GPe, globo pálido externo; GPi, globo pálido interno; IL, núcleo interlaminar talámico; MD, núcleo mediodorsal talámico; MEA, área medial extrapiramidal (tallo cerebral); SNpc, sustancia nigra pars compacta; SNpr, sustancia nigra pars reticulata; STN/NST, núcleo subtalámico; VA, núcleo ventral anterior talámico; VL, núcleo ventral lateral talámico; i, vía indirecta (líneas grises); d, vía directa (líneas verdes). Modificado de Voorn, Vanderschuren, Groenewegen, Robbins y Pennartz, (2004) (izquierda); y de Shepherd (2013) (derecha).

En cuanto a su neuromodulación, se sabe de la presencia de los sistemas de neurotransmisión de dopamina y acetilcolina, ambos asociados primariamente con la función

normal de los ganglios basales: la actividad motora, los procesos emotivos y de memoria (Schultz, 2007; Zhou et al., 2002).

A las neuronas medianas espinosas del estriado llegan aferencias provenientes de las áreas corticales sensoriales, motoras, premotoras, prefrontales y de diferentes núcleos subtalámicos (White & McDonald, 2002); estas aferencias son glutamatérgicas. También reciben aferencias dopaminérgicas provenientes de la sustancia nigra pars compacta (Mink, 2003). Las aferencias límbico-corticales, tálamo-estriatales y corticoestriatales se encuentran organizadas topográficamente intervando las diferentes regiones funcionales del estriado. El estriado dorsolateral (EDL) recibe información de las cortezas motora y somatosensorial. El estriado dorsomedial recibe información de áreas corticales asociativas, corteza prefrontal e hipocampo dorsal (Featherstone & McDonald, 2005; Mcdonald, 1991).

Las MSNs GABAérgicas del estriado proyectan a través de dos vías: una vía directa al globo pálido interno (GPi) y la sustancia nigra pars reticulata (SNpr) conocida como la vía estriato-nigral y la vía indirecta que tiene varios relevos incluyendo al globo pálido externo, núcleos subtalámicos, GPi y SNpr, esta vía es conocida como la vía estriato-palidal.

Histoquímicamente las MSNs estriatonigrales expresan altos niveles de receptores dopaminérgicos D1 y receptores muscarínicos M4. En cambio, las MSNs estriato-palidales tienen una alta expresión de receptores D2 y receptores a adenosina A2A.

3.1 Participación del estriado dorsal en el aprendizaje y la memoria

Se ha propuesto que el estriado participa en diferentes tipos de aprendizaje con la participación de tres circuitos, (1) *asociativo* en el que participan regiones corticales de asociación como es el caso de la corteza prefrontal medial, la cual proyecta al estriado dorsomedial; (2) *sensorimotor* en el que se involucran las cortezas sensoriales y motoras, las cuales proyectan al estriado dorsolateral; (3) *límbico* el cual implica regiones cerebrales límbicas como la amígdala basolateral y el hipocampo, las cuales proyectan al estriado ventral o núcleo accumbens (Yin & Knowlton, 2006).

Como se ha mencionado previamente, en la consolidación de la memoria participan varias estructuras cerebrales que funcionan como núcleos de procesamiento para que la información sea almacenada de forma eficiente. Numerosos estudios han demostrado que el estriado está íntimamente involucrado en la adquisición, consolidación y evocación de la memoria de varias conductas condicionadas (Divac, Rosvold, & Szwarcbart, 1967; Prado-Alcalá, 1995; White & McDonald, 2002). En algunos reportes se ha asociado al estriado con el aprendizaje de estímulo-respuesta. Experimentos de farmacología conductual señalan la importancia de los neurotransmisores como dopamina, acetilcolina y GABA en el estriado en las diferentes formas de plasticidad sináptica como LTP y LTD (Packard & Knowlton, 2002).

El análisis de los efectos en la conducta provocados por lesiones puntuales en el estriado sugieren la especialización regional en el aprendizaje y en la toma de decisiones (Wickens, Budd, Hyland, & Arbuthnott, 2007). El estriado dorsal es heterogéneo en su función.

La región dorsolateral participa en la consolidación de asociaciones de estímulo-respuesta y la adquisición de hábitos. Se ha reportado que la administración local de un antagonista a receptores NMDA bloquea el aprendizaje dirigido a un objetivo, sin embargo, las lesiones excitotóxicas deterioran la formación de hábitos (Yin, Knowlton, & Balleine, 2004). La región dorsomedial modula la selección de estrategias de navegación dependientes del hipocampo, y además participa en la consolidación de la memoria espacial (Featherstone & McDonald, 2005).

El estriado dorsal se ha considerado selectivamente importante para la memoria no declarativa como la memoria de procedimiento. En la tarea de evitación inhibitoria el procesamiento de la información adquirida tiene tres componentes que dependen de tres estructuras, básicamente: el *estriado*, pues implica la asociación de estímulos ambientales con la respuesta motora; el *hipocampo*, pues la ubicación del sujeto se establece mediante claves espaciales; y la *amígdala*, ya que tiene un alto componente emocional pues se establece mediante la aplicación de un evento aversivo (McDonald & White, 1993).

Por otro lado, se ha observado que la exposición a un evento estresante, por ejemplo, el entrenamiento en la tarea de evitación inhibitoria, se activa el eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA), se liberan diferentes hormonas del estrés, como la corticosterona en ratas y cortisol en humanos. La corticosterona es producida por la corteza adrenal (de Kloet, Sibug, Helmerhorst & Schmidt, 2005) y liberada al torrente sanguíneo, atraviesa la barrera hematoencefálica hasta llegar a diferentes estructuras cerebrales como el hipocampo, la amígdala, la corteza y el estriado (Kröll et al., 2009).

La distribución de los receptores a glucocorticoides (GR) es homogénea en todo el estriado (Morimoto, Morita, Ozawa, Yokoyama, & Kawata, 1996) (Fig. 8A). La corticosterona se une a su receptor en el citoplasma celular, el GR se activa siendo fosforilado en la serina 203, 211 o 226 (Ismaili & Garabedian, 2004) y a su vez sufre un cambio conformacional que lo libera de las proteínas chaperonas a las que se encuentra unido en estado basal (Lu & Cidlowski, 2006) y expone la región que contiene la señal de localización nuclear permitiendo la translocación al núcleo mediada por la importina 7 y el heterodímero importina α -importina β (Freedman & Yamamoto, 2004).

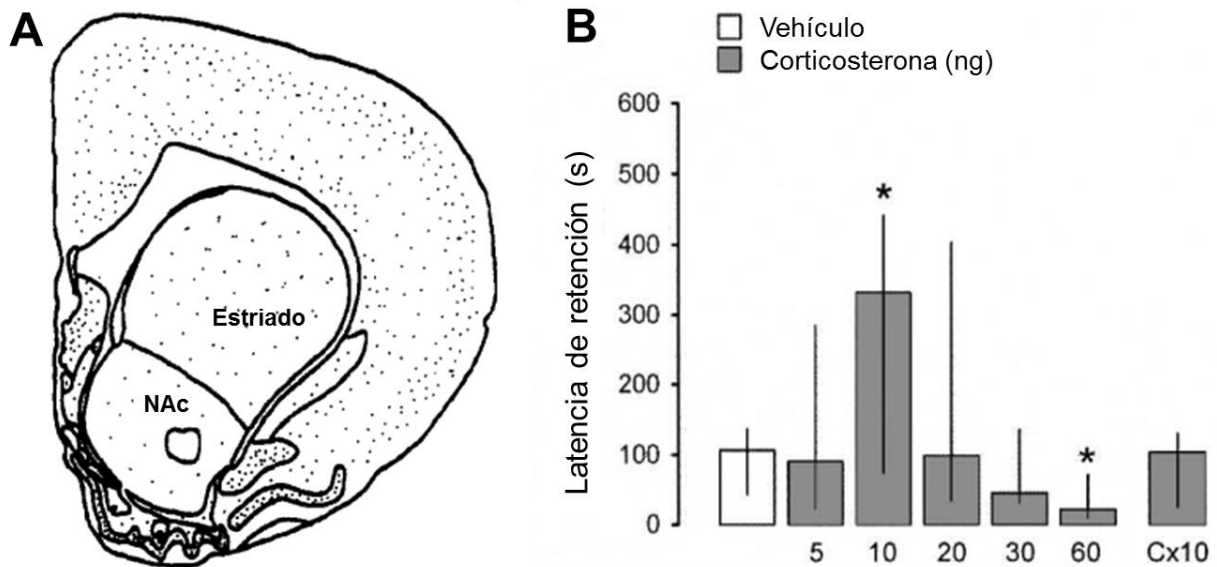


Figura 8. A. Esquema representativo de la distribución de los receptores a glucocorticoides en las diferentes regiones cerebrales. Modificado de Morimoto et al., (1996) B. Efecto de la infusión de corticosterona en el estriado dorsal después del entrenamiento en la tarea de evitación inhibitoria. Los asteriscos muestran diferencias significativas con respecto al grupo vehículo. Cx, corteza parietal. Modificado de Medina et al., (2007).

El GR fosforilado en la serina 211 se une al elemento responsivo a glucocorticoides (GRE) en el ADN y actúa como factor de transcripción de algunos genes como el gen NFkB. Se ha reportado que la subunidad p65 del NFkB regula positivamente la densidad de espinas dendríticas en el hipocampo, ya que el NFkB regula directamente la expresión del gen PSD-95 (Boersma et al., 2011).

Además de los efectos genómicos descritos anteriormente, los glucocorticoides también producen efectos no genómicos. En ese caso la corticosterona entra al citoplasma de la neurona, se une a su receptor (GR), liberándolo del complejo de proteínas chaperonas como las hsp 90 y 70, así como a tres quinasas (Src, Raf y Mek) que pertenecen a la vía de señalización de MAPK (Pratt & Dittmar, 1998). El GR induce la activación de la PKA, cAMP (Roosendaal, Quirarte, & McGaugh, 2002) y MAPK (Revest et al., 2005), las cuales participan en la cascada de señalización que inducen la formación de espinas dendríticas.

El GR también se ha observado en las espinas dendríticas y en algunos casos en la PSD (Post Synaptic Density), esto implica que puede estar participando en la modificación de forma de las espinas dendríticas de manera local (Ooishi et al., 2012).

La administración de corticosterona en el estriado anterodorsal produce un efecto dependiente de la dosis, es decir, si se administran dosis bajas de corticosterona se produce un efecto facilitador en la consolidación de la memoria de la tarea de evitación inhibitoria (Medina et al., 2007), pero si se administran dosis altas se produce deterioro en la evocación de la memoria de esa tarea (Medina et al., 2007) (Fig. 8B).

4. Estriado ventral: núcleo accumbens

El núcleo accumbens (NAc) es una estructura basal localizada en dirección ventrolateral al núcleo septal y ventromedial con respecto al caudado-putamen. El NAc es considerado el principal componente del estriado ventral. El NAc se divide en dos regiones,

el núcleo accumbens core (NAcC) y el núcleo accumbens shell (NAcS). EL NAcC se encuentra ubicado en la región central y lateral del NAc. El NAcS se encuentra localizado en la región medial y ventral del NAc (Setlow, 1997).

Las neuronas medianas espinosas son las neuronas de proyección del NAc, éstas componen el principal tipo celular del núcleo accumbens, se encuentran organizadas tal y como en el estriado dorsal. Las MSNs representan entre el 85 – 90 % de la población celular total del NAc (Tepper & Bolam, 2004). En esta región cerebral existen dos tipos de interneuronas predominantemente, las GABAérgicas de disparo rápido y las colinérgicas tónicas (Tepper & Bolam, 2004).

Las MSNs son el principal punto de convergencia de la información entrante al NAc, éstas células tienen un papel muy importante en la detección, integración y transmisión de la información relevante relacionada con la conducta del individuo.

Las MSNs tienen receptores ionotrópicos (NMDA, AMPA y kainato) y metabotrópicos a glutamato (mGluR5) (Testa, Standaert, Young, & Penney, 1994). Al igual que las MSNs del estriado dorsal también presentan dos poblaciones que poseen receptores dopaminérgicos D1 o D2. Además del glutamato, otros de los neurotransmisores y neuromoduladores importantes en esta estructura son GABA, dopamina, serotonina, acetilcolina, endocannabinoides y opioides (Lu, Ghasemzadeh & Kalivas, 1997).

La mayoría de las fibras que llegan al NAc son glutamatérgicas que provienen de áreas corticales y límbicas tales como el subículo, la formación hipocampal, la amígdala basolateral y la corteza prefrontal. Estas estructuras están involucradas en aspectos emocionales de la conducta. Otras fibras aferentes al NAc provienen de los núcleos talámicos y de neuronas dopaminérgicas del área ventral tegmental (Heidbreder & Groenewegen, 2003).

El NAc proyecta a varias regiones cerebrales. Las eferencias del NAcS llegan en gran proporción a áreas hipotalámicas laterales, la amígdala y en poca proporción al estriado dorsal. EL NAcC proyecta principalmente a la región ventral del globo pálido y a los núcleos dopaminérgicos (Heidbreder & Groenewegen, 2003).

4.1 Participación del núcleo accumbens en el aprendizaje y la memoria

El NAc es una estructura que está fuertemente asociada con funciones motoras, aspectos emocionales y motivacionales de la conducta y algunos aspectos del aprendizaje y la memoria (Cardinal, Parkinson, Hall, & Everitt, 2002; Groenewegen, 2007) y las adicciones (Salgado y Kaplitt, 2015). También se ha reportado que el NAc participa en conductas relacionadas con la recompensa, como la motivación apetitiva (Sesack & Grace, 2010), y asimismo participa en el proceso de información de miedo y estrés (Carlezon & Thomas, 2009).

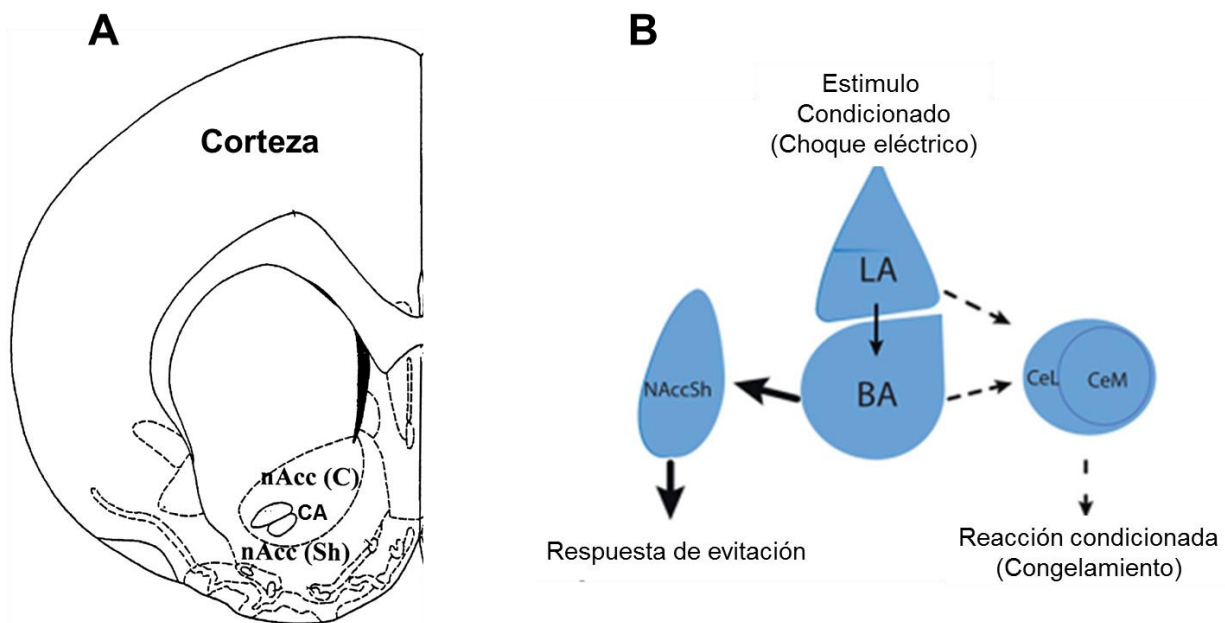


Figura 9. **A.** Esquema representativo de un corte coronal del cerebro de ratona donde se muestra la ubicación anatómica del núcleo accumbens (NAc). Modificado de Paxinos y Watson, (2005). **B.** Diagrama que sugiere el circuito reclutado para obtener la respuesta de evitación, la cual depende de que la conectividad entre la amígdala y NAc se encuentre intacta. NAccSh, Núcleo accumbens shell; LA, amígdala lateral; BA, amígdala basal; CeL, corteza entorrinal lateral; CeM, corteza entorrinal medial. Modificado de Ramirez, Moscarello, LeDoux y Sears, (2015).

Recientemente se ha observado que el NAc participa activamente en el procesamiento de información del estímulo aversivo (Ramirez et al., 2015). Un estímulo aversivo normalmente produce respuestas contrastantes, como congelamiento, escape o evitación, las cuales permiten que el sujeto tenga alguna influencia o control del impacto de la amenaza

ambiental. Las respuestas anteriormente mencionadas son procesadas en la amígdala lateral y basal (Choi, Cain, & LeDoux, 2010), las proyecciones de la amígdala basal hacia el NAc podría estar mediando la acción motivada de forma aversiva (Cain & LeDoux, 2007).

El silenciamiento de la actividad neuronal en el NAc interrumpe la conducta de evocación en una tarea de evitación activa, lo cual sugiere que el aprendizaje de la conducta de evitación, como en el caso de la evitación inhibitoria como de la evitación activa requiere que el circuito amígdala basal – núcleo accumbens se encuentre intacto (Ramirez et al., 2015).

5. El entrenamiento incrementado produce un efecto protector de la memoria

El entrenamiento incrementado se refiere a la situación en la que un individuo recibe un mayor número de sesiones de entrenamiento (sobrentrenamiento) o una mayor intensidad de estimulación aversiva (sobrerreforzamiento). El incremento del aprendizaje se mide mediante la resistencia a la extinción.

La extinción es la reducción de una respuesta condicionada cuando se omite el reforzador o estímulo condicionado durante las pruebas de retención. Entre mayor es la fuerza del aprendizaje, mayor es la resistencia a la extinción, es decir, la respuesta condicionada tardará más tiempo en desaparecer (Garín-Aguilar et al., 2012).

Se ha observado que si un sujeto es expuesto a un proceso de entrenamiento incrementado se genera un efecto protector de la memoria después de la exposición a tratamientos amnésicos durante la consolidación (Prado-Alcalá, Medina, Serafin Lopez, & Quirarte, 2012).

La administración de KCl, que produce una inactivación reversible, directamente en el núcleo caudado de gatos que fueron entrenados a presionar una palanca para obtener leche como recompensa produjo amnesia en los grupos que fueron entrenados con un bajo número de sesiones de entrenamiento; sin embargo, en los animales que fueron entrenados con un gran número de sesiones se observó una retención óptima equivalente al grupo control (Prado-Alcalá & Cobos-Zapiaín, 1979).

El bloqueo de los receptores colinérgicos en el estriado de ratas, inducido por la administración local de atropina unos minutos después del entrenamiento en la tarea de evitación inhibitoria, interfiere con la consolidación de la memoria provocando amnesia. Sin embargo, la administración de un estímulo aversivo de intensidad relativamente alta durante el entrenamiento produce una excelente retención independientemente del bloqueo colinérgico (Giordano & Prado-Alcalá, 1986). Unos años más tarde se confirmó este efecto (Díaz del Guante, Rivas-Arancibia, Quirarte, & Prado-Alcalá, 1990).

La microinyección de lidocaína en el estriado dorsal inmediatamente después del entrenamiento con baja intensidad de choque eléctrico en la tarea de evitación inhibitoria produjo un cuadro amnésico considerable en ratas; por otro lado, los animales entrenados con una intensidad de choque relativamente alta tuvieron una excelente retención de la memoria (Pérez-Ruiz & Prado-Alcalá, 1989; Salado-Castillo, 2011) (Fig. 10).

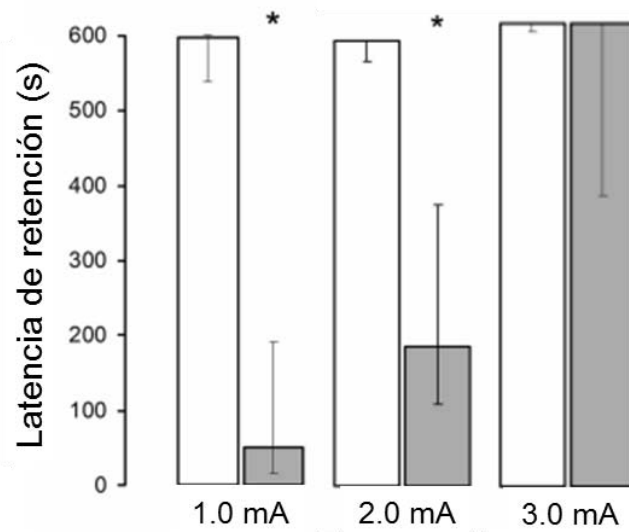


Figura 10. Efecto de la administración de lidocaína en el estriado anterodorsal, un minuto después del entrenamiento en la tarea de evitación inhibitoria. Se muestra la mediana de la latencia de retención con rangos intercuartiles. Las barras blancas ejemplifican los grupos a los que se les administró vehículo y las barras grises muestran los grupos a los que se les administró lidocaína. El asterisco muestra diferencias significativas vs el grupo vehículo. Modificado de Salado-Castillo et al., (2011).

Este mismo efecto protector producido por el sobreentrenamiento o sobrerreforzamiento sobre la interferencia farmacológica durante la consolidación de la memoria también se ha observado con la administración sistémica de escopolamina (Durán-Arévalo, Cruz-Morales, & Prado-Alcalá, 1990), p-cloranfetamina (Solana-Figueroa, Salado-Castillo, Quirarte, Galindo, & Prado-Alcalá, 2002) y cicloheximida (Díaz-Trujillo et al., 2009) en la tarea de evitación inhibitoria.

De igual forma, este fenómeno se ha observado aún después de la inactivación de diferentes estructuras cerebrales tales como el hipocampo (Garín-Aguilar et al., 2012; Quiroz et al., 2003), la sustancia nigra (Cobos-Zapiaín et al., 1996) y la amígdala (Parent, Tomaz, & McGaugh, 1992) e incluso con la inactivación simultanea de dos regiones: amígdala-sustancia nigra, amígdala-estriado y sustancia nigra-estriado (Salado-Castillo et al., 2011).

Estas evidencias sugieren que cuando la experiencia de entrenamiento es incrementada, estas estructuras (y probablemente otras adicionales) participan en el proceso de consolidación; sin embargo, en estas circunstancias, ninguna estructura en particular es esencial para el mantenimiento de este trazo mnemónico. Posiblemente se genera una activación en paralelo de estas regiones, de tal forma que si una o dos de estas estructuras cerebrales se ven alteradas en su funcionamiento, las otras áreas reclutadas mantienen este trazo de información fuertemente adquirida (Prado-Alcalá et al., 2006). Asimismo, ello podría sugerir que, ante una experiencia de entrenamiento incrementado, la consolidación de la memoria a nivel de sistemas se acelera, favoreciendo el reclutamiento e interacción entre las diversas estructuras cerebrales implicadas en el mantenimiento de la información de largo plazo.

Por otra parte, se ha planteado que, durante las etapas de la consolidación y la evocación de la memoria, se desencadena una serie de mecanismos moleculares como producción de ARNm de *novo*, síntesis de proteínas de *novo*, y activación de cascadas de señalización que pueden producir cambios estructurales en las neuronas de proyección de las diferentes estructuras asociadas a la formación de la memoria.

No obstante, actualmente se desconoce si el entrenamiento incrementado, el cual produce el efecto protector de la memoria genera un cambio en la densidad o morfología de las espinas dendríticas durante la consolidación y evocación de una memoria de evitación inhibitoria.

En esta tesis fue importante evaluar los cambios estructurales en tres etapas de la memoria, consolidación, memoria a largo plazo y evocación. A continuación, se plantea la pregunta de investigación que dio origen a este trabajo:

¿La consolidación, la memoria de largo plazo y/o la evocación de la memoria de la tarea de evitación inhibitoria, entrenada con un estímulo aversivo moderado e incrementado, producirán cambios en la densidad y/o morfología de las espinas dendríticas en las neuronas de proyección del estriado dorsal y el núcleo accumbens?

Con el fin de responder esta pregunta, se plantearon las siguientes hipótesis generales, las cuales se muestran de una forma más detallada en cada uno de los experimentos que se explicarán más adelante.

III. HIPÓTESIS GENERALES

1. La consolidación de la memoria, la memoria de largo plazo y la evocación de la memoria de evitación inhibitoria producirán un aumento en la ***densidad total*** de espinas dendríticas en el estriado dorsal.
2. La consolidación de la memoria, la memoria de largo plazo y la evocación de la memoria de evitación inhibitoria producirán un aumento en la ***proporción de espinas dendríticas tipo hongo*** en el estriado dorsal.
3. La consolidación de la memoria, la memoria de largo plazo y la evocación de la memoria de evitación inhibitoria producirán un aumento en la ***densidad total*** de espinas dendríticas en el núcleo accumbens.

4. La consolidación de la memoria, la memoria de largo plazo y la evocación de la memoria de evitación inhibitoria producirán un aumento en la **proporción de espinas dendríticas tipo hongo** en el núcleo accumbens.

IV. OBJETIVO GENERAL

Determinar si la consolidación de la memoria, la memoria de largo plazo y/o la evocación de la memoria de evitación inhibitoria, entrenada con un estímulo aversivo moderado o incrementado producirá cambios en la densidad y/o morfología de las espinas dendríticas en las neuronas de proyección del estriado dorsal y el núcleo accumbens.

V. MATERIAL Y MÉTODO GENERAL

Todos los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo a los lineamientos bioéticos del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México para el uso de animales experimentales, siguiendo las normas estipuladas en la “Guide for care and use of laboratory animals” del NIH (2011).

1. ANIMALES

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar, con un peso entre 250 y 300 g, las cuales fueron obtenidas en el bioterio del Instituto de Neurobiología, UNAM. Los animales fueron alojados en cajas individuales de acrílico (24 x 21 x 45 cm) con agua y comida *ad libitum*. Se mantuvieron en un cuarto sono-amortiguado con temperatura controlada entre 22 - 24°C y en un ciclo de luz/oscuridad de 12:00 horas (iniciando la luz a las 7:00 horas). Una vez que los animales se habituaron al vivario del laboratorio, fueron manipulados durante 1 sesión diaria de 5 minutos, en 3 días consecutivos.

2. TAREA DE EVITACIÓN INHIBITORIA

2.1 Aparato

La cámara de evitación inhibitoria (EI), está compuesta por dos compartimentos del mismo tamaño (30 cm x 30 cm x 30 cm) separados por una puerta deslizante. El compartimento de *seguridad* está iluminado por un foco de 10 watts colocado en la tapa del compartimento y tiene una rejilla en el piso. El compartimento de *castigo*, de 30 cm de longitud, es oscuro y sus paredes laterales de acero inoxidable tienen forma de V, las cuales llegan al piso del compartimento, estando separadas en este lugar por una distancia de 1.5 cm (justo a la mitad del compartimento) (Fig. 11).

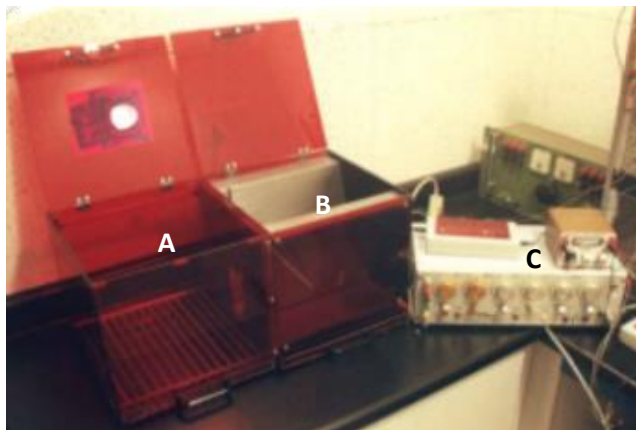


Figura 11. Cámara de evitación inhibitoria. A. Compartimento de seguridad (iluminado). B. Compartimento de castigo (oscuro). C. Estimulador.

Estas láminas pueden electrificarse con un estimulador de pulsos cuadrados (Grass Modelo No. S-48) acoplado a una unidad de corriente constante (Grass Modelo No.CCU-1A). La duración de la aplicación de los estímulos, las latencias de entrada, escape y retención fueron medidas automáticamente con ayuda de una computadora. La cámara de evitación inhibitoria está ubicada en un cuarto sonoamortiguado.

2.2 Entrenamiento

La rata fue colocada en el compartimento de seguridad, y 10 s después se abrió la puerta deslizante; una vez que el animal pasó al compartimento de castigo se cerró la puerta y se administró un choque eléctrico de 1.0 mA o 3.0 mA durante 10 s. Transcurridos 5 s después del inicio de la administración del choque se abrió la puerta, permitiendo al sujeto escapar al compartimento de seguridad en donde permaneció durante 30 s antes de ser regresado a su caja-habitación. Se registró el tiempo transcurrido entre la colocación de la rata en el compartimento de seguridad y el momento en el que ingresó al compartimento de castigo (latencia de entrada), así como el tiempo en que tardó en pasar del compartimento de castigo al de seguridad durante la administración del choque eléctrico (latencia de escape).

2.3 Prueba de retención

Las mediciones de la retención fueron realizadas 6 h (consolidación) o 24 h (memoria de largo plazo) después del entrenamiento. Se registró el tiempo transcurrido entre la apertura de la puerta y el momento en el que la rata pasó completamente al compartimento de castigo (latencia de retención). Las condiciones de la sesión de retención son las mismas que las descritas para la sesión de entrenamiento, excepto que no se administró el choque eléctrico. Esta sesión se dio por terminada una vez que la rata pasó al compartimento de castigo o transcurrieron 600 s.

2.4 Extinción

La medición de la extinción se inició 24 h después del entrenamiento, siguiendo el mismo procedimiento de la sesión de la prueba de retención. Se realizaron 7 ensayos de extinción por cada grupo experimental, una sesión por día, en 7 días consecutivos.

3. ANÁLISIS HISTOLÓGICO

3.1 Obtención de tejidos cerebrales

Una vez terminado el procedimiento conductual las ratas fueron inyectadas con sobredosis de pentobarbital sódico y fueron perfundidas intracardiamente con solución salina al 0.9% (v/v). Los cerebros fueron removidos y colocados en la solución Golgi-Cox (Robinson & Kolb, 1997).

3.2 Tinción de Golgi-Cox

Los cerebros de las ratas fueron colocados en la solución Golgi-Cox (esta solución contiene $K_2Cr_2O_7$, $HgCl_2$ y K_2CrO_4). El tejido cerebral se dejó en la oscuridad y a temperatura ambiente por un periodo de 30 días (con un cambio de solución una vez transcurrida la primera semana de incubación). Pasado el tiempo, se eliminó el exceso de la solución y se colocaron en una solución de sacarosa al 30% (w/v) durante 3 días. Posteriormente los cerebros fueron cortados en un vibratomo. Se obtuvieron cortes coronales de 200 μm , los cuales fueron colocados en portaobjetos gelatinizados (con gelatina al 4%) y fijados por presión. Posteriormente, los portaobjetos que contienen los cortes fueron colocados en un tren de revelado (en oscuridad), el cual inicia con una incubación de hidróxido de amonio (30 min), un lavado con agua destilada (1 min), solución fijadora Kodak (30 min), un lavado con agua destilada (1 min), alcohol etílico al 70, 90 y 100% (10 min cada uno) y xileno (1 h). Finalmente, se colocaron cubreobjetos sobre las preparaciones utilizando resina como medio de montaje. Cada portaobjeto contuvo seis cortes cerebrales que incluyeron el estriado dorsal y núcleo accumbens. A cada laminilla se le asignó un número aleatorio con el fin de hacer el análisis morfométrico en ciego.

4. ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

Para hacer el análisis morfológico, de cada grupo se seleccionaron cuatro animales que presentaron una latencia de retención mayor al 85%. Se estudiaron neuronas medianas espinosas del estriado dorsomedial y dorsolateral (anteroposterior 1.56 mm to 0.12 mm con respecto a Bregma) y del núcleo accumbens core y shell (anteroposterior 1.92 mm to 0.72 mm con respecto a Bregma) (Paxinos & Watson, 2005) (Fig. 12).

Las MSNs estriatales reciben eferencias glutamatérgicas, serotoninérgicas, dopaminérgicas y colinérgicas. Las aferencias glutamatérgicas corticales, talámicas y límbicas promueven cambios en la densidad y modulan los cambios en la morfología de las espinas dendríticas en la región distal de las dendritas (Gerfen, 1988).

Las MSNs fueron identificadas por el tamaño del soma (diámetro 11 a 20 μm), el número de ramificaciones dendríticas (> 5 ramificaciones) y su numerosa cantidad de espinas. La cuantificación de las espinas dendríticas se hizo en una sola dendrita secundaria en cada neurona, en un segmento de 30 μm , que se encuentra a una distancia de 130 μm del soma. Estos criterios específicos permiten reducir la varianza de las mediciones.

Las espinas dendríticas fueron clasificadas en cinco diferentes tipos: **larga** (la longitud del cuello es mayor que el diámetro de cuello; el diámetro de la cabeza y el cuello es similar), **hongo** (el diámetro de la cabeza es mucho mayor que el diámetro del cuello), **corta** (el diámetro del cuello es similar a la longitud total de la espina), **bifurcada** (espinas con dos cabezas derivadas del mismo cuello) (Harris et al., 1992) y **multi-cabeza** (espinas con tres o más cabezas) (Comery, Shah, & Greenough, 1995; Robinson & Kolb, 1997) (Fig. 12).

En el análisis se encontró un pequeño número de espinas dendríticas (< 10 %) que no pertenecían a ninguna de las categorías anteriormente descritas. En ninguno de los experimentos se encontraron diferencias significativas entre los grupos con respecto a este tipo de espina, por lo que sus datos no fueron graficados.

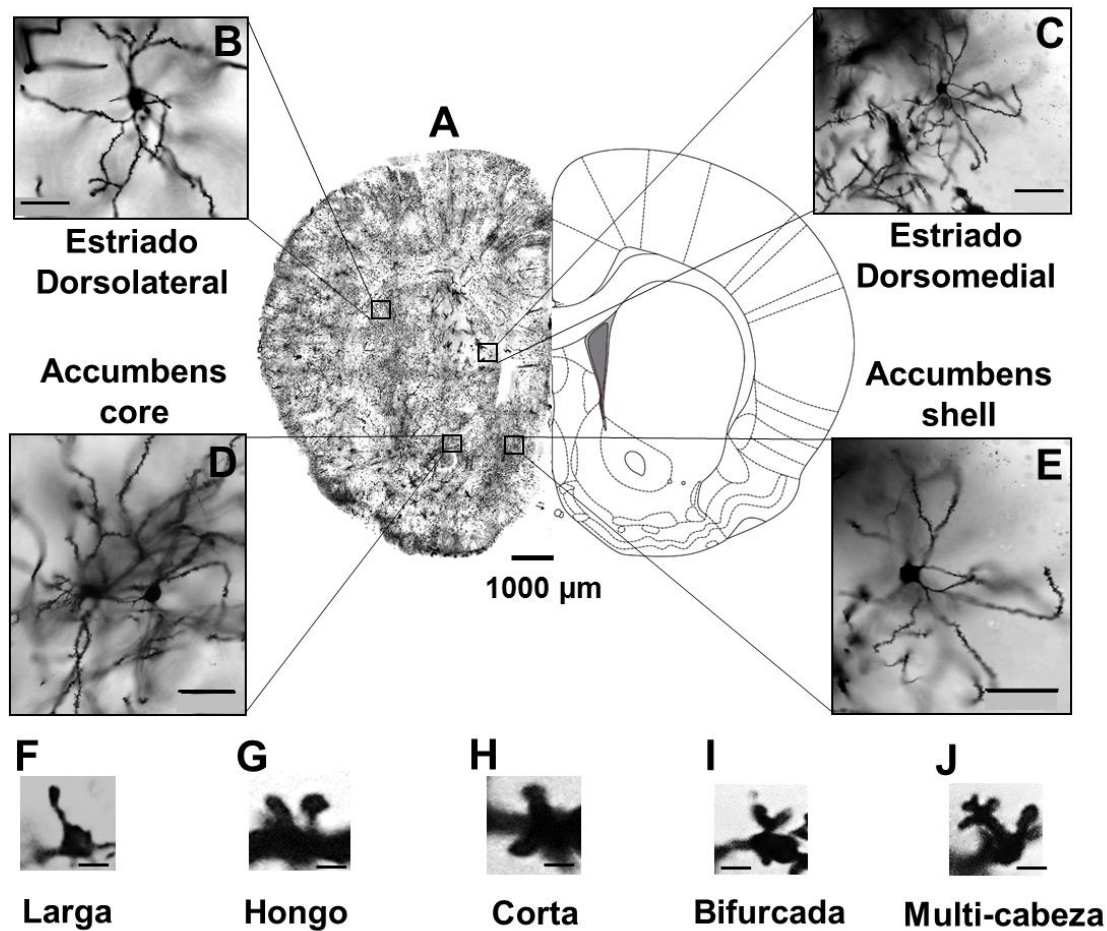


Figura 12. Análisis morfométrico. **A.** Corte coronal impregnado con la tinción Golgi-Cox. En los recuadros se hace un acercamiento de una MSN representativa para cada una de las cuatro regiones analizadas. **B.** Estriado dorsolateral; **C.** Estriado dorsomedial; **D.** Accumbens core y **E.** Accumbens shell (40x, AN 0.8). Barra de escala 50 μm . También se muestran microfotografías de diferentes tipos de espinas que fueron analizadas: **F.** Larga; **G.** Hongo; **H.** Corta; **I.** Bifurcada y **J.** Multi-cabeza (100x, 1.25 AN). Barra de escala 2 μm .

El análisis morfométrico se realizó en un microscopio Leica, utilizando el objetivo de 100x (Plan-Apochromat, AN 1.25). La densidad total de las espinas dendríticas por región fue expresada como el promedio de las espinas dendríticas encontradas en el segmento de 30 μm en 10 neuronas por cada animal. Por otro lado, la cuantificación de las espinas dendríticas de acuerdo a su forma fue expresada como la proporción de la espina en particular, es decir, el número de espinas dendríticas de cada forma/número total de espinas dendríticas en el segmento de 30 μm . Este análisis se hizo de esta manera con el fin de

observar cambios potenciales en la dinámica de la formación de las espinas dendríticas en cada una de las condiciones experimentales.

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

5.1 Conducta

Para el análisis de los resultados conductuales se utilizó estadística no paramétrica, debido a que las latencias de retención no tienen una distribución normal porque se estableció un corte arbitrario de 600 s. Con la prueba de análisis de varianza de Kruskal-Wallis se compararon, en forma independiente, las latencias de entrada, escape y retención, y en el caso en el que se encontraron diferencias significativas se utilizó la prueba de U de Mann-Whitney para hacer comparaciones entre pares de grupos.

En el experimento en el cual se realizó la extinción de la tarea de evitación inhibitoria, para cada grupo se utilizó una prueba de Friedman para analizar las latencias de retención a lo largo del tiempo, durante los siete ensayos evaluados. En el caso en el que se encontraron diferencias significativas se utilizó la prueba de Wilcoxon para comparar dos ensayos entre sí en cada grupo. Con el fin de hacer comparaciones entre los tres grupos en cada sesión de extinción se utilizó la prueba Kruskal-Wallis, y en el caso en el que se encontraron diferencias significativas se utilizó la prueba U de Mann-Whitney para comparar entre pares de grupos.

5.2 Histología

Con el fin de determinar las diferencias en la densidad de espinas dendríticas se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una o dos vías según sea el caso. También se hizo el mismo análisis en los posibles cambios en la proporción de los tipos de las espinas dendríticas. En cada uno de los experimentos desarrollados se especifica el tipo de análisis utilizado. Cuando el análisis de varianza fue significativo se utilizó el post-hoc de Bonferroni para comparar los grupos experimentales.

VI. EXPERIMENTO 1: Cambios estructurales producidos durante la consolidación de la memoria y la memoria de largo plazo de la tarea de evitación inhibitoria moderada o sobrerreforzada, en el estriado dorsal y núcleo accumbens

1. Hipótesis

1.1 Habrá un aumento en la **densidad total** de espinas dendríticas en las MSNs del **estriado dorsal** durante la consolidación de la memoria y/o memoria de largo plazo asociado al sobrerreforzamiento en comparación con el entrenamiento moderado en la tarea de evitación inhibitoria.

1.2 Habrá un aumento en la **proporción de las espinas tipo hongo** en las MSNs del **estriado dorsal** durante la consolidación de la memoria y/o memoria de largo plazo asociado al sobrerreforzamiento en comparación con el entrenamiento moderado en la tarea de evitación inhibitoria.

1.3 Habrá un aumento en la **densidad total** de espinas dendríticas en las MSNs **núcleo accumbens** durante la consolidación de la memoria y/o memoria de largo plazo asociado al estímulo aversivo en la tarea de evitación inhibitoria.

1.4 Habrá un aumento en la **proporción de las espinas tipo hongo** en las MSNs del **estriado dorsal** durante la consolidación de la memoria y/o memoria de largo plazo asociado al estímulo aversivo en la tarea de evitación inhibitoria.

1.5 Habrá una disminución en la **densidad total** de las espinas dendríticas en las MSNs del **estriado dorsal** observadas **24 horas** en comparación a aquellas observadas 6 horas después del entrenamiento de la tarea de evitación inhibitoria moderada y/o sobrerreforzada.

1.6 Habrá una disminución en la **densidad total** de las espinas dendríticas en las MSNs del **núcleo accumbens** observadas **24 horas** en comparación a aquellas observadas 6 horas después del entrenamiento de la tarea de evitación inhibitoria moderada y/o sobrerreforzada.

2. Objetivos

2.1 Evaluar si las intensidades de choque eléctrico administrados durante la tarea de evitación inhibitoria producen un aprendizaje moderado e incrementado.

2.2 Cuantificar la densidad total de las espinas dendríticas de las MSNs producidas en el estriado dorsal durante la consolidación de la memoria y la memoria de largo plazo en la tarea de evitación inhibitoria moderada y sobrerreforzada.

2.3 Cuantificar la densidad total de las espinas dendríticas de las MSNs producidas en el núcleo accumbens durante la consolidación de la memoria y la memoria de largo plazo en la tarea de evitación inhibitoria moderada y sobrerreforzada.

2.4 Calcular la proporción de las espinas dendríticas tipo larga, corta, hongo, bifurcada y multi-cabeza producidas en el estriado dorsal durante la consolidación de la memoria y la memoria de largo plazo en la tarea de evitación inhibitoria moderada y sobrerreforzada.

2.5 Calcular la proporción de las espinas dendríticas tipo larga, corta, hongo, bifurcada y multi-cabeza producidas en el núcleo accumbens durante la consolidación de la memoria y la memoria de largo plazo en la tarea de evitación inhibitoria moderada y sobrerreforzada.

3. Método y diseño experimental

Con el fin de determinar la intensidad de choque eléctrico que produzca un entrenamiento moderado y un entrenamiento sobrerreforzado, se realizó un experimento

para medir la resistencia a la extinción causada por el sobrerreforzamiento en la tarea de evitación inhibitoria.

Se utilizaron 30 ratas macho de la cepa wistar, las cuales fueron manipuladas durante tres días consecutivos, y 24 h después de la última manipulación, fueron entrenadas en la tarea de evitación inhibitoria. Las ratas fueron asignadas de forma aleatoria a tres grupos experimentales: en el primer grupo, las ratas fueron entrenadas sin choque eléctrico (0.0 mA; n = 10), en el segundo grupo fueron entrenadas con un choque eléctrico moderado (1.0 mA; n = 10) y en el tercer grupo las ratas fueron entrenadas con un choque eléctrico alto (3.0 mA; n = 10). La latencia de retención fue evaluada 24 h después del entrenamiento y así sucesivamente durante siete días consecutivos (Fig. 13).

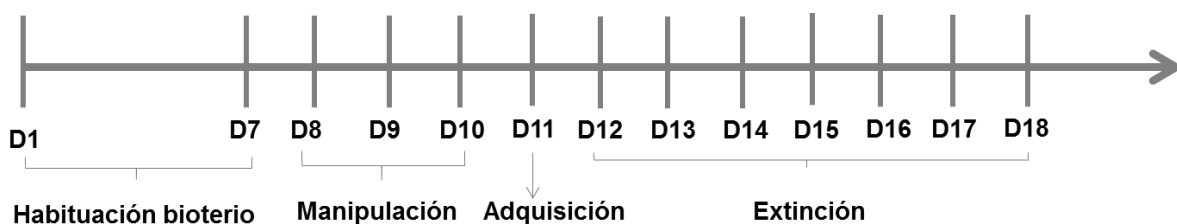
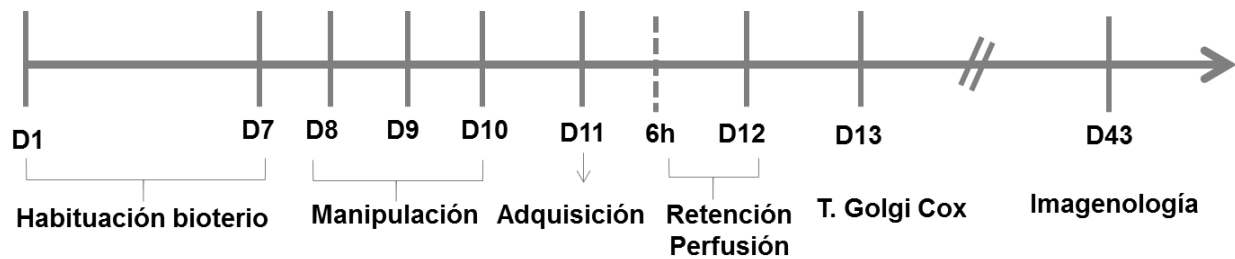


Figura 13. Línea temporal, en donde se especifica el orden y la temporalidad del experimento de extinción.

En la segunda parte del experimento, en la cual se cuantificaron las espinas dendríticas tanto en las MSNs del estriado dorsal como del núcleo accumbens durante la consolidación y la memoria a largo plazo, se utilizaron 72 ratas macho de la cepa wistar. Las ratas fueron distribuidas en nueve grupos experimentales: Dos grupos de ratas fueron entrenadas en la tarea de evitación inhibitoria con un choque eléctrico de 1.0 (1.0 mA; n = 20) o 3.0 mA (3.0 mA; n = 20); con el fin de tener un grupo que únicamente sea expuesto al contexto, el tercer grupo fue entrenado sin administrarles choque eléctrico (0.0 mA; n = 20); a el cuarto grupo se le administró la intensidad más alta de choque eléctrico únicamente en el compartimento oscuro (Sch; n = 8), el choque de 3.0 mA fue administrado durante 5.6 s, este tiempo es equivalente al tiempo que recibieron el choque el grupo entrenado con 3.0 mA.

La mitad de los animales de cada grupo fueron sometidos a la prueba de retención 6 h o 24 h después del entrenamiento e inmediatamente después fueron perfundidos (Fig. 14). Por último, el quinto grupo de ratas no fueron sometidos a ninguna experiencia, únicamente

permanecieron en condiciones de bioterio (INT; n = 4) hasta el procedimiento de la perfusión, el cual ocurrió en el mismo tiempo en el que se perfundieron los animales de los demás grupos.



Intacto (INT) n = 4	Solo choque 3.0 mA (Sch) n=8		Contexto: 0.0 mA (0mA) n=20		Moderado: 1.0 mA (1mA) n=20		Sobrerreforzado: 3.0 mA (3mA) n=20	
Prueba n conducta	-- n = 4	-- n = 4	6h n = 10	24h n = 10	6h n = 10	24h n = 10	6h n = 10	24h n = 10
n histología	n = 4							
Sacrificio	6h	24h	Inmediatamente después de la prueba de memoria					

Figura 14. Diseño experimental experimento 1. En la parte superior se muestra la línea temporal del desarrollo del experimento, en donde se especifica el orden de cada una de las etapas del experimento 1. En la parte inferior se observa el diseño experimental y n utilizada en cada uno de los grupos experimentales.

Para el análisis histológico, se seleccionaron cuatro ratas de cada grupo experimental (entrenados en la tarea de evitación inhibitoria con 1.0 mA o 3.0 mA); el criterio de selección se basó en la ejecución de la conducta de cada una de las ratas, y sólo se incluyeron ratas con latencia de retención superior a 500 s.

Los cerebros obtenidos fueron teñidos con la tinción Golgi-Cox; se hicieron cortes coronales de 200 μm de grosor y se visualizaron con un objetivo de 100x. Se analizó un total de 1440 neuronas: 5 neuronas por hemisferio x 4 regiones cerebrales x 9 grupos experimentales x 4 ratas por grupo. Se cuantificaron las espinas dendríticas tipos larga, hongo, corta, bifurcada y multi-cabeza. Se calculó la densidad total de las espinas dendríticas y la proporción de cada tipo de espina dendrítica el número de espinas dendríticas de cada forma/número total de espinas dendríticas en el segmento de 30 μm .

El análisis estadístico para la conducta se realizó como se describe en el MÉTODO GENERAL. Para el análisis estadístico de la densidad total y la proporción de cada tipo de espina dendrítica, se utilizó una ANOVA de una vía por cada intervalo temporal (6 h o 24 h) en donde se compararon los grupos INT, Sch, 0.0 mA, 1.0 mA y 3.0 mA. También se utilizó una ANOVA de dos vías con el fin de identificar diferencias significativas entre las 6 h y 24 h, en cada uno de los grupos experimentales, excluyendo el grupo INT.

4. Resultados

4.1 Conducta

En la latencia de retención medida durante la extinción de la tarea de evitación inhibitoria entrenada sin choque eléctrico (grupo 0.0 mA), la prueba de Friedman no mostró diferencias significativas entre las siete sesiones ($X^2_{(6)} = 5.014$; $p = 0.5420$). Sin embargo, si la tarea fue entrenada con el choque eléctrico de 1.0 mA ($X^2_{(6)} = 55.254$; $p < 0.0001$) o 3.0 mA ($X^2_{(6)} = 33.214$; $p < 0.0001$), se encontraron diferencias significativas entre los siete ensayos.

Cuando la tarea de evitación inhibitoria fue entrenada con un choque eléctrico de 1.0 mA, la prueba de Wilcoxon muestra que el ensayo 1 (E1) es diferente al E2, E3, E4, E5, E6 y E7 (p 's < 0.05 a < 0.001). Sin embargo, el E6 no difiere del E7 ($p = 0.6465$) (Fig. 15A). Si el choque eléctrico utilizado fue el de 3.0 mA, no se encontraron diferencias significativas entre el E1 y los E2, E3, E4, E5, pero si difiere del E6 ($p = 0.0117$) y E7 ($p = 0.0051$) (Fig. 15A).

La prueba Kruskal-Wallis mostró diferencias significativas entre grupos en el E1 de extinción ($H_{(2)} = 19.935$, $p < 0.0001$). La U de Mann-Whitney reveló diferencias significativas entre los grupos 0.0 mA y 1.0 mA ($p = 0.0002$), de igual forma entre los grupos 0.0 mA y 3.0 mA ($p = 0.0002$), pero no hubo diferencias entre los grupos 1.0 mA y 3.0 mA ($p = 0.2568$). En los E2, E3, E4, E5 y E6 todos los grupos experimentales difieren entre sí (p 's < 0.05 a < 0.001). En el ensayo de extinción 7, la Kruskal-Wallis mostró diferencias significativas entre grupos ($H_{(2)} = 22.338$, $p < 0.0001$). La prueba U de Mann-Whitney mostró diferencias significativas entre los grupos 0.0 mA y 3.0 mA ($p = 0.0002$), 1.0 mA y 3.0 mA ($p = 0.0002$); pero no se encontraron diferencias entre los grupos 0.0 mA y 1.0 mA ($p = 0.6960$) (Fig. 15A).

Estos resultados muestran una mayor resistencia a la extinción en los animales entrenados con el choque eléctrico más alto en comparación con los animales entrenados con el choque eléctrico bajo; este mismo fenómeno fue reportado previamente (Garín-Aguilar et al., 2012). Con estos resultados se pudo comprobar que el choque eléctrico moderado es el de 1.0 mA y el choque eléctrico incrementado es el de 3.0 mA. Estas dos intensidades de choque eléctrico se utilizaron en los siguientes experimentos.

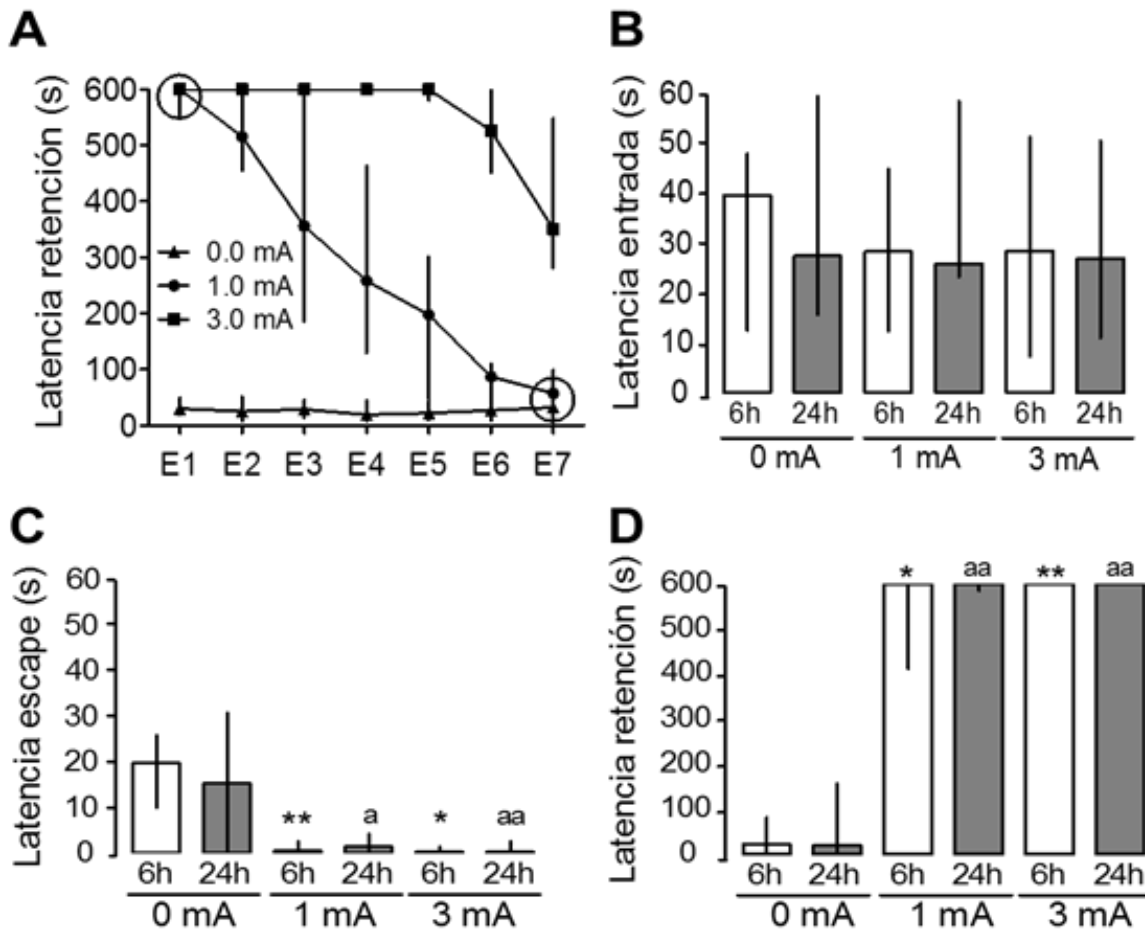


Figura 15. Resultados conductuales en la tarea de evitación inhibitoria. **A.** Latencia de retención a lo largo de las diferentes sesiones de extinción (Ext 1- Ext 7) en grupos entrenados con un choque de 0.0 mA, 1.0 mA y 3.0 mA en la tarea de evitación inhibitoria. En todas las sesiones de extinción las latencias de retención difieren entre grupos, excepto por los dos puntos en donde están los círculos. **B.** Latencia de entrada de grupos de ratas entrenados en la tarea de evitación inhibitoria. **C.** Latencia de escape. **D.** Latencia de retención evaluada 6 h (barras blancas) o 24 h (barras grises) después de la sesión de entrenamiento. Todas las mediciones se muestran en medianas con rangos intercuartiles. * $p < 0.001$, ** $p < 0.0001$ vs el grupo 0mA-6 h. ^a $p < 0.001$, ^{aa} $p < 0.0001$ vs el grupo 0mA- 24 h. Tamaño de muestra, $n = 10$ por grupo.

En el análisis conductual realizado a los animales de la segunda parte del experimento la prueba Kruskal-Wallis mostró que no hay diferencias significativas en las latencias de entrada al compartimento oscuro durante la adquisición de la tarea entre los grupos que recibieron 0.0 mA, 1.0 mA y 3.0 mA (6 h, $H_{(2)} = 2.552$, $p = 0.2792$ o 24 h, $H_{(2)} = 0.6299$, $p = 0.7298$) (Fig. 15B).

En las latencias de escape se encontraron diferencias significativas entre los grupos que más tarde fueron evaluados a las 6 h después del entrenamiento ($H_{(2)} = 19.56$, $p < 0.0001$), la prueba U de Mann Whitney mostró que el grupo 0.0 mA tuvo latencias de escape significativamente mayores que los grupos 1.0 mA ($p = 0.0002$) y 3.0 mA ($p = 0.0002$); mientras que estos últimos grupos no difieren estadísticamente entre sí ($p = 0.9612$) (Fig. 15C). Los mismos resultados fueron encontrados cuando se compararon las latencias de escape entre los animales que fueron probados 24 h después del entrenamiento ($H_{(2)} = 16.49$, $p = 0.0003$). El grupo 0.0 mA difiere estadísticamente del grupo 1.0 mA ($p < 0.001$) y 3.0 mA ($p < 0.001$), pero no difieren entre sí los grupos 1.0 mA y 3.0 mA (Fig. 15C).

Estas diferencias significativas encontradas entre los animales que fueron entrenados en ausencia del choque eléctrico y aquellos que fueron estimulados con 1.0 mA y 3.0 mA, se deben a que los animales que recibieron choque eléctrico durante el entrenamiento estaban motivados a escapar del compartimento en el que se les administraba el estímulo aversivo hacía el compartimento de seguridad.

En la prueba de retención evaluada 6 h ($H_{(2)} = 24.03$, $p < 0.0001$) o 24 h ($H_{(2)} = 26.02$, $p < 0.0001$) después del entrenamiento se encontraron diferencias significativas entre los grupos. Cuando la prueba de retención fue ejecutada 6 h después del entrenamiento, la prueba U de Mann-Whitney mostró que las latencias de retención del grupo 0.0 mA fue significativamente menor en comparación con los grupos con los grupos 1.0 mA ($p < 0.0001$) y 3.0 mA ($p < 0.0001$); sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos 1.0 mA y 3.0 mA ($p = 0.350$) (Fig. 15D).

Resultados similares fueron encontrados cuando se hicieron las comparaciones en las latencias de retención evaluada 24 h después del entrenamiento ($H_{(2)} = 26.02$, $p < 0.0001$). El grupo 0.0 mA difiere de los grupos 1.0 mA ($p < 0.0001$) y 3.0 mA ($p < 0.0001$). El grupo 1.0 mA no es estadísticamente diferente del grupo 3.0 mA (Fig. 15D).

Tampoco se encontraron diferencias significativas entre los animales que evocaron la memoria de evitación inhibitoria 6 h o 24 h después del entrenamiento, cuando fueron entrenados sin choque eléctrico (0.0 mA) ($p = 0.7913$), con choque eléctrico de 1.0 mA ($p = 0.1012$) o 3.0 mA ($p > 0.9999$) (Fig. 15D).

4.2 Densidad total de espinas dendríticas de las MSNs del estriado dorsal y núcleo accumbens

En la figura 12 se muestra un ejemplo del estriado dorsal (dorsolateral y dorsomedial) y ventral (núcleo accumbens core y shell) teñidos con la técnica Golgi-Cox; cada región tiene un acercamiento en el que se muestra una neurona mediana espinosa representativa; también se muestra los diferentes tipos de espinas dendríticas que fueron cuantificados (larga, hongo, corta, bifurcada y multi-cabeza).

Con el fin de determinar si la población de espinas dendríticas en condiciones basales fue diferente entre las diferentes regiones del estriado, se hizo un análisis de la densidad de espinas en el EDL, EDM, NAcC y NAcS en el grupo intacto. El análisis de varianza muestra que hubo diferencias significativas entre las cuatro regiones ($F_{(3,15)} = 5.62$, $p < 0.05$). La prueba post-hoc de Bonferroni mostró que el NAcC tiene una densidad de espinas dendríticas significativamente mayor (18.84 ± 2.26) que NAcS (15.56 ± 0.67), EDM (15.13 ± 1.44) y el EDL (14.95 ± 1.38) ($p < 0.05$ en cada comparación). Sin embargo, no hay diferencias significativas entre las tres últimas regiones. El resultado encontrado, que la densidad de espinas dendríticas en el NAcC fue mayor que la densidad de espinas dendríticas en el NAcS fue reportado previamente (Meredith, Agolia, Arts, Groenewegen y Zahm, 1992).

4.2.1 Estriado dorsolateral

Los cambios en la densidad de espinas dendríticas durante la consolidación (6 h; ANOVA, $F_{(4,15)} = 18.206$, $p < 0.0001$) en las MSNs fueron significativamente diferentes entre grupos. El post-hoc de Bonferroni mostró que el grupo intacto no difiere del grupo solo choque ($p > 0.05$). El grupo intacto fue significativamente menor que los grupos 0.0 mA ($p =$

0.0314), 1.0 mA ($p = 0.0030$) y 3.0 mA ($p < 0.0001$); el grupo solo choque tuvo menor cantidad de espinas dendríticas que los grupos 0.0 mA ($p < 0.05$), 1.0 mA ($p < 0.005$) y 3.0 mA ($p < 0.0001$). El grupo 0.0 mA no difiere del grupo 1.0 mA ($p = 0.3298$), pero el grupo 0.0 mA y 1.0 mA tiene una menor densidad de espinas que el grupo 3.0 mA ($p < 0.0001$ para cada comparación) (Fig. 16A).

También se encontraron diferencias significativas en la densidad de las espinas dendríticas 24 horas después del entrenamiento (ANOVA, $F_{(4,15)} = 7.676$, $p = 0.0014$). No se encontraron diferencias significativas entre los grupos intacto y solo choque ($p = 0.4355$). El grupo intacto tiene menor densidad de espinas dendríticas que los grupos 0.0 mA ($p = 0.0410$), 1.0 mA ($p = 0.0056$) y 3.0 mA ($p < 0.0001$). El grupo solo choque, 0.0 mA, 1.0 mA no difieren entre ellos; pero tienen menor densidad de espinas que el grupo 3.0 mA (p 's < 0.0005 , 0.01 y 0.05 respectivamente) (Fig. 16A).

El análisis de varianza ANOVA de dos vías (grupo x intervalo de retención) muestra que no hay una interacción significativa entre las dos variables ($F_{(3,24)} = 0.09$, $p = 0.97$).

4.2.2 Estriado dorsomedial

Se encontraron cambios significativos en la densidad de espinas dendríticas durante la etapa de la consolidación de la memoria, es decir, 6 h después del entrenamiento de la tarea de evitación inhibitoria ($F_{(4,15)} = 21.120$, $p < 0.0001$). La prueba post-hoc Bonferroni revela que el grupo intacto no difiere del grupo solo choque ($p = 0.2973$). Por otro lado, los grupos 0.0 mA ($p = 0.0334$), 1.0 mA ($p = 0.0006$) y 3.0 mA ($p < 0.0001$) muestran un incremento significativo en la densidad de espinas dendríticas en comparación con el grupo intacto. El grupo 3.0 mA tiene una densidad de espinas mayor que los grupos solo choque ($p < 0.0001$), 0.0 mA ($p < 0.0001$) y 1.0 mA ($p = 0.0014$). El grupo 1.0 mA tiene una mayor densidad de espinas que el grupo solo choque ($p < 0.05$) (Fig. 16B).

También se encontró un patrón similar en los cambios en la densidad de las espinas dendríticas, 24 h después del entrenamiento (memoria de largo plazo) ($F_{(4,15)} = 15.93$, $p < 0.0001$). El post-hoc de Bonferroni mostró que el grupo intacto no es diferente del grupo solo choque ($p = 0.3414$), mientras en los grupos 0.0 mA ($p = 0.0272$), 1.0 mA ($p = 0.0002$) y 3.0 mA ($p < 0.0001$) se observó un incremento significativo en la densidad de espinas en

comparación con el grupo intacto. El grupo entrenado con el choque eléctrico de 3.0 mA tiene una mayor densidad de espinas que el grupo solo choque ($p < 0.0001$) y 0.0 mA ($p = 0.0005$).

El análisis de varianza ANOVA de dos vías (grupo x intervalo de retención) muestra que no hay una interacción significativa entre las dos variables ($F_{(3,24)} = 1.73$, $p = 0.19$) indicando que no hay diferencias entre 6 h y 24 en ninguna de las condiciones experimentales (Fig. 16B).

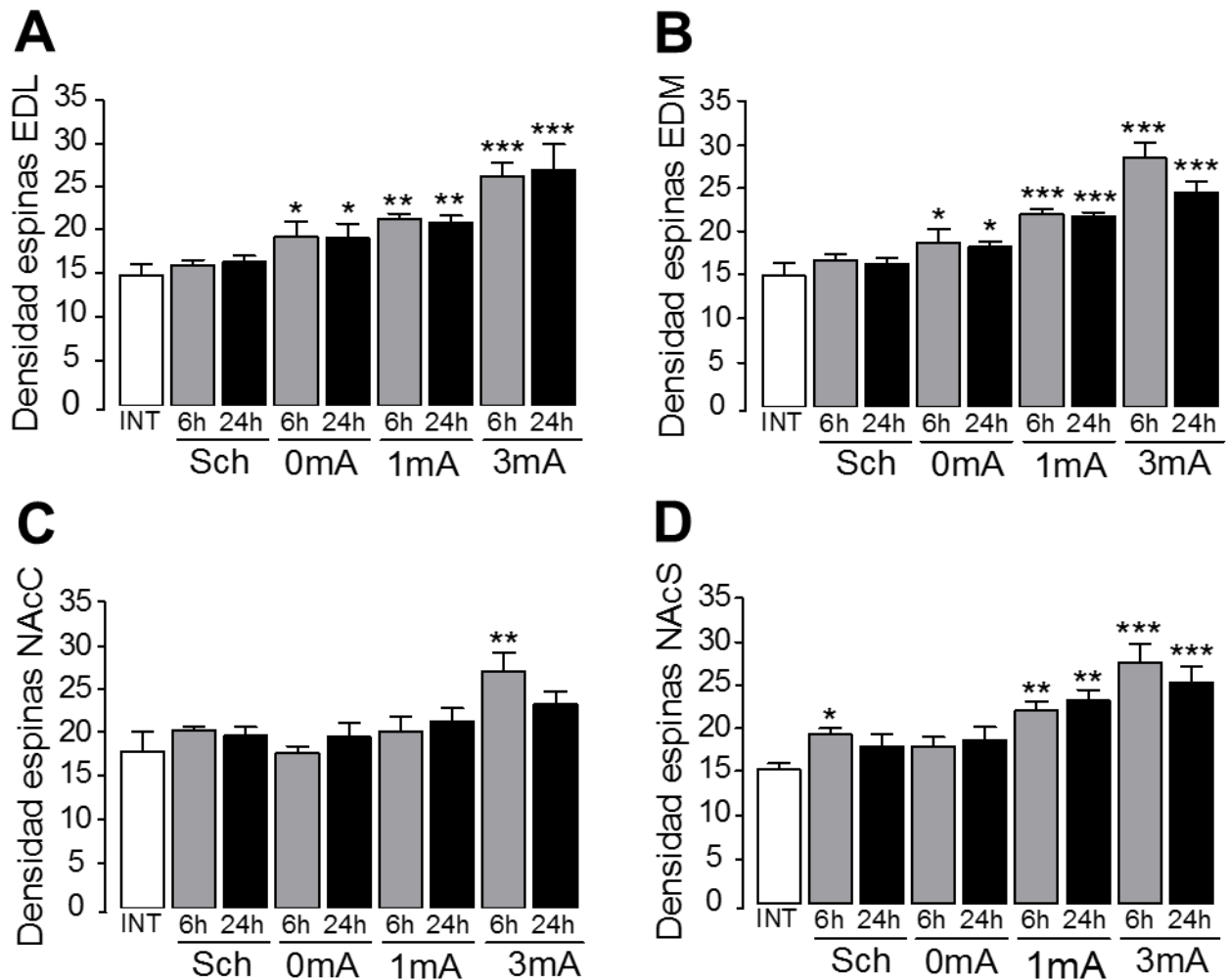


Figura 16. Densidad total de espinas dendríticas en el estriado dorsal y ventral observadas durante la consolidación (6 h; barras grises) y la memoria de largo plazo (24 h; barras negras). **A.** Estriado dorsolateral; **B.** Estriado dorsomedial; **C.** Núcleo accumbens core; **D.** Núcleo accumbens shell. INT, intacto (barras blancas); Sch, Solo choque de 3.0 mA; 0mA, 1mA y 3mA, grupos entrenados con choque eléctrico de 0.0 mA, 1.0 mA y 3.0 mA respectivamente. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$ vs INT. Cada barra representa el promedio \pm error estándar de 40 MSNs, obtenidas de cuatro ratas en cada condición.

4.2.3 Núcleo accumbens core

Hay diferencias significativas en la densidad de espinas dendríticas en el intervalo de retención de 6 h ($F_{(4,15)} = 5.49$, $p < 0.01$). La prueba de Bonferroni muestra que la densidad de espinas en el grupo 3.0 mA fue significativamente mayor que los grupos intacto ($p = 0.0011$), solo choque ($p = 0.0095$), 0.0 mA ($p = 0.0010$) y 1.0 mA ($p = 0.0089$). Comparaciones estadísticas entre los grupos restantes no fueron significativas (Fig. 16C).

Los cambios en la densidad total de espinas en la memoria de largo plazo evaluada a las 24 h no fue estadísticamente significativas ($F_{(4,15)} = 1.61$, $p = 0.22$) (Fig. 16C).

LA ANOVA de dos vías (grupo x intervalo de retención), muestra que no hay diferencias significativas entre estas dos variables en ninguno de los grupos experimentales ($F_{(3,24)} = 1.56$, $p = 0.23$) (Fig. 16C).

4.2.4 Núcleo accumbens shell

La densidad de espinas dendríticas cambió significativamente entre los grupos durante la consolidación de la memoria ($F_{(4,15)} = 14.65$, $p < 0.0001$). No se encontraron diferencias significativas entre los grupos intacto y 0.0 mA ($p = 0.1476$); pero el grupo intacto tuvo una menor densidad de espinas que los grupos solo choque ($p = 0.0337$), 1.0 mA ($p = 0.0014$) y 3.0 mA ($p < 0.0001$); el grupo solo choque tiene menor densidad de espinas que el grupo 3.0 mA ($p < 0.0001$), 0.0 mA tuvo menor densidad de espinas que 1.0 mA ($p = 0.0301$) y 3.0 mA ($p < 0.0001$); el grupo 3.0 mA tuvo más espinas que 1.0 mA ($p = 0.0062$). Por último, las comparaciones entre los grupos solo choque y 0.0 mA ($p = 0.4302$), y entre solo choque y 1.0 mA ($p = 0.1340$) no presentaron diferencias significativas (Fig. 16D).

En el intervalo de retención 24 h, la ANOVA también mostró diferencias significativas entre grupos ($F_{(4,15)} = 8.38$, $p < 0.001$). La prueba post-hoc muestra que el grupo intacto no difiere del grupo solo choque ($p = 0.2110$) y 0.0 mA ($p = 0.1105$); pero presentó menor densidad de espinas que 1.0 mA ($p = 0.0012$) y 3.0 mA ($p = 0.0002$); el grupo solo choque presentó un menor número de espinas que los grupos 1.0 mA ($p = 0.0168$) y 3.0 mA ($p = 0.0002$), pero no con respecto a 0.0 mA ($p = 0.7025$); el grupo 0.0 mA tuvo menos espinas

que 1.0 mA ($p = 0.0362$) y 3.0 mA ($p = 0.0048$). Los grupos 1.0 mA y 3.0 mA no difieren entre ellos ($p = 0.3312$) (Fig. 16D).

La interacción entre las variables grupo x intervalo de retención no fue estadísticamente significativa ($F_{(3,24)} = 0.71$, $p = 0.56$) (Fig. 16D).

4.3 Morfología de las espinas dendríticas de las MSNs del estriado dorsal y núcleo accumbens

A continuación se describen los resultados obtenidos por tipo de espina dendrítica en cada una de las regiones del estriado dorsal y ventral.

4.3.1 Estriado dorsolateral

4.3.1.1 Espinas dendríticas tipo larga en el estriado dorsolateral

Se encontraron diferencias significativas en la proporción de espinas dendríticas tipo larga durante la consolidación (6 h) entre los grupos ($F_{(4,15)} = 8.77$, $p < 0.001$). El post-hoc de Bonferroni mostró que el grupo intacto no es diferente significativamente del grupo solo choque ($p = 0.2598$) y 0.0 mA ($p = 0.1793$); el grupo intacto tuvo una mayor proporción de espinas tipo larga que 1.0 mA ($p = 0.0090$) y 3.0 mA ($p = 0.0013$). El grupo 0.0 mA no fue significativamente diferente de 1.0 mA ($p = 0.0803$), pero si tuvo una mayor proporción de espinas tipo larga que 3.0 mA ($p = 0.0075$). Los grupos 1.0 mA y 3.0 mA no difieren entre ellos ($p = 0.1164$) (Fig. 17A).

Cuando la proporción de espinas tipo larga fue analizada en el intervalo de 24 h se encontraron diferencias significativas entre grupos ($F_{(4,15)} = 19.47$, $p < 0.0001$). Comparaciones entre pares de grupos revelaron que el grupo intacto no fue diferente del grupo solo choque ($p = 0.3261$), el grupo intacto difiere de los grupos 0.0 mA ($p = 0.0017$), 1.0 mA ($p = 0.0038$) y 3.0 mA ($p < 0.0001$); de igual forma el grupo solo choque también difiere de los grupos 0.0 mA ($p = 0.0005$), 1.0 mA ($p = 0.0003$) y 3.0 mA ($p < 0.0001$). El grupo 0.0 mA no es diferente de 1.0 mA ($p = 0.8093$), pero tiene una mayor proporción de espinas tipo larga que 3.0 mA ($p = 0.0283$). Los grupos 1.0 mA y 3.0 mA ($p = 0.1164$) no difieren entre ellos (Fig. 17A).

El análisis de varianza ANOVA de dos vías indicó que la interacción entre las variables grupo x intervalo de retención no fue significativa ($F_{(3,24)} = 0.40$, $p = 0.75$) (Fig. 17A).

4.3.1.2 Espinas dendríticas tipo hongo en el estriado dorsolateral

Los resultados del análisis ANOVA indicaron que hay diferencias significativas entre grupos durante la consolidación de la memoria (6 h; $F_{(4,15)} = 43.83$, $p < 0.0001$). Comparaciones entre pares de grupos mostraron que el grupo intacto no es diferente del grupo solo choque ($p = 0.5537$). El grupo intacto tiene menor proporción de las espinas tipo hongo que los grupos 0.0 mA ($p = 0.0378$), 1.0 mA ($p = 0.0001$) y 3.0 mA ($p < 0.0001$). De igual forma el grupo solo choque tiene menor proporción de este tipo de espinas que los grupos 0.0 mA ($p = 0.0097$), 1.0 mA ($p < 0.0001$) y 3.0 mA ($p < 0.0001$). El grupo 0.0 mA tiene una menor proporción de espinas tipo hongo que 1.0 mA ($p = 0.0294$) y 3.0 mA ($p = 0.0006$). El grupo 3.0 mA tiene una mayor proporción de espinas tipo larga que 1.0 mA ($p = 0.0202$) (Fig. 17B).

En el intervalo de 24 h, se encontraron diferencias significativas entre los grupos analizados ($F_{(4,15)} = 8.91$, $p < 0.001$). El grupo intacto y solo choque no difieren entre sí ($p = 0.9076$). El grupo intacto tiene una menor proporción de espinas tipo hongo que los grupos 0.0 mA ($p = 0.0002$), 1.0 mA ($p = 0.0002$) y 3.0 mA ($p < 0.0001$). De igual forma el grupo solo choque tiene una baja proporción de este tipo de espinas en comparación con los grupos 0.0 mA ($p < 0.0001$), 1.0 mA ($p < 0.0001$) y 3.0 mA ($p < 0.0001$). Finalmente, los grupos 0.0 mA, 1.0 mA y 3.0 mA no difieren estadísticamente entre ellos mismos (Fig. 17B).

El análisis ANOVA de dos vías muestra la interacción grupo x intervalo de retención no es significativa en ninguno de los grupos experimentales ($F_{(3,24)} = 1.77$, $p = 0.18$) (Fig. 17B).

4.3.1.3 Espinas dendríticas tipo corta en el estriado dorsolateral

No se encontraron diferencias significativas en la proporción de las espinas tipo corta durante la consolidación (6 h; $F_{(4,15)} = 1.02$, $p = 0.43$), ni en la memoria de largo plazo (24 h; $F_{(4,15)} = 2.21$, $p = 0.12$) (Fig. 17C). El ANOVA de dos vías mostró que no hay una interacción significativa entre los factores grupo x intervalo de retención en cada uno de los grupos experimentales ($F_{(3,24)} = 1.29$, $p = 0.30$) (Fig. 17C).

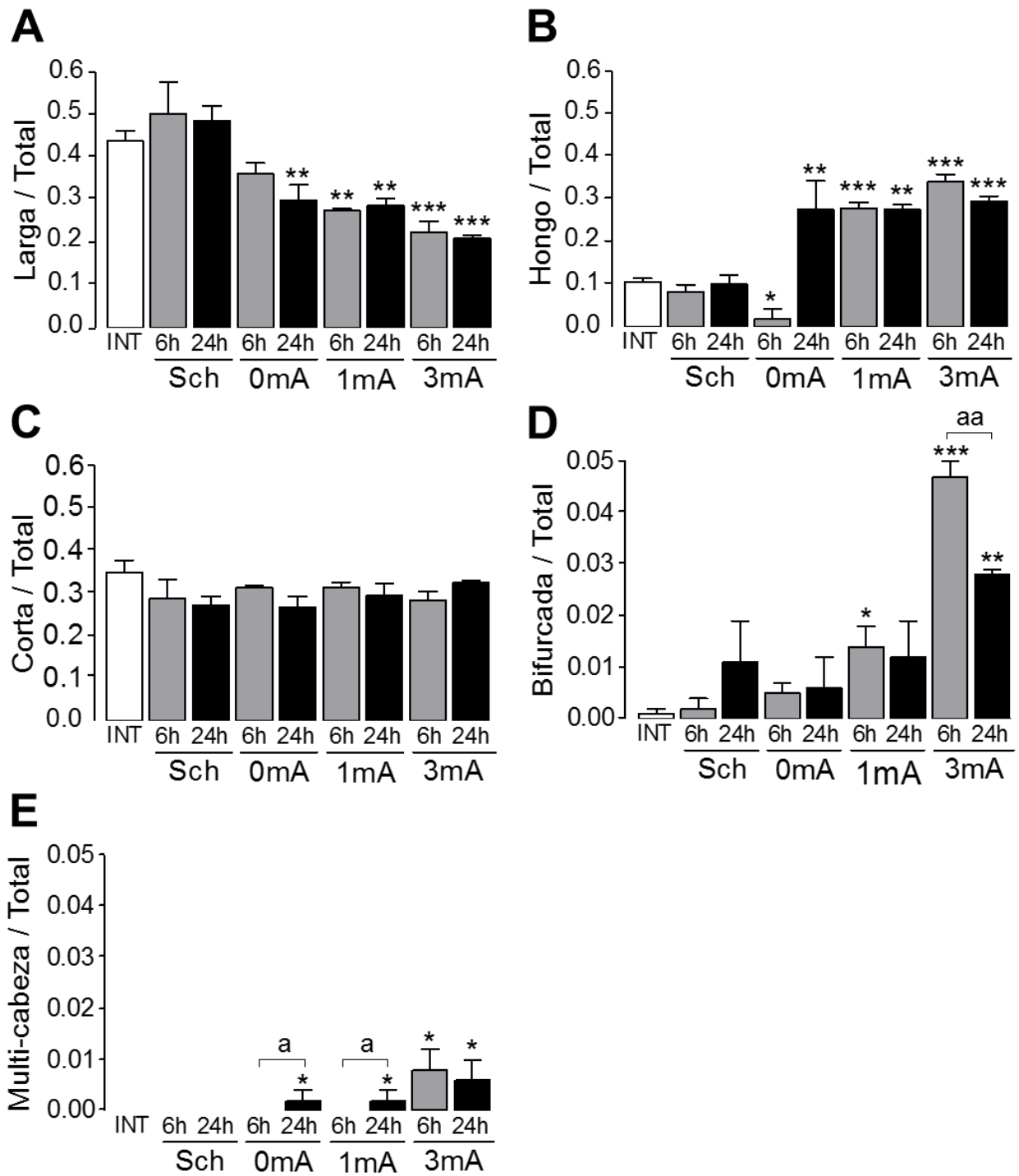


Figura 17. Tipos de espinas dendríticas en el estriado dorsolateral. **A.** Larga; **B.** Hongo; **C.** Corta; **D.** Bifurcada; **E.** Multi-cabeza observadas durante la consolidación (6 h; barras grises) y la memoria de largo plazo (24 h; barras negras). INT, intacto (barras blancas); Sch, Solo choque de 3.0 mA; 0mA, 1mA y 3mA, grupos entrenados con choque eléctrico de 0.0 mA, 1.0 mA y 3.0 mA respectivamente. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$ vs INT; ^a $p < 0.05$, ^{aa} $p < 0.01$ entre grupos. Notar las diferentes escalas en las gráficas. Cada barra representa promedio \pm error estándar de 40 MSNs, obtenidas de cuatro ratas en cada condición.

4.3.1.4 Espinas dendríticas tipo bifurcada en el estriado dorsolateral

El ANOVA de una vía mostró diferencias significativas en la proporción de espinas dendríticas tipo bifurcada durante la consolidación entre los grupos experimentales ($F_{(4,15)} = 54.56$, $p < 0.0001$). El grupo intacto, solo choque y 0.0 mA no son diferentes estadísticamente entre ellos. Sin embargo, si es diferente de los grupos 1.0 mA ($p = 0.0402$) y 3.0 mA ($p < 0.0001$). El grupo solo choque también difiere de 1.0 mA ($p = 0.0038$) y 3.0 mA ($p < 0.0001$). El grupo 0.0 mA es diferente de los grupos 1.0 mA ($p = 0.0259$) y 3.0 mA ($p < 0.0001$). El grupo 3.0 mA tiene una mayor proporción de espinas tipo bifurcada que 1.0 mA ($p < 0.0001$) (Fig. 17D).

También se encontraron diferencias significativas en la proporción de espinas tipo bifurcada en la memoria de largo plazo en los diferentes grupos experimentales ($F_{(4,15)} = 3.431$, $p < 0.001$). El grupo 3.0 mA es diferente estadísticamente de los grupos intacto ($p = 0.0002$), solo choque ($p = 0.0106$), 0.0 mA ($p = 0.0019$) y 1.0 mA ($p = 0.0170$). Los demás grupos no difieren entre sí (Fig. 17D).

El análisis ANOVA de dos vías mostró que hay una interacción significativa entre los factores grupo x intervalo de retención ($F_{(3,24)} = 3.04$, $p < 0.05$). El post-hoc muestra que hay una mayor densidad de espinas tipo bifurcada en el grupo 3.0 mA, en el intervalo de 6 h con respecto a las 24 h ($p < 0.05$) (Fig. 17D).

4.3.1.5 Espinas dendríticas tipo multi-cabeza en el estriado dorsolateral

Se encontraron diferencias significativas en la proporción de espinas tipo multi-cabeza durante la consolidación ($F_{(4,15)} = 2.956$, $p = 0.0020$). El post-hoc mostró que las únicas diferencias significativas se encontraron en el grupo 3.0 mA con respecto a los grupos intacto ($p = 0.0045$), solo choque ($p = 0.0002$), 0.0 mA ($p = 0.0002$) y 1.0 mA ($p = 0.0002$) (Fig. 17E).

Cuando la proporción de espinas tipo multi-cabeza fueron analizadas en el intervalo de 24 h, se encontraron diferencias significativas entre grupos ($F_{(4,15)} = 1.348$, $p = 0.0461$). La proporción de este tipo de espinas dendríticas en el grupo intacto no difiere con respecto al grupo solo choque ($p > 0.05$). Sin embargo, el grupo intacto tiene una menor proporción de

espinas bifurcadas que los grupos 0.0 mA ($p < 0.05$), 1.0 mA ($p < 0.05$) y 3.0 mA ($p < 0.0062$). De igual manera el grupo solo choque también tiene una menor proporción de estas espinas que los grupos 0.0 mA ($p < 0.05$), 1.0 mA ($p < 0.05$) y 3.0 mA ($p = 0.0004$). El grupo 0.0 mA no es estadísticamente diferente de 1.0 mA ($p > 0.05$) y 3.0 mA ($p > 0.05$). El grupo 3.0 mA tiene una mayor proporción de espinas bifurcadas que 1.0 mA (0.0488) (Fig. 17E).

El ANOVA de dos vías indica que existe una interacción significativa entre los grupos y el intervalo de retención ($F_{(3,24)} = 3.72$, $p < 0.05$), lo que implica que hay un incremento en la proporción de espinas bifurcadas en el intervalo de 24 h en comparación con el intervalo de 6 h en los grupos 0.0 mA ($p < 0.05$) y 1.0 mA ($p < 0.05$) (Fig. 17E).

4.3.1.6 Espinas dendríticas no clasificadas en el estriado dorsolateral

Las espinas dendríticas que no pudieron ser clasificadas en las cinco categorías anteriormente descritas, fueron agrupadas como espinas no clasificadas. No se encontraron diferencias significativas en la proporción de estas espinas dendríticas durante la consolidación ($F_{(4,15)} = 0.412$, $p = 0.7974$), ni en la memoria a largo plazo ($F_{(4,15)} = 0.677$, $p = 0.6184$).

4.3.2 Estriado dorsomedial

4.3.2.1 Espinas dendríticas tipo larga en el estriado dorsomedial

Se encontraron diferencias significativas en la proporción de espinas dendríticas tipo larga durante la consolidación (6 h) entre los grupos ($F_{(4,15)} = 18.88$, $p < 0.0001$). El post-hoc de Bonferroni mostró que el grupo intacto no es diferente significativamente del grupo solo choque ($p = 0.0708$); el grupo intacto tuvo una mayor proporción de espinas tipo larga que los grupos 0.0 mA ($p = 0.0491$), 1.0 mA ($p < 0.0001$) y 3.0 mA ($p < 0.0001$). El grupo 0.0 mA tiene una mayor proporción de estas espinas que 1.0 mA ($p = 0.0056$) y 3.0 mA ($p = 0.0004$). Los grupos 1.0 mA y 3.0 mA no difieren entre ellos ($p = 0.2321$) (Fig. 18A).

Cuando la proporción de espinas tipo larga fue analizada en el intervalo de 24 h se encontraron diferencias significativas entre grupos ($F_{(4,15)} = 43.72$, $p < 0.0001$).

Comparaciones entre pares de grupos revelaron que el grupo intacto no fue diferente del grupo solo choque ($p = 0.0876$), el grupo intacto difiere de los grupos 0.0 mA ($p < 0.0001$), 1.0 mA ($p < 0.0001$) y 3.0 mA ($p < 0.0001$); de igual forma el grupo solo choque también difiere de los grupos 0.0 mA ($p < 0.0001$), 1.0 mA ($p < 0.0001$) y 3.0 mA ($p < 0.0001$). El grupo 0.0 mA no es diferente de 1.0 mA ($p = 0.0776$), pero tiene una mayor proporción de espinas tipo larga que 3.0 mA ($p = 0.0019$). Los grupos 1.0 mA y 3.0 mA ($p = 0.0375$) también difieren entre ellos (Fig. 18A).

El análisis de varianza ANOVA de dos vías indicó que la interacción entre las variables grupo x intervalo de retención no fue significativa ($F_{(3,24)} = 0.92$, $p = 0.44$) (Fig. 18A).

4.3.2.2 Espinas dendríticas tipo hongo en el estriado dorsomedial

Los resultados del análisis ANOVA indicaron que hay diferencias significativas entre grupos durante la consolidación de la memoria (6 h; $F_{(4,15)} = 22.89$, $p < 0.0001$). Comparaciones entre pares de grupos mostraron que el grupo intacto no es diferente del grupo solo choque ($p = 0.7534$). El grupo intacto tiene menor proporción de las espinas tipo hongo que los grupos 0.0 mA ($p = 0.0125$), 1.0 mA ($p < 0.0001$) y 3.0 mA ($p < 0.0001$). De igual forma el grupo solo choque tiene menor proporción de este tipo de espinas que los grupos 0.0 mA ($p = 0.0465$), 1.0 mA ($p < 0.0001$) y 3.0 mA ($p < 0.0001$). El grupo 0.0 mA tiene una menor proporción de espinas tipo hongo que 1.0 mA ($p = 0.0239$) y 3.0 mA ($p < 0.0001$). El grupo 3.0 mA tiene una mayor proporción de espinas tipo larga que 1.0 mA ($p = 0.0486$) (Fig. 18B).

En el intervalo de 24 h, se encontraron diferencias significativas entre los grupos analizados ($F_{(4,15)} = 48.80$, $p < 0.0001$). El grupo intacto y solo choque no difieren entre sí ($p = 0.1494$). El grupo intacto tiene una menor proporción de espinas tipo hongo que los grupos 0.0 mA ($p < 0.0001$), 1.0 mA ($p < 0.0001$) y 3.0 mA ($p < 0.0001$). De igual forma el grupo solo choque tiene una baja proporción de este tipo de espinas en comparación con los grupos 0.0 mA ($p < 0.0001$), 1.0 mA ($p < 0.0001$) y 3.0 mA ($p < 0.0001$). Finalmente, el grupo 0.0 mA no difiere de 1.0 mA ($p = 0.0687$), pero si es diferente de 3.0 mA ($p = 0.033$) (Fig. 18B).

El análisis ANOVA de dos vías muestra la interacción grupo x intervalo de retención no es significativa en ninguno de los grupos experimentales ($F_{(3,24)} = 0.94$, $p = 0.44$) (Fig. 18B).

4.3.2.3 Espinas dendríticas tipo corta en el estriado dorsomedial

No se encontraron diferencias significativas en la proporción de las espinas tipo corta durante la consolidación (6 h; $F_{(4,15)} = 1.121$, $p = 0.3832$), ni en la memoria de largo plazo (24 h; $F_{(4,15)} = 0.792$, $p = 0.5507$) (Fig. 17C). El ANOVA de dos vías mostró que no hay una interacción significativa entre los factores grupo x intervalo de retención en cada uno de los grupos experimentales ($F_{(3,24)} = 0.24$, $p = 0.87$) (Fig. 17C).

4.3.2.4 Espinas dendríticas tipo bifurcada en el estriado dorsomedial

El ANOVA de una vía mostró diferencias significativas en la proporción de espinas dendríticas tipo bifurcada durante la consolidación entre los grupos experimentales ($F_{(4,15)} = 6.951$, $p = 0.0023$). El grupo intacto no es diferente estadísticamente de los grupos solo choque ($p = 0.2094$), 0.0 mA ($p = 0.5293$) y 1.0 mA ($p = 0.5293$), pero el grupo intacto tiene una menor proporción de las espinas bifurcadas que 3.0 mA ($p = 0.0023$). El grupo solo choque no difiere de 0.0 mA ($p = 0.2635$) y 1.0 mA ($p = 0.0496$); pero si es estadísticamente diferente del grupo 3.0 mA ($p = 0.0001$). El grupo 0.0 mA no es diferente de los grupos 1.0 mA ($p = 0.4397$), sin embargo, si es diferente de 3.0 mA ($p = 0.0017$). El grupo 3.0 mA también difiere de 1.0 mA ($p = 0.0088$) (Fig. 18D).

También se encontraron diferencias significativas en la proporción de espinas tipo bifurcada en la memoria de largo plazo en los diferentes grupos experimentales ($F_{(4,15)} = 8.885$, $p = 0.0473$). El grupo 3.0 mA es diferente estadísticamente de los grupos intacto ($p = 0.0481$), solo choque ($p = 0.0001$) únicamente. No es difiere con los grupos 0.0 mA ($p = 0.0822$) y 1.0 mA ($p = 0.3968$). Los demás grupos no difieren entre sí (Fig. 18D).

El análisis ANOVA de dos vías mostró que no existe una interacción significativa entre los factores grupo x intervalo de retención ($F_{(3,24)} = 1.05$, $p = 0.39$) (Fig. 18D).

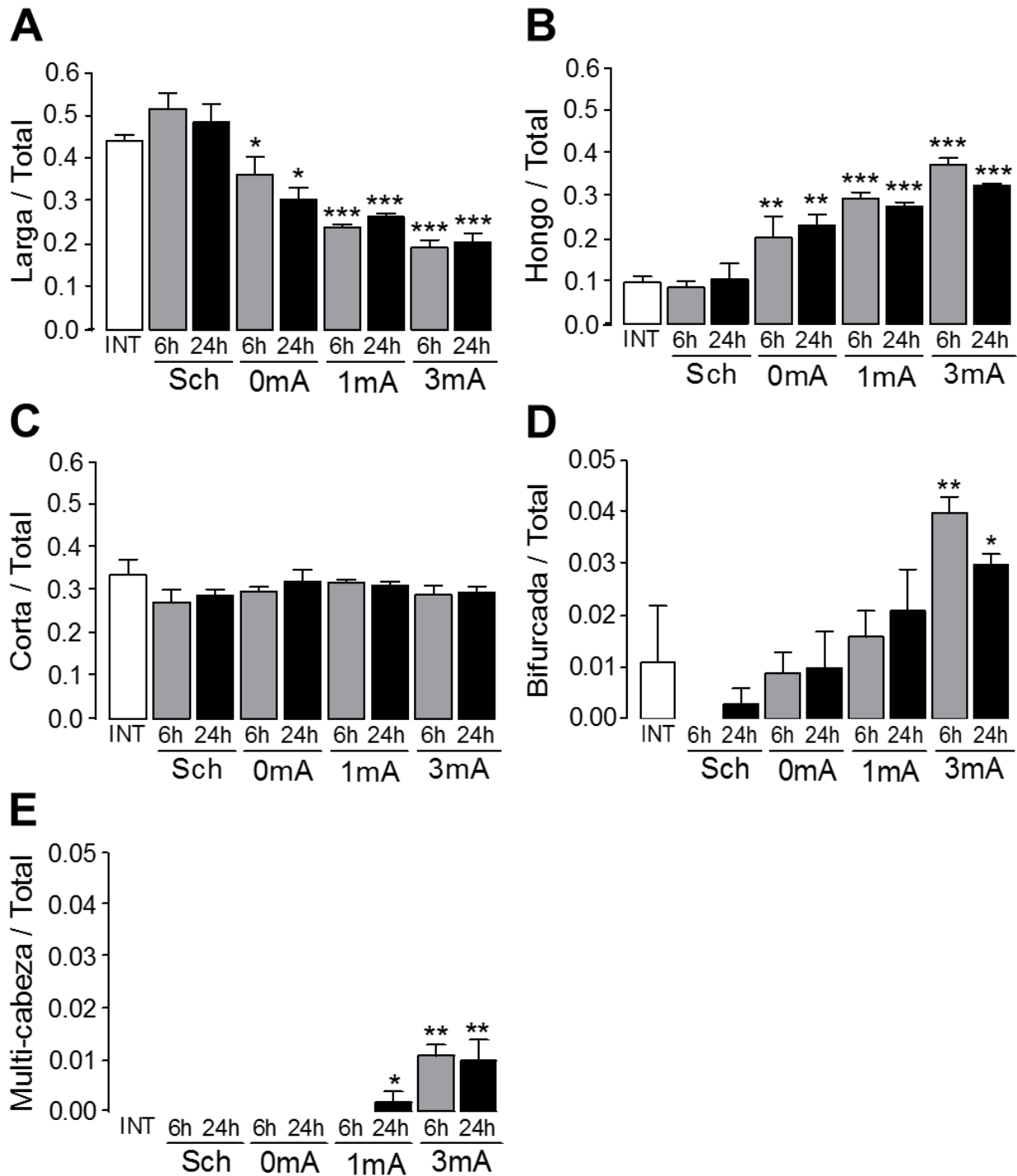


Figura 18. Tipos de espinas dendríticas en el estriado dorsomedial. **A.** Larga; **B.** Hongo; **C.** Corta; **D.** Bifurcada; **E.** Multi-cabeza observadas durante la consolidación (6 h; barras grises) y la memoria de largo plazo (24 h; barras negras). INT, intacto (barras blancas); Sch, Solo choque de 3.0 mA; 0mA, 1mA y 3mA, grupos entrenados con choque eléctrico de 0.0 mA, 1.0 mA y 3.0 mA respectivamente. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$ vs INT. Notar las diferentes escalas en las gráficas. Cada barra representa promedio \pm error estándar de 40 MSNs, obtenidas de cuatro ratas en cada condición.

4.3.2.5 Espinas dendríticas tipo multi-cabeza en el estriado dorsomedial

Se encontraron diferencias significativas en la proporción de espinas tipo multi-cabeza durante la consolidación ($F_{(4,15)} = 19.38$, $p < 0.0001$). El post-hoc mostró que las únicas diferencias significativas se encontraron en el grupo 3.0 mA, el cual tuvo una mayor proporción de las espinas multi-cabeza que los grupos intacto ($p = 0.0002$), solo choque ($p = 0.0002$), 0.0 mA ($p = 0.0002$) y 1.0 mA ($p = 0.0002$) (Fig. 18E).

Cuando la proporción de espinas tipo multi-cabeza fueron analizadas en el intervalo de 24 h, se encontraron diferencias significativas entre grupos ($F_{(4,15)} = 3.637$, $p = 0.0336$). La proporción de este tipo de espinas dendríticas en el grupo intacto no difiere con respecto al grupo solo choque ($p > 0.05$) y 0.0 mA ($p > 0.05$). Sin embargo, el grupo intacto tiene una menor proporción de espinas bifurcadas que los grupos 1.0 mA ($p < 0.05$) y 3.0 mA ($p < 0.0004$). De igual manera el grupo solo choque también tiene una menor proporción de estas espinas que el grupo 3.0 mA ($p = 0.0004$), sin embargo, no difiere de los grupos 0.0 mA ($p > 0.05$) y 1.0 mA ($p > 0.05$). El grupo 0.0 mA es estadísticamente diferente de 1.0 mA ($p < 0.05$) y 3.0 mA ($p > 0.0002$). El grupo 3.0 mA tiene una mayor proporción de espinas bifurcadas que 1.0 mA (0.0044) (Fig. 18E).

El ANOVA de dos vías indica que no existe una interacción significativa entre los grupos y el intervalo de retención ($F_{(3,24)} = 0.27$, $p = 0.85$) (Fig. 18E).

4.3.2.6 Espinas dendríticas no clasificadas en el estriado dorsomedial

Las espinas dendríticas que no pudieron ser clasificadas en las cinco categorías anteriormente descritas, fueron agrupadas como espinas no clasificadas. No se encontraron diferencias significativas en la proporción de estas espinas dendríticas durante la consolidación ($F_{(4,15)} = 0.602$, $p = 0.6673$), ni en la memoria a largo plazo ($F_{(4,15)} = 0.169$, $p = 0.9502$).

4.3.3 Núcleo accumbens core

4.3.3.1 Espinas dendríticas tipo larga en el núcleo accumbens core

Se encontraron diferencias significativas en la proporción de espinas dendríticas tipo larga durante la consolidación (6 h) entre los grupos ($F_{(4,15)} = 7.291$, $p = 0.0002$). El post-hoc de Bonferroni mostró que el grupo intacto no es diferente significativamente del grupo 0.0 mA ($p = 0.1044$); el grupo intacto tuvo una mayor proporción de espinas tipo larga en comparación de los grupos solo choque (0.0003), 1.0 mA ($p = 0.0038$) y 3.0 mA ($p < 0.0001$). El grupo solo choque no difiere de 1.0 mA ($p = 0.1479$) y 3.0 mA ($p = 0.1700$), pero tuvo una menor proporción de este tipo de espinas que 0.0 mA ($p = 0.0196$). El grupo 0.0 mA tiene una mayor proporción de estas espinas que 3.0 mA ($p = 0.0073$), pero no difiere de 1.0 mA ($p = 0.1479$). Los grupos 1.0 mA y 3.0 mA no difieren entre ellos ($p = 0.2321$) (Fig. 19A).

Cuando la proporción de espinas tipo larga fue analizada en el intervalo de 24 h se encontraron diferencias significativas entre grupos ($F_{(4,15)} = 6.471$, $p = 0.0031$). Comparaciones entre pares de grupos revelaron que el grupo intacto no fue diferente del grupo 0.0 mA ($p = 0.1636$), no obstante el grupo intacto tiene una mayor proporción de espinas tipo larga que los grupos solo choque ($p < 0.0001$), 1.0 mA ($p = 0.0023$) y 3.0 mA ($p = 0.0001$); de igual forma el grupo solo choque también difiere de los grupos 0.0 mA ($p = 0.0010$) y 1.0 mA ($p < 0.0001$), pero no es diferente de 3.0 mA ($p = 0.4770$). El grupo 0.0 mA no es diferente de 1.0 mA ($p = 0.0631$), sin embargo, si difiere de 3.0 mA ($p = 0.0061$). Los grupos 1.0 mA y 3.0 mA ($p = 0.1700$) no difieren entre ellos (Fig. 19A).

El análisis de varianza ANOVA de dos vías indicó que la interacción entre las variables grupo x intervalo de retención no fue significativa ($F_{(3,24)} = 0.40$, $p = 0.75$) (Fig. 19A).

4.3.3.2 Espinas dendríticas tipo hongo en el núcleo accumbens core

Los resultados del análisis ANOVA indicaron que hay diferencias significativas entre grupos durante la consolidación de la memoria (6 h; $F_{(4,15)} = 15.627$, $p < 0.0001$).

Comparaciones entre pares de grupos mostraron que el grupo intacto tiene menor proporción de las espinas tipo hongo que los grupos que recibieron choque eléctrico, como los grupos solo choque ($p = 0.0004$), 1.0 mA ($p = 0.0014$) y 3.0 mA ($p < 0.0001$); pero no difiere del grupo 0.0 mA ($p = 0.1909$). De igual forma el grupo solo choque tiene mayor proporción de este tipo de espinas que el grupo 0.0 mA ($p = 0.0124$); sin embargo, no es diferente de los grupos 1.0 mA ($p = 0.6541$) y 3.0 mA ($p = 0.1588$). El grupo 0.0 mA tiene una menor proporción de espinas tipo hongo que 1.0 mA ($p = 0.0344$) y 3.0 mA ($p = 0.0010$). Los grupos 1.0 mA y 3.0 mA no difieren entre ellos mismos ($p = 0.1691$) (Fig. 19B).

En el intervalo de 24 h, se encontraron diferencias significativas entre los grupos analizados ($F_{(4,15)} = 6.049$, $p = 0.0042$). El grupo intacto tiene una menor proporción de espinas tipo hongo que los grupos solo choque ($p < 0.0001$), 0.0 mA ($p = 0.0134$), 1.0 mA ($p = 0.0012$) y 3.0 mA ($p = 0.0002$). El grupo solo choque también presenta una mayor proporción de este tipo de espinas en comparación con 0.0 mA ($p = 0.0116$) y no es diferente estadísticamente de los grupos 1.0 mA ($p = 0.5537$) y 3.0 mA ($p = 0.0933$). Los demás grupos experimentales no presentan diferencias significativas entre sí (Fig. 19B).

El análisis ANOVA de dos vías muestra la interacción grupo x intervalo de retención no es significativa en ninguno de los grupos experimentales ($F_{(3,24)} = 1.02$, $p = 0.40$) (Fig. 19B).

4.3.3.3 Espinas dendríticas tipo corta en el núcleo accumbens core

No se encontraron diferencias significativas en la proporción de las espinas tipo corta durante la consolidación (6 h; $F_{(4,15)} = 0.921$, $p = 0.4776$), ni en la memoria de largo plazo (24 h; $F_{(4,15)} = 2.534$, $p = 0.0838$) (Fig. 19C). El ANOVA de dos vías mostró que no hay una interacción significativa entre los factores grupo x intervalo de retención en cada uno de los grupos experimentales ($F_{(3,24)} = 2.29$, $p = 0.10$) (Fig. 19C).

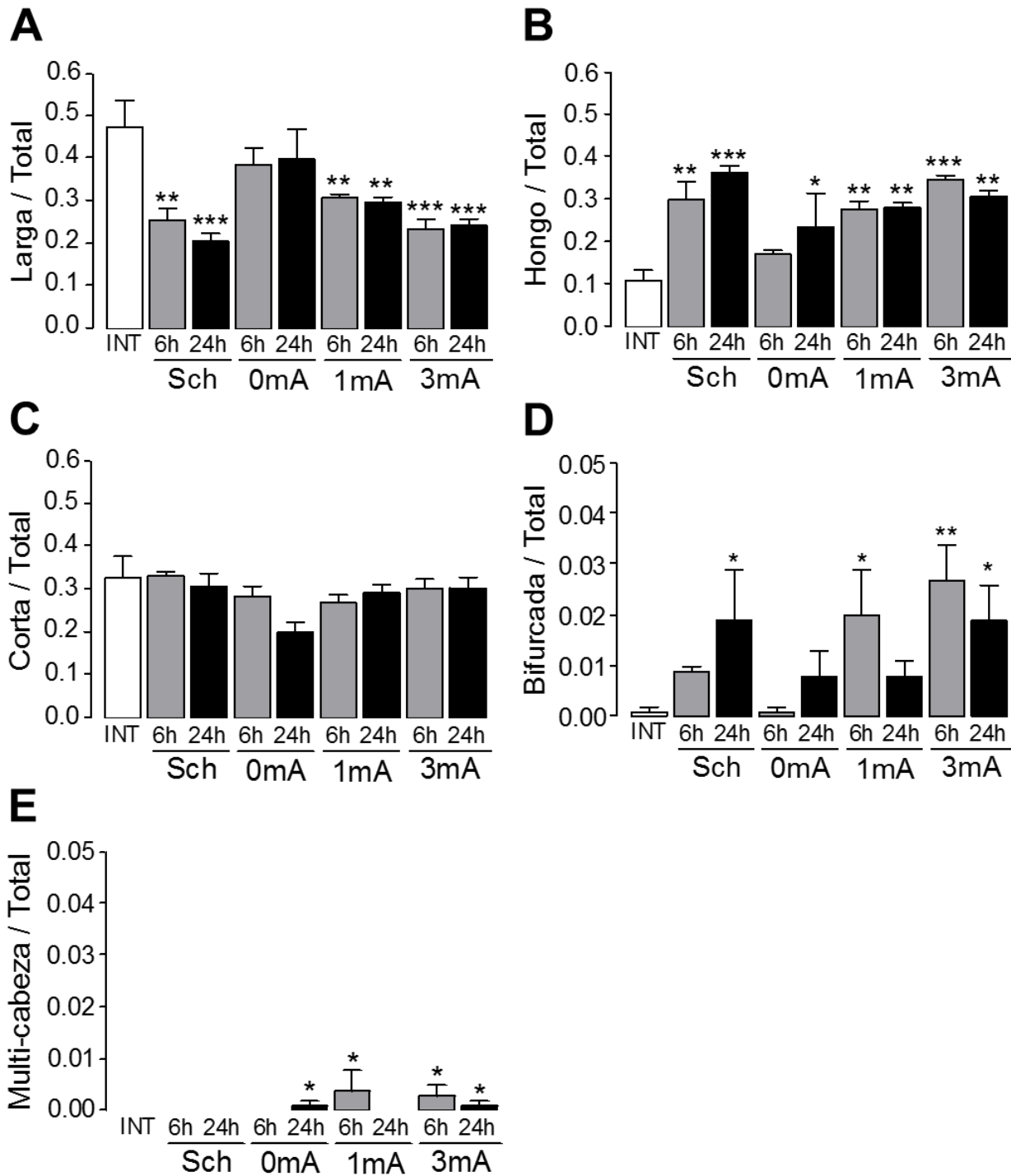


Figura 19. Tipos de espinas dendríticas en el núcleo accumbens core. **A.** Larga; **B.** Hongo; **C.** Corta; **D.** Bifurcada; **E.** Multi-cabeza observadas durante la consolidación (6 h; barras grises) y la memoria de largo plazo (24 h; barras negras). INT, intacto (barras blancas); Sch, Solo choque de 3.0 mA; 0mA, 1mA y 3mA, grupos entrenados con choque eléctrico de 0.0 mA, 1.0 mA y 3.0 mA respectivamente. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$ vs INT. Notar las diferentes escalas en las gráficas. Cada barra representa promedio \pm error estándar de 40 MSNs, obtenidas de cuatro ratas en cada condición.

4.3.3.4 Espinas dendríticas tipo bifurcada en el núcleo accumbens core

El ANOVA de una vía mostró diferencias significativas en la proporción de espinas dendríticas tipo bifurcada durante la consolidación entre los grupos experimentales ($F_{(4,15)} = 4.552$, $p = 0.0132$). El grupo intacto tiene una menor proporción de las espinas bifurcadas que los grupos 1.0 mA ($p = 0.0336$) y 3.0 mA ($p = 0.0050$), sin embargo, lo difiere de los grupos solo choque ($p = 0.4009$) y 0.0 mA ($p = 0.9907$). El grupo solo choque únicamente difiere estadísticamente del grupo 3.0 mA ($p = 0.0059$). El grupo 0.0 mA es diferente de los grupos 1.0 mA ($p = 0.0259$) y 3.0 mA ($p = 0.0042$). El grupo 3.0 mA no difiere de 1.0 mA ($p = 0.4210$) (Fig. 19D).

También se encontraron diferencias significativas en la proporción de espinas tipo bifurcada en la memoria de largo plazo en los diferentes grupos experimentales ($F_{(4,15)} = 3.809$, $p = 0.0441$). El grupo intacto no es estadísticamente diferente de los grupos 0.0 mA ($p = 0.4623$) y 1.0 mA ($p = 0.4070$); pero tiene una menor proporción de espinas bifurcadas que los grupos solo choque ($p = 0.0415$) y 3.0 mA ($p = 0.0409$). Comparaciones en pares de grupos indican que no hay diferencias significativas entre el resto de los grupos experimentales (Fig. 19D).

El análisis ANOVA de dos vías mostró que no existe una interacción significativa entre los factores grupo x intervalo de retención ($F_{(3,24)} = 1.49$, $p = 0.24$) (Fig. 19D).

4.3.3.5 Espinas dendríticas tipo multi-cabeza en el núcleo accumbens core

Se encontraron diferencias significativas en la proporción de espinas tipo multi-cabeza durante la consolidación ($F_{(4,15)} = 2.377$, $p = 0.0441$). El grupo intacto no difiere de los grupos solo choque ($p > 0.05$) y 0.0 mA ($p > 0.05$); sin embargo el grupo intacto tuvo una menor proporción de este tipo de espinas que el grupo 1.0 mA ($p < 0.05$) y 3.0 mA ($p < 0.0002$). El grupo solo choque solo difiere del grupo 3.0 mA ($p = 0.0102$). Mientras tanto el grupo 0.0 mA tiene una menor proporción de espinas multi-cabeza que los grupos 1.0 mA ($p < 0.05$) y 3.0 mA ($p = 0.0003$). El grupo 1.0 mA no difiere estadísticamente del grupo 3.0 mA ($p = 0.0102$) (Fig. 19E).

Cuando la proporción de espinas tipo multi-cabeza fueron analizadas en el intervalo de 24 h, se encontraron diferencias significativas entre grupos ($F_{(4,15)} = 2.377$, $p = 0.0441$). La proporción de este tipo de espinas dendríticas en el grupo intacto no difiere con respecto al grupo solo choque ($p > 0.05$) y 1.0 mA ($p > 0.05$). Sin embargo, el grupo intacto tiene una menor proporción de espinas bifurcadas que los grupos 0.0 mA ($p < 0.05$) y 3.0 mA ($p = 0.0004$). De igual manera el grupo solo choque también tiene una menor proporción de estas espinas que los grupos 0.0 mA ($p < 0.05$) y 3.0 mA ($p = 0.0016$), sin embargo, no difiere del grupo 1.0 mA ($p > 0.05$). El grupo 0.0 mA es estadísticamente diferente de 1.0 mA ($p < 0.05$), pero no del grupo 3.0 mA ($p > 0.05$). El grupo 3.0 mA tiene una mayor proporción de espinas bifurcadas que 1.0 mA (0.0312) (Fig. 19E).

El ANOVA de dos vías indica que no existe una interacción significativa entre los grupos y el intervalo de retención ($F_{(3,24)} = 0.93$, $p = 0.44$) (Fig. 19E).

4.3.3.6 Espinas dendríticas no clasificadas en el núcleo accumbens core

Las espinas dendríticas que no pudieron ser clasificadas en las cinco categorías anteriormente descritas, fueron agrupadas como espinas no clasificadas. No se encontraron diferencias significativas en la proporción de estas espinas dendríticas durante la consolidación ($F_{(4,15)} = 2.847$, $p = 0.0613$), ni en la memoria a largo plazo ($F_{(4,15)} = 1.994$, $p = 0.1471$).

4.3.4 Núcleo accumbens shell

4.3.4.1 Espinas dendríticas tipo larga en el núcleo accumbens shell

Se encontraron diferencias significativas en la proporción de espinas dendríticas tipo larga durante la consolidación (6 h) entre los grupos ($F_{(4,15)} = 9.542$, $p = 0.0005$).

El post-hoc de Bonferroni mostró que el grupo intacto no es diferente significativamente del grupo 0.0 mA ($p = 0.2148$); el grupo intacto tuvo una mayor proporción de espinas tipo larga

que los grupos solo choque ($p = 0.0001$), 1.0 mA ($p = 0.0008$) y 3.0 mA ($p = 0.0004$). El grupo solo choque tiene una menor proporción de estas espinas que 0.0 mA ($p = 0.0033$), sin embargo no difiere de los demás grupos experimentales. El grupo 0.0 mA tiene una mayor proporción de espinas largas que los grupos 1.0 mA ($p = 0.0052$) y 3.0 mA ($p = 0.0122$). Estos dos últimos grupos no difieren entre ellos mismos (Fig. 20A).

Cuando la proporción de espinas tipo larga fue analizada en el intervalo de 24 h se encontraron diferencias significativas entre grupos ($F_{(4,15)} = 2.377$, $p = 0.0441$). Comparaciones entre pares de grupos revelaron que el grupo intacto no fue diferente del grupo 0.0 mA ($p = 0.2377$), no obstante el grupo intacto tiene una mayor proporción de espinas tipo larga que los grupos solo choque ($p = 0.0002$), 1.0 mA ($p = 0.0071$) y 3.0 mA ($p = 0.0005$); de igual forma el grupo solo choque también difiere del grupo 0.0 mA ($p = 0.0044$), pero no es diferente de 1.0 mA ($p = 0.1730$) y 3.0 mA ($p = 0.7222$). El grupo 0.0 mA no es diferente de 1.0 mA ($p = 0.0997$), sin embargo, si difiere de 3.0 mA ($p = 0.0106$). Los grupos 1.0 mA y 3.0 mA ($p = 0.3074$) no difieren entre ellos (Fig. 20A).

El análisis de varianza ANOVA de dos vías indicó que la interacción entre las variables grupo x intervalo de retención no fue significativa ($F_{(3,24)} = 0.12$, $p = 0.95$) (Fig. 20A).

4.3.4.2 Espinas dendríticas tipo hongo en el núcleo accumbens shell

Los resultados del análisis ANOVA indicaron que hay diferencias significativas entre grupos durante la consolidación de la memoria (6 h; $F_{(4,15)} = 13.722$, $p < 0.0001$). Comparaciones entre pares de grupos mostraron que el grupo intacto tiene menor proporción de las espinas tipo hongo que los grupos que recibieron choque eléctrico, como los grupos solo choque ($p = 0.0002$), 1.0 mA ($p = 0.0008$) y 3.0 mA ($p = 0.0001$); pero no difiere del grupo 0.0 mA ($p = 0.3566$). De igual forma el grupo solo choque tiene mayor proporción de este tipo de espinas que el grupo 0.0 mA ($p = 0.0022$); sin embargo, no es diferente de los grupos 1.0 mA ($p = 0.5026$) y 3.0 mA ($p = 0.1998$). El grupo 0.0 mA tiene una menor proporción de espinas tipo hongo que 1.0 mA ($p = 0.0115$) y 3.0 mA ($p = 0.0017$). Los grupos 1.0 mA y 3.0 mA no difieren entre ellos mismos ($p = 0.4416$) (Fig. 20B).

En el intervalo de 24 h, se encontraron diferencias significativas entre los grupos analizados ($F_{(4,15)} = 5.256$, $p = 0.0075$). El grupo intacto tiene una menor proporción de

espinas tipo hongo que los grupos solo choque ($p < 0.0001$), 0.0 mA ($p = 0.0055$), 1.0 mA ($p = 0.0008$) y 3.0 mA ($p = 0.0001$). El grupo solo choque también presenta una mayor proporción de este tipo de espinas en comparación con 0.0 mA ($p = 0.0044$) y no es diferente estadísticamente de los grupos 1.0 mA ($p = 0.3602$) y 3.0 mA ($p = 0.1973$). Los demás grupos experimentales no presentan diferencias significativas entre sí (Fig. 20B).

El análisis ANOVA de dos vías muestra la interacción grupo x intervalo de retención no es significativa en ninguno de los grupos experimentales ($F_{(3,24)} = 0.86$, $p = 0.48$) (Fig. 20B).

4.3.4.3 Espinas dendríticas tipo corta en el núcleo accumbens shell

No se encontraron diferencias significativas en la proporción de las espinas tipo corta durante la consolidación (6 h; $F_{(4,15)} = 1.256$, $p = 0.0441$), ni en la memoria de largo plazo (24 h; $F_{(4,15)} = 5.030$, $p = 0.0690$) (Fig. 17C). El ANOVA de dos vías mostró que no hay una interacción significativa entre los factores grupo x intervalo de retención en cada uno de los grupos experimentales ($F_{(3,24)} = 4.48$, $p = 0.12$) (Fig. 20C).

4.3.4.4 Espinas dendríticas tipo bifurcada en el núcleo accumbens shell

El ANOVA de una vía mostró que no hay diferencias significativas en la proporción de espinas dendríticas tipo bifurcada durante la consolidación entre los grupos experimentales (6 h; $F_{(4,15)} = 4.049$, $p = 0.0202$) ni en la memoria a largo plazo (24 h; $F_{(4,15)} = 0.765$, $p = 0.5640$) (Fig. 20D). El ANOVA de dos vías mostró que no hay una interacción significativa entre los factores grupo x intervalo de retención en cada uno de los grupos experimentales ($F_{(3,24)} = 1.26$, $p = 0.31$) (Fig. 20D).

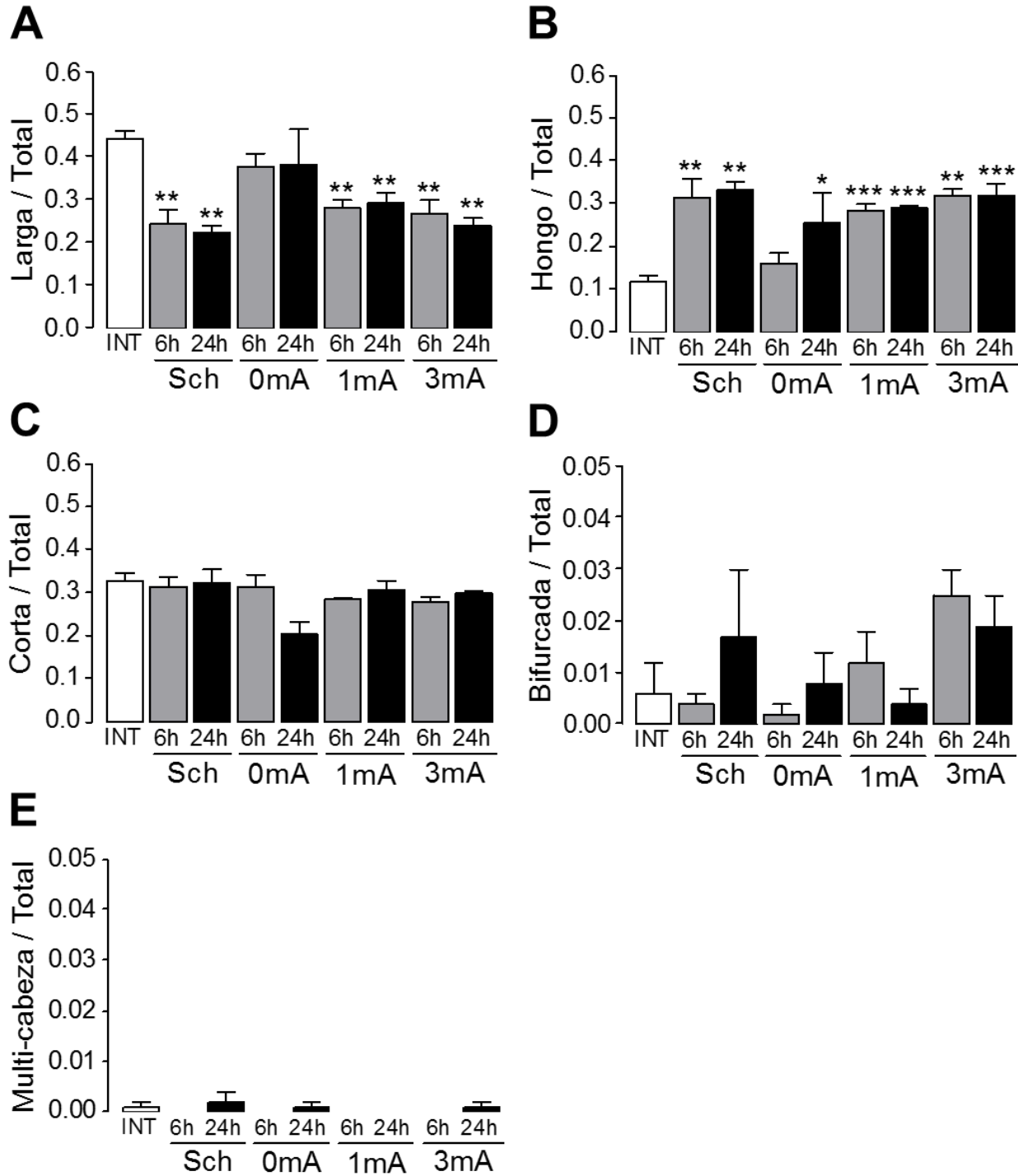


Figura 20. Tipos de espinas dendríticas en el núcleo accumbens shell. **A.** Larga; **B.** Hongo; **C.** Corta; **D.** Bifurcada; **E.** Multi-cabeza observadas durante la consolidación (6 h; barras grises) y la memoria de largo plazo (24 h; barras negras). INT, intacto (barras blancas); Sch, Solo choque de 3.0 mA; 0mA, 1mA y 3mA, grupos entrenados con choque eléctrico de 0.0 mA, 1.0 mA y 3.0 mA respectivamente. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$ vs INT. Notar las diferentes escalas en las gráficas. Cada barra representa promedio \pm error estándar de 40 MSNs, obtenidas de cuatro ratas en cada condición.

4.3.4.5 Espinas dendríticas tipo multi-cabeza en el núcleo accumbens shell

El ANOVA de una vía mostró que no hay diferencias significativas en la proporción de espinas dendríticas tipo bifurcada durante la consolidación entre los grupos experimentales (6 h; $F_{(4,15)} = 1.00$, $p = 0.44$) ni en la memoria a largo plazo (24 h; $F_{(4,15)} = 0.27$, $p = 0.90$) (Fig. 20E). El ANOVA de dos vías mostró que no hay una interacción significativa entre los factores grupo x intervalo de retención en cada uno de los grupos experimentales ($F_{(3,24)} = 0.35$, $p = 0.79$) (Fig. 20E).

4.3.4.6 Espinas dendríticas no clasificadas en el núcleo accumbens shell

Las espinas dendríticas que no pudieron ser clasificadas en las cinco categorías anteriormente descritas, fueron agrupadas como espinas no clasificadas. No se encontraron diferencias significativas en la proporción de estas espinas dendríticas durante la consolidación ($F_{(4,15)} = 0.623$, $p = 0.6534$), ni en la memoria a largo plazo ($F_{(4,15)} = 2.572$, $p = 0.0807$).

4.4 Resumen de los resultados del experimento 1

Estriado Dorsolateral								
Consolidación (6 horas)					Memoria de Largo Plazo (24 horas)			
	Contexto	Choque	Moderado	Alto	Contexto	Choque	Moderado	Alto
Total	↑	-	↑	↑ ⁺	↑	-	↑	↑ ⁺
Larga	-	-	↓	↓	↓	-	↓	↓
Hongo	↓	-	↑	↑ ⁺	↑	-	↑	↑
Corta	-	-	-	-	-	-	-	-
Estriado Dorsomedial								
Consolidación (6 horas)					Memoria de Largo Plazo (24 horas)			
	Contexto	Choque	Moderado	Alto	Contexto	Choque	Moderado	Alto
Total	↑	-	↑	↑ ⁺	↑	-	↑	↑
Larga	↓	-	↓	↓	↓	-	↓	↓ ⁺
Hongo	↑	-	↑	↑ ⁺	↑	-	↑	↑ ⁺
Corta	-	-	-	-	-	-	-	-
Núcleo accumbens core								
Consolidación (6 horas)					Memoria de Largo Plazo (24 horas)			
	Contexto	Choque	Moderado	Alto	Contexto	Choque	Moderado	Alto
Total	-	-	-	↑	-	-	-	↑
Larga	-	↓	↓	↓	-	↓	↓	↓
Hongo	-	↑	↑	↑	-	↑	↑	↑
Corta	-	-	-	-	-	-	-	-
Núcleo accumbens shell								
Consolidación (6 horas)					Memoria de Largo Plazo (24 horas)			
	Contexto	Choque	Moderado	Alto	Contexto	Choque	Moderado	Alto
Total	-	↑	↑	↑ ⁺	-	-	-	↑
Larga	-	↓	↓	↓	-	↓	↓	↓
Hongo	-	↑	↑	↑	-	↑	↑	↑
Corta	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 2. Resumen de los resultados obtenidos en la densidad total de espinas dendríticas y en la proporción de espinas tipo larga, hongo y corta en el estriado dorsomedial, dorsolateral, accumbens core y shell durante la consolidación y la memoria de largo plazo de la tarea de evitación inhibitoria. Se muestra con flechas el cambio con respecto al grupo intacto y el símbolo + indica que el cambio es mayor con respecto al grupo 1.0 mA.

5. Discusión

Los resultados observados durante el proceso de extinción indican que la intensidad de choque eléctrico más alta utilizada en el entrenamiento de la tarea de evitación inhibitoria induce un aprendizaje incrementado, es decir, el grupo entrenado con la intensidad de 3.0 mA muestra una alta resistencia a la extinción en comparación con ratas entrenadas con la intensidad de choque eléctrico moderada (1.0 mA), este fenómeno ya había sido reportado algunos trabajos previos de nuestro laboratorio (Prado-Alcalá et al., 1994; Garín-Aguilar et al., 2012).

El principal hallazgo en este experimento fue que el entrenamiento moderado de la tarea de evitación inhibitoria induce un incremento en la densidad total de espinas dendríticas y un aumento en la proporción de las espinas tipo hongo tanto en el estriado dorsomedial como en el estriado dorsolateral. El entrenamiento sobrerreforzado de esta tarea también produjo un mayor aumento en la densidad total de las espinas dendríticas en ambas regiones estriatales, así como el incremento en la proporción de espinas tipo hongo, el cual ocurrió únicamente en el estriado dorsomedial. Esta espinogénesis se produjo específicamente con la asociación del contexto con el choque eléctrico, ya que la exposición al contexto solo produjo muy pequeños cambios y el choque eléctrico por sí mismo no produjo ningún cambio en lo absoluto. Esto sugiere que estos cambios estructurales se deben al proceso de la memoria.

Tanto a las 6 horas como a las 24 horas después del entrenamiento, el incremento en la densidad total de las espinas dendríticas en las MSNs del estriado dorsolateral y dorsomedial fue directamente proporcional a la intensidad de choque eléctrico administrado durante el entrenamiento en la tarea de evitación inhibitoria (Fig. 16A, B). La exposición al contexto que provee la caja de condicionamiento sin la administración de choque eléctrico (grupo 0.0 mA) también incrementó la densidad total de las espinas dendríticas. Sin embargo, este aumento fue significativamente menor que los grupos de animales que fueron entrenados en la tarea. Interesantemente, el choque eléctrico por sí mismo no induce un cambio significativo en la densidad total de espinas dendríticas (grupo solo choque).

Tal como se esperaba, no se encontraron diferencias significativas en la densidad total de espinas dendríticas entre el estriado dorsolateral y dorsomedial. Esos resultados indican que las MSNs tanto del estriado dorsolateral como dorsomedial responden al procesamiento de información tanto del contexto como de procedimiento inducido por la experiencia de aprendizaje (Devan & White, 1999; Packard & Knowlton, 2002; White & McDonald, 2002). Por el contrario, el hallazgo que muestra que el choque por sí mismo no induce cambios en la densidad total de las espinas sugiere que las MSNs del estriado dorsal no están involucradas en el procesamiento información resultante de la estimulación aversiva no asociativa. Estos patrones en la dinámica de la formación de espinas dendríticas se observaron a las 6 horas después de la experiencia conductual y se mantuvo hasta por 24 horas, sugiriendo que los cambios estructurales relativamente tempranos producidos tanto por el aprendizaje contextual como procedimental son persistentes.

Un efecto completamente diferente fue observado en el núcleo accumbens. En el núcleo accumbens shell se observó un incremento en la densidad total de espinas dependiente de la intensidad después del entrenamiento en la tarea de evitación inhibitoria con el choque eléctrico de 1.0 mA y 3.0 mA, tanto 6 horas como 24 horas después de la adquisición de la tarea, tal como ocurrió en la región dorsal del estriado. También se observó un aumento significativo en la densidad total de espinas dendríticas en el intervalo de las 6 horas después de la estimulación con el choque eléctrico únicamente. Sin embargo, no se produjeron cambios en la densidad de espinas en el grupo expuesto únicamente al contexto (0.0 mA). Estos datos implican que la espinogénesis en el núcleo accumbens shell en los animales entrenados está relacionada principalmente a los efectos del choque eléctrico y no a los procesos asociativos que involucran el aprendizaje y la consolidación en la tarea de evitación inhibitoria. El único cambio encontrado en el núcleo accumbens core fue un aumento en la densidad total de las espinas dendríticas cuando el choque eléctrico de 3.0 mA fue administrado durante el entrenamiento de la tarea de evitación inhibitoria. Este resultado también sugiere que la espinogénesis que ocurre en esta región del núcleo accumbens no es sensible a la interacción compleja de estímulo-respuesta involucrada en la tarea (Fig. 16C, D), así como tampoco es sensible a la exposición al contexto.

En relación con los diferentes tipos de las espinas dendríticas analizadas en este trabajo, tres hallazgos fueron muy consistentes. Primero, en el estriado dorsolateral y dorsomedial se observó una reducción significativa en la proporción de las espinas dendríticas tipo larga en los grupos que fueron expuestos únicamente al contexto de la caja del condicionamiento (0.0 mA) y en aquellos que fueron entrenados con el choque eléctrico de 1.0 mA y 3.0 mA, tanto 6 horas como 24 horas después del entrenamiento. En contraste, en el estriado dorsomedial, la proporción de espinas tipo hongo aumentó significativamente en los grupos 0.0 mA, 1.0 mA y 3.0 mA, tanto 6 horas como 24 horas después del entrenamiento; este incremento fue dependiente de la intensidad de choque eléctrico que fue administrado, es decir, en el grupo entrenado con 3.0 mA se observó un mayor incremento que los demás grupos. También se encontró un aumento significativo en la proporción de las espinas dendríticas tipo hongo dependiente de la intensidad de choque eléctrico en el estriado dorsolateral, tanto en animales que exploraron el contexto como los que fueron entrenados con la intensidad de choque eléctrico de 1.0 mA y 3.0 mA durante el periodo de la consolidación. Sin embargo, en el estriado dorsolateral la proporción de espinas tipo hongo no difiere entre sí en los grupos 1.0 mA y 3.0 mA, es decir, el entrenamiento sobrerreforzado no induce espinogénesis en espinas hongo.

Cabe resaltar que el choque eléctrico sólo no produce cambios en el número de espinas tipo larga y hongo en las dos regiones dorsales del estriado. Estos datos concuerdan bien con la idea de que la formación de espinas dendríticas tipo larga están implicadas en el aprendizaje y que a medida que este proceso está dando paso a la consolidación, es decir, el almacenamiento de la información a largo plazo, se observó una disminución en las espinas largas y un aumento correlacionado con las espinas dendríticas tipo hongo. Tales efectos pueden estar involucrados en el almacenamiento de la memoria a largo plazo (Bourne y Harris, 2007; Hayashi y Majewska, 2005; Maiti, Manna, Ilavazhagan, Rossignol y Dunbar, 2015; Medvedev et al., 2014).

Segundo, la proporción de las espinas dendríticas tipo larga disminuyó significativamente tanto en el núcleo accumbens core como el shell en todos los grupos que recibieron un choque eléctrico, hayan sido entrenados o no, 6 horas y 24 horas después del entrenamiento. No se observaron cambios en la proporción de las espinas largas en los

grupos que no recibieron choque eléctrico (0.0 mA). La proporción de las espinas dendríticas tipo hongo aumentó significativamente en las dos regiones del núcleo accumbens, en todos los animales que recibieron choque eléctrico entrenados o no, tanto 6 horas como 24 horas después del entrenamiento en la tarea, pero no se observaron cambios en el grupo que no recibió choque eléctrico. Estos resultados sugieren que, como es el caso en la densidad total de las espinas en estas dos regiones, los cambios en las espinas tipo larga y hongo están relacionados al componente aversivo de la experiencia de aprendizaje, y no en el complejo proceso asociativo derivado de la interacción entre el contexto, el choque eléctrico y la ejecución motora involucrada en la tarea de evitación inhibitoria.

Tercero, en las dos regiones dorsales del estriado y en las dos regiones del núcleo accumbens, la proporción de las espinas dendríticas tipo corta mantuvo sin cambiar a pesar de las diferentes manipulaciones a las que han sido expuestos los animales. El papel de las espinas cortas, es desconocido aún, no obstante, se ha pensado que las espinas cortas regulan la excitabilidad neuronal (González-Burgos, 2012), pues se ha reportado que este tipo de espina facilita la difusión de los iones de calcio hacia la dendrita parental (Hayashi y Majewska, 2005).

La proporción de las espinas dendríticas tipo bifurcada aumentó en el estriado dorsomedial después del entrenamiento con la intensidad de choque eléctrico más alta únicamente, tanto a las 6 horas como a las 24 horas. Esto también ocurrió en el estriado dorsolateral donde, adicionalmente, hubo un incremento en las espinas bifurcadas en el grupo que fue entrenado con 1.0 mA en el intervalo de 6 horas. Estos resultados indican que en entrenamiento en la tarea de evitación inhibitoria con alta intensidad de choque eléctrico, pero no, la exposición al contexto o la administración de choque eléctrico solamente induce la formación de este tipo de espinas en las dos regiones del estriado dorsal. Por lo tanto, en estas regiones estriatales las espinas dendríticas bifurcadas pudieran estar participando en la actividad aferente derivada del proceso asociativo involucrado en el aprendizaje incrementado.

En lo que respecta al núcleo accumbens core, la proporción de espinas bifurcadas incrementó después del entrenamiento con 1.0 mA y 3.0 mA, así como el grupo que recibió

el choque eléctrico solamente, pero la exposición al contexto por sí mismo no modificó la proporción de este tipo de espinas. Estos resultados podrían sugerir que las espinas bifurcadas en el núcleo accumbens core pueden estar participando en la memoria de evitación inhibitoria, en efecto este tipo de espinas fue aumentada por el choque eléctrico, pero no ocurrió en la exposición al contexto. Sorprendentemente, la proporción de las espinas bifurcadas en el núcleo accumbens shell no cambió en ninguna de las manipulaciones experimentales.

La dinámica en la formación de las espinas dendríticas tipo multi-cabeza mostraron una alta variabilidad. Hubo un incremento en este tipo de espinas en el estriado dorsolateral 24 horas después del entrenamiento en la tarea de evitación inhibitoria con un choque eléctrico de 1.0 mA; 6 y 24 horas después del entrenamiento con el choque eléctrico de 3.0 mA y 24 horas después de la exploración del contexto (0.0 mA). Estos mismos resultados fueron encontrados en el estriado dorsomedial, a excepción que la proporción de las espinas multi-cabeza no cambiaron ante la exposición del contexto (0.0 mA). El choque eléctrico por sí solo no es capaz de producir un cambio en la proporción de este tipo de espinas. Por lo tanto, se puede observar la formación de espinas multi-cabeza cuando la memoria de largo plazo ya ha sido formada después del entrenamiento moderado e incrementado, pero solo el entrenamiento incrementado es capaz de promover la espinogénesis de este tipo de espinas durante la consolidación.

La proporción de espinas multi-cabeza en el núcleo accumbens core no cambió 6 horas después del entrenamiento de los grupos 0.0 mA y solo choque, el aumento en esta proporción ocurrió en los animales entrenados con la intensidad de choque eléctrico de 1.0 mA y 3.0 mA; 24 horas después del entrenamiento, la proporción de espinas multi-cabeza aumentó en el grupo de exploración al contexto (0.0 mA) y entrenado con el choque eléctrico de 3.0 mA. Una característica notable de las espinas multi-cabeza en el núcleo accumbens core fue que a diferencia de los otros tipos de espinas dendríticas en esta región y en el núcleo accumbens shell, su proporción no cambió como consecuencia de la administración del choque eléctrico únicamente. Sin embargo, la proporción de estas espinas aumentó después de la exposición del contexto y después del entrenamiento con la intensidad de choque eléctrico baja y alta. Por tanto, es posible que la formación de espinas multi-cabeza nuevas puede subyacer la supuesta participación del núcleo accumbens en la formación de

la memoria de eventos aversivos (Roitman, Wheeler, Tiesinga, Roitman, & Carelli, 2010; Ventura, Morrone, & Puglisi-Allegra, 2007; Yamaguchi et al., 2015). En vista de la falta de consistencia en la dinámica mostrada por las espinas dendríticas tipo multi-cabeza, es difícil en este momento determinar la función de este tipo de espinas en la formación de la memoria.

Una premisa importante que subyace este estudio es que el estriado dorsal participa en la integración de la información derivada de la experiencia de aprendizaje, provista por varias estructuras cerebrales. En general, se cumplieron las expectativas de este estudio, es decir, que tanto las regiones dorsomedial y dorsolateral del estriado mostrarían los mismos patrones de la dinámica en la formación de espinas dendríticas después del entrenamiento en la tarea de evitación inhibitoria, por ejemplo, el aprendizaje fuerte induce un aumento en la densidad total de las espinas que un aprendizaje débil. También, hubo un incremento en la proporción de espinas tipo hongo en esas dos regiones. Las espinas dendríticas tipo hongo son más estables, pueden persistir por meses (Holtmaat et al., 2005; Zuo et al., 2005). Esto se debe a que tienen el volumen de la cabeza mucho mayor que los otros tipos de espinas dendríticas lo cual correlaciona positivamente con el área de PSD (post-synaptic density) (Harris & Stevens, 1988), el número de vesículas presinápticas (Harris & Stevens, 1988), el tamaño de la zona activa presináptica (Schikorski & Stevens, 1999), receptores post-sinápticos (Nusser et al., 1998) y la corriente inyectada en la sinapsis (Nusser et al., 1997); todos estos elementos son importantes para generar modificaciones a muy largo plazo en la eficiencia de las señales excitatorias, de esta manera apoya la noción que las espinas tipo hongo representa el sustrato físico de la memoria de largo plazo.

Como se mencionó previamente, tanto en el estriado dorsomedial como dorsolateral la proporción de espinas hongo aumentó conforme aumento la fuerza del aprendizaje dada por la intensidad de choque eléctrico con la que se entrenaron los animales, este incremento fue observado durante la consolidación, indicando que la transferencia de la memoria de corto plazo a la memoria de largo plazo es facilitada en el entrenamiento sobrerreforzado.

Por otro lado, se encontró una importante diferencia entre el estriado dorsomedial y dorsolateral en relación a la dinámica de las espinas dendríticas tipo hongo durante la

memoria de largo plazo. Mientras que en la primera, el entrenamiento con la intensidad de choque eléctrico alta induce una alta proporción de este tipo de espinas que el entrenamiento con la intensidad de choque eléctrico moderada, en el estriado dorsolateral, la intensidad de choque eléctrico alta no produce un aumento mayor en la proporción de estas espinas que el entrenamiento con la intensidad de choque moderada. Este resultado diferencial puede deberse a los diferentes tipos de aprendizaje en el que estas regiones participan (contextual/espacial vs. procedimiento), así como también en la conectividad diferencial entre estas dos. El estriado dorsomedial recibe fibras directamente o indirectamente del hipocampo dorsal y la corteza prefrontal medial, mientras que el estriado dorsolateral recibe fibras de las áreas corticales somato-sensoriales y motoras (McGeorge & Faull, 1989).

Es razonable postular que en el animal intacto, a medida que la intensidad del entrenamiento es incrementada se produce una asociación más fuerte entre el contexto y la estimulación aversiva, dada por un aumento en la activación sináptica glutamatérgica proveniente del hipocampo y la corteza prefrontal sobre las neuronas medianas espinosas del estriado dorsomedial, esto a su vez, promueve el aumento en la formación de las espinas tipo hongo mayor al que ocurre en el aprendizaje moderado. Simultáneamente, la activación de los receptores a glucocorticoides dependientes de estrés activa vías de señalización dependientes de quinasas, como resultado de esto se promueve la espinogénesis tipo hongo en un periodo de tiempo apropiado (< 6 h). Cuando la actividad normal del estriado dorsal es interrumpida, por ejemplo, la administración de bloqueadores de los canales de sodio, que bloquean la actividad sináptica, se observa un estado amnésico en los animales que fueron entrenados con un choque eléctrico moderado. Sin embargo, con el mismo tratamiento que produce amnesia, la consolidación puede llevarse a cabo después de un entrenamiento sobrerreforzado debido a que la mayor liberación de corticosterona promueve un incremento en la formación de espinas tipo hongo por la vía no genómica.

En el caso del estriado dorsolateral, el aumento en la proporción de las espinas tipo hongo fue producido por el entrenamiento moderado en la tarea de evitación inhibitoria, indicando que una sola asociación estímulo-respuesta es suficiente para inducir cambios en la espinogénesis tipo hongo. El incremento en la intensidad del entrenamiento no induce un

incremento adicional en las espinas tipo hongo en el estriado dorsolateral, esto puede ser, porque no había un aumento adicional en la entrada de información proveniente de la neocorteza. Se puede hipotetizar que sesiones adicionales en la tarea de evitación inhibitoria, es decir, un alto número de asociaciones estímulo-respuesta, podrían producir un tipo de respuesta de hábito, la cual es una característica del aprendizaje de procedimiento. Así, después de los ensayos adicionales de entrenamiento, podría incrementar la proporción de espinas tipo hongo en el estriado dorsolateral inducido por una alta activación de las conexiones cortico-estriatales. En trabajos previos del laboratorio, en donde tanto gatos como ratas fueron entrenados para ejecutar una respuesta instrumental de palanqueo, se mostró que la infusión de bloqueadores colinérgicos (Prado-Alcalá, Kaufmann, & Moscona, 1980) o bloqueadores de canales de sodio (Prado-Alcalá & Cobos-Zapíaín, 1979) en el núcleo caudado y en el estriado dorsal, respectivamente, produjeron amnesia cuando fueron tratados durante una fase temprana del aprendizaje, pero este déficit no fue observado en animales en los que aumentaron el número de ensayos de aprendizaje, es decir, cuando la respuesta llega a ser un hábito. Por esto, se puede hipotetizar que este entrenamiento extendido podría inducir un incremento en la densidad total de espinas dendríticas y en la proporción de espinas tipo hongo en el estriado dorsolateral, al menos en ratas.

Todos estos hallazgos también pueden sugerir que un incremento en la espinogénesis producido por el entrenamiento sobrerreforzado participa en la consolidación de la memoria y la transferencia de información relacionada con el aprendizaje incrementado del estriado dorsomedial a otras regiones cerebrales es facilitada por el consistente incremento en la densidad total de las espinas dendríticas y la proporción de espinas tipo hongo en las neuronas medianas espinosas y este aumento en la espinogénesis podría explicar el efecto protector contra los tratamientos amnésicos. Estos mecanismos deberían ser relevantes para entender porque memorias altamente emotivas, tal como el desorden de estrés post-traumático son tan duraderas y persistentes.

VII. EXPERIMENTO 2: Cambios estructurales producidos durante la evocación de la memoria de evitación inhibitoria moderada o sobrerreforzada, en el estriado dorsal y núcleo accumbens

1. Hipótesis

1.1 Habrá un aumento en la **densidad total** de espinas dendríticas en las MSNs del **estriado dorsal** durante la evocación de la memoria sobrerreforzada en comparación con el entrenamiento moderado en la tarea de evitación inhibitoria.

1.2 Habrá un aumento en la **proporción de las espinas tipo hongo** en las MSNs del **estriado dorsal** durante la evocación de la memoria sobrerreforzada en comparación con el entrenamiento moderado en la tarea de evitación inhibitoria.

1.3 Habrá un aumento en la **densidad total** de espinas dendríticas en las MSNs **núcleo accumbens** durante la evocación de la memoria, asociado al estímulo aversivo en la tarea de evitación inhibitoria.

1.4 Habrá un aumento en la **proporción de las espinas tipo hongo** en las MSNs del **núcleo accumbens** durante la evocación de la memoria asociado al estímulo aversivo en la tarea de evitación inhibitoria.

2. Objetivos

2.1 Cuantificar la densidad total de las espinas dendríticas de las MSNs producidas en el estriado dorsal durante la evocación de la memoria de evitación inhibitoria moderada y sobrerreforzada.

2.2 Cuantificar la densidad total de las espinas dendríticas de las MSNs producidas en el núcleo accumbens durante la evocación de la memoria de evitación inhibitoria moderada y sobrerreforzada.

2.3 Calcular la proporción de las espinas dendríticas tipo larga, corta, hongo, bifurcada y multi-cabeza producidas en el estriado dorsal durante la evocación de la memoria de evitación inhibitoria moderada y sobrerreforzada.

2.4 Calcular la proporción de las espinas dendríticas tipo larga, corta, hongo, bifurcada y multi-cabeza producidas en el núcleo accumbens durante la evocación de la memoria de evitación inhibitoria moderada y sobrerreforzada.

3. Método y diseño experimental

Se utilizaron 38 ratas macho de la cepa wistar, las cuales fueron distribuidas en cinco grupos experimentales: Dos grupos de ratas fueron entrenadas en la tarea de evitación inhibitoria con un choque eléctrico de 1.0 (n = 10) o 3.0 mA (n = 10); el tercer grupo fue entrenado sin administrar el choque eléctrico (0.0 mA; n = 10), con el fin de tener un grupo que únicamente sea expuesto al contexto; a el cuarto grupo se le administró la intensidad más alta de choque eléctrico únicamente en el compartimento oscuro (Sch; n = 4), el choque de 3.0 mA fue administrado durante 5.6 s, este tiempo es equivalente al tiempo que recibieron el choque el grupo entrenado con 3.0 mA y el quinto grupo fueron animales que no fueron sometidos a ninguna experiencia, únicamente permanecieron en condiciones de bioterio (INT; n = 4) hasta el procedimiento de la perfusión, el cual ocurrió en el mismo tiempo en el que se perfundieron los animales de los demás grupos.

Las ratas de los diferentes grupos fueron entrenados, 24 horas después fueron sometidas a la prueba de retención y 6 horas más tarde fueron perfundidas para la obtención del tejido cerebral y de esta manera poder observar los posibles cambios en las espinas dendríticas asociados con el proceso de evocación de la memoria de evitación inhibitoria.

Para el análisis histológico, se seleccionaron cuatro ratas por grupo experimental (entrenados en la tarea de evitación inhibitoria: 1.0 mA y 3.0 mA), el criterio de selección se

basó en la ejecución de la conducta de cada una de las ratas, solo se incluyeron las ratas con latencia de retención superior a 500 s.

Los cerebros obtenidos fueron teñidos con la tinción Golgi-Cox, se hicieron cortes coronales de 200 μm de grosor. Se analizaron con un objetivo de 100x, un total de 800 neuronas: 5 neuronas por hemisferio x 4 regiones cerebrales x 5 grupos experimentales x 4 ratas por grupo. Se cuantificaron las espinas dendríticas tipo larga, hongo, corta, bifurcada, multi-cabeza y otras. Se calculó la densidad total de las espinas dendríticas y la proporción de cada tipo de espina dendrítica.

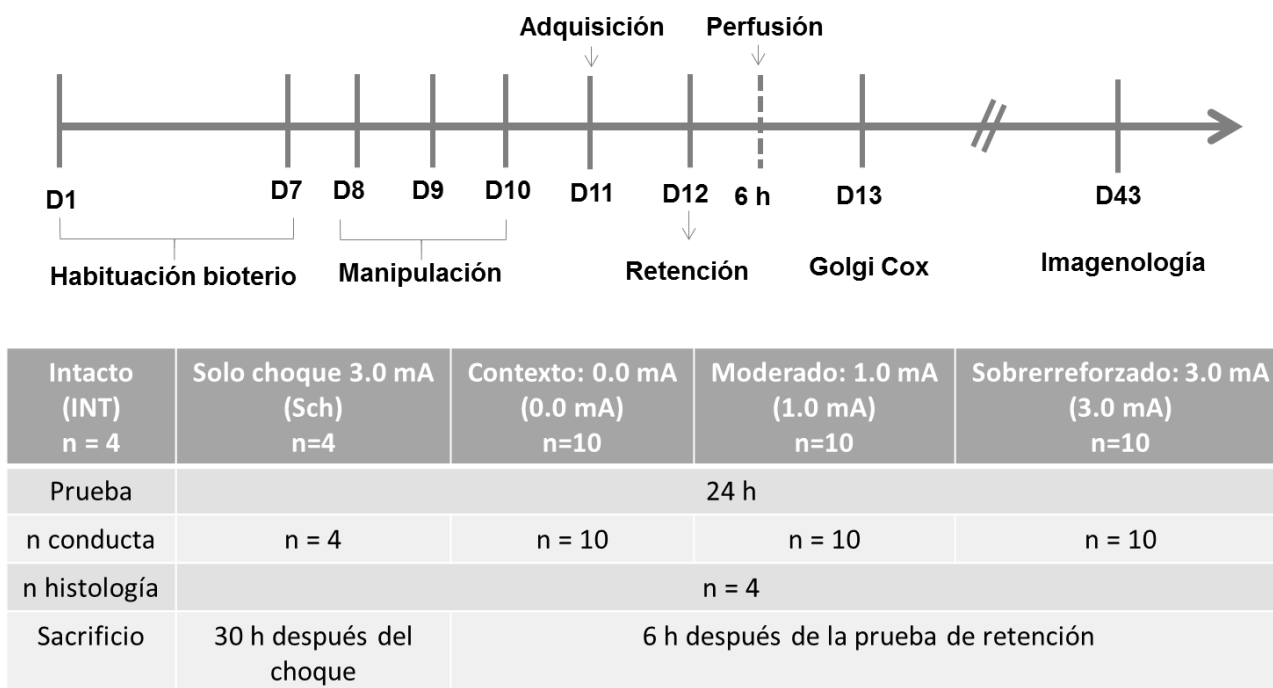


Figura 21. Diseño experimental experimento 2. En la parte superior se muestra la línea temporal del desarrollo del experimento, en donde se especifica el orden de cada una de las etapas del experimento 2. En la parte inferior se observa el diseño experimental y n utilizada en cada uno de los grupos experimentales.

El análisis estadístico para la conducta se realizó tal como se describe en el método general. Para el análisis estadístico la densidad total y la proporción de cada tipo de espinas dendríticas, se utilizó una ANOVA de una vía por cada intervalo temporal (6 h o 24 h) en donde se compararon los grupos INT, Sch, 0.0 mA, 1.0 mA y 3.0 mA.

4. Resultados

4.1 Conducta

En la latencia de entrada al compartimento oscuro durante el entrenamiento de la tarea de evitación inhibitoria no es diferente estadísticamente entre los grupos 0.0 mA, 1.0 mA y 3.0 mA ($H_{(2)} = 0.3919$, $p = 0.8221$), cuya mediana fue de 30 s (0.0 mA), 28 s (1.0 mA) y 30 s (3.0 mA) respectivamente (Fig. 22A). Sin embargo, una vez administrado el choque eléctrico de diferente intensidad según fue el caso, la latencia de escape es diferente entre grupos ($H_{(2)} = 19.84$, $p = 0.8221$). La prueba U-Mann Whitney reporta diferencias significativas entre 0.0 mA y 1.0 mA ($p = 0.0002$), 0.0 mA y 3.0 mA ($p < 0.0001$), pero no es diferente 1.0 mA y 3.0 mA ($p = 0.0967$) (Fig. 22B).

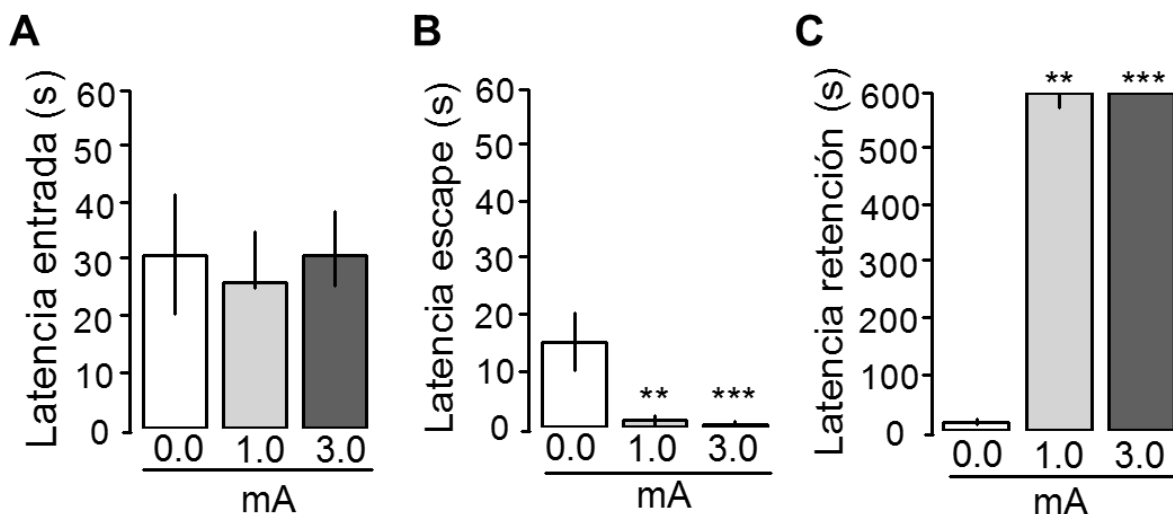


Figura 22. Resultados conductuales, tarea de evitación inhibitoria. **A.** Latencia de entrada de grupos de ratas entrenados en la tarea de evitación inhibitoria. **B.** Latencia de escape. **C.** Latencia de retención evaluada 24 h después de la sesión de entrenamiento. Todas las mediciones se muestran en medianas con rangos intercuartiles. ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$ vs el grupo 0.0 mA. $n = 10$ por grupo.

En la latencia de retención, la cual fue registrada después del entrenamiento, la prueba Kruskal Wallis mostró diferencias significativas entre los grupos 0.0 mA, 1.0 mA y 3.0 mA ($H_{(2)} = 25.01$, $p < 0.0001$). El post hoc U de Mann Whitney reporta diferencias

significativas entre 0.0 mA y 1.0 mA ($p = 0.0001$), 0.0 mA y 3.0 mA ($p < 0.0001$), pero no entre 1.0 mA y 3.0 mA ($p = 0.1681$) (Fig. 22C).

4.2 Densidad total de espinas dendríticas de las MSNs del estriado dorsal y núcleo accumbens

En la figura 12 se muestra un ejemplo del estriado dorsal (dorsolateral y dorsomedial) y ventral (núcleo accumbens core y shell) teñidos con la técnica Golgi-Cox; cada región tiene un acercamiento en el que se muestra una neurona mediana espinosa representativa; también se muestra los diferentes tipos de espinas dendríticas que fueron cuantificados (larga, hongo, corta bifurcada y multi-cabeza).

4.2.1 Estriado dorsolateral

La densidad de espinas dendríticas producidas en la evocación de la memoria de evitación inhibitoria en las neuronas espinosas medianas en la región dorsolateral son significativamente diferentes entre grupos (ANOVA, $F_{(4,15)} = 26.248$, $p < 0.0001$); el post hoc Bonferroni reporta diferencias significativas entre el grupo intacto y los grupos 0.0 mA ($p = 0.0003$), 1.0 mA ($p < 0.0001$) y 3.0 mA ($p < 0.0001$). Sin embargo, no hay diferencias significativas entre el grupo intacto y Sch ($p = 0.1534$) (Fig. 23A).

El grupo 0.0 mA es diferente estadísticamente del grupo 3.0 mA ($p = 0.0007$) y Sch ($p = 0.0060$). Pero no es diferente de 1.0 mA ($p = 0.1208$). También se observan diferencias significativas en el grupo 1.0 mA con respecto 3.0 mA ($p = 0.0189$) y Sch ($p = 0.0002$); el grupo 3.0 mA es diferente de Sch ($p < 0.0001$) (Fig. 23A).

4.2.2 Estriado dorsomedial

La densidad de espinas dendríticas producidas en la evocación de la memoria de evitación inhibitoria en las neuronas espinosas medianas en la región dorsomedial son

significativamente diferentes entre grupos (ANOVA, $F_{(4,15)} = 33.530$, $p < 0.0001$); el post hoc Bonferroni reporta diferencias significativas entre el grupo intacto y los grupos 0.0 mA ($p = 0.0016$), 1.0 mA ($p < 0.0001$), 3.0 mA ($p < 0.0001$). Sin embargo, no hay diferencias significativas entre el grupo intacto y Sch ($p = 0.0928$) (Fig. 23B).

El grupo 0.0 mA es diferente estadísticamente del grupo 1.0 mA ($p = 0.0054$) y 3.0 mA ($p < 0.0001$), pero no es diferente de Sch ($p = 0.1788$). También se observan diferencias significativas en el grupo 1.0 mA con respecto 3.0 mA ($p = 0.0012$) y Sch ($p = 0.0012$); el grupo 3.0 mA es diferente de Sch ($p < 0.0001$) (Fig. 23B).

4.2.3 Núcleo accumbens core

La densidad de espinas dendríticas producidas en la evocación de la memoria de evitación inhibitoria en las neuronas espinosas medianas en el núcleo accumbens core son significativamente diferentes entre grupos (ANOVA, $F_{(4,15)} = 6.030$, $p = 0.0042$); el post hoc Bonferroni reporta diferencias significativas entre el grupo intacto y los grupos 1.0 mA ($p = 0.0133$) y 3.0 mA ($p = 0.0005$). Sin embargo, no hay diferencias significativas entre el grupo intacto y 0.0 mA ($p = 0.2231$) y Sch ($p = 0.3022$) (Fig. 23C).

El grupo 0.0 mA es diferente estadísticamente del grupo 3.0 mA ($p = 0.0061$); pero no es diferente de 1.0 mA ($p = 0.1460$) ni de Sch ($p = 0.1460$). Tampoco se observan diferencias significativas en el grupo 1.0 mA con respecto 3.0 mA ($p = 0.1188$) y Sch ($p = 0.1030$). Sin embargo, el grupo 3.0 mA es diferente de Sch ($p = 0.0040$) (Fig. 23C).

4.2.4 Núcleo accumbens shell

La densidad de espinas dendríticas producidas en la evocación de la memoria de evitación inhibitoria en las neuronas espinosas medianas en el núcleo accumbens shell son significativamente diferentes entre grupos (ANOVA, $F_{(4,15)} = 11.796$, $p = 0.0002$); el post hoc Bonferroni reporta diferencias significativas entre el grupo intacto y los grupos 0.0 mA ($p = 0.0018$), 1.0 mA ($p = 0.0004$), 3.0 mA ($p < 0.0001$) y Sch ($p = 0.0406$) (Fig. 23D).

El grupo 0.0 mA es diferente estadísticamente del grupo 3.0 mA ($p = 0.0190$); pero no es diferente de 1.0 mA ($p = 0.4615$) y Sch ($p = 0.1205$). Tampoco se observan diferencias significativas en el grupo 1.0 mA con respecto 3.0 mA ($p = 0.0806$); pero si difiere de Sch ($p = 0.0297$). También es diferente el grupo 3.0 mA de Sch ($p = 0.0007$) (Fig. 23D).

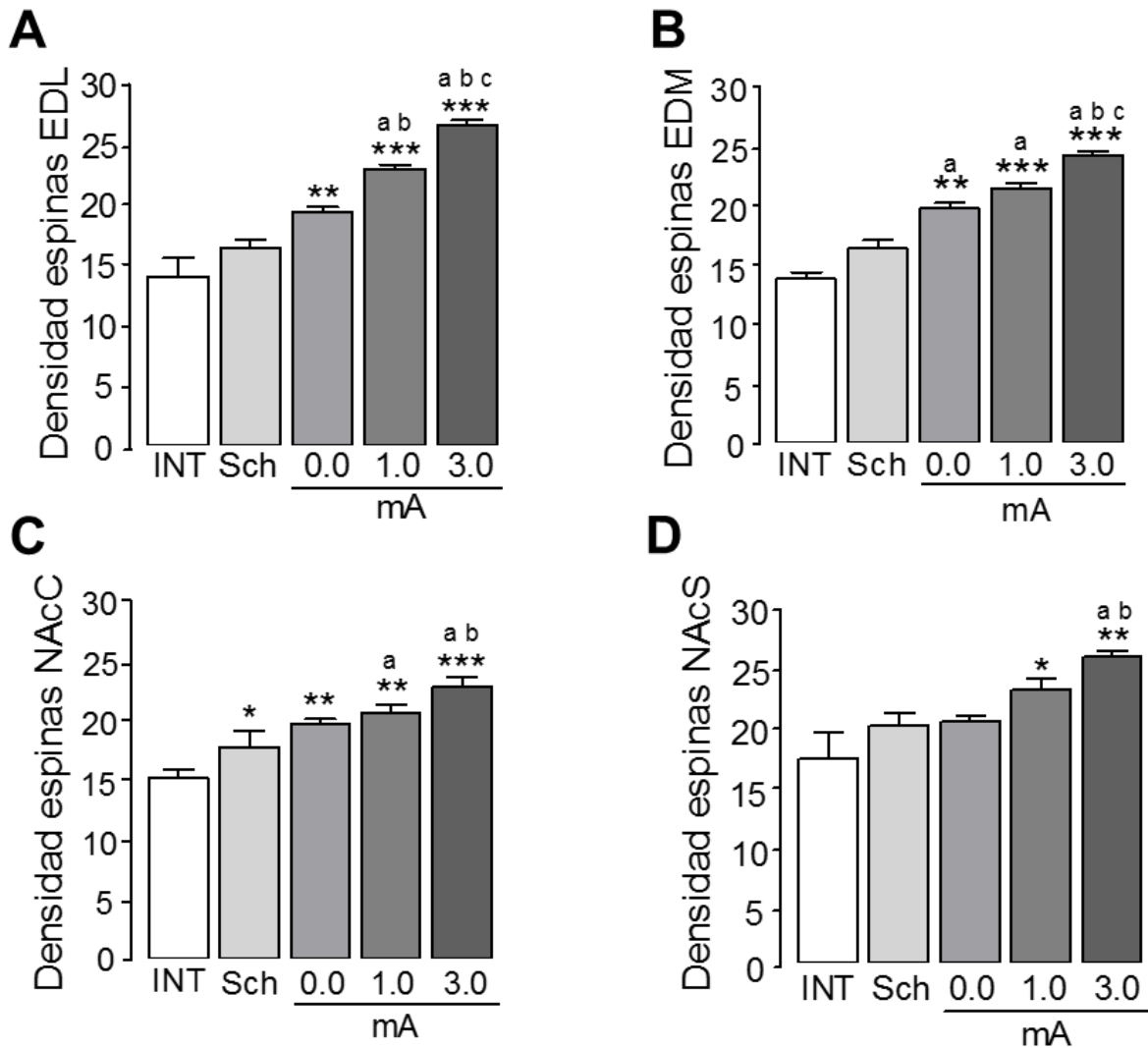


Figura 23. Densidad total de espinas dendríticas en el estriado dorsal y ventral observadas durante la evocación de la memoria. **A.** Estriado dorsolateral; **B.** Estriado dorsomedial; **C.** Núcleo accumbens core; **D.** Núcleo accumbens shell. INT, intacto; Sch, Solo choque de 3.0 mA; grupos entrenados con choque eléctrico de 0.0 mA, 1.0 mA y 3.0 mA respectivamente. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$ vs INT. ^a $p < 0.05$ a 0.0001 vs Sch; ^b $p < 0.05$ a 0.0001 vs 0.0 mA. ^c $p < 0.05$ a 0.0001 vs 1.0 mA. Cada barra representa promedio \pm error estándar de 40 MSNs, obtenidas de cuatro ratas en cada condición.

4.3 Morfología de las espinas dendríticas de las MSN del estriado dorsal y núcleo accumbens

A continuación se describen los resultados obtenidos por tipo de espina dendrítica en cada una de las regiones del estriado dorsal y ventral.

4.3.1 Estriado dorsolateral

4.3.1.1 Espinas dendríticas tipo larga en el estriado dorsolateral

La proporción de espinas dendríticas tipo larga producidas en la evocación de la memoria de evitación inhibitoria en las neuronas espinosas medianas en la región dorsolateral son significativamente diferentes entre grupos (ANOVA, $F_{(4,15)} = 38.723$, $p < 0.0001$); el post hoc Bonferroni reporta diferencias significativas entre el grupo intacto y los grupos 1.0 mA ($p < 0.0001$), 3.0 mA ($p < 0.0001$). Sin embargo, el grupo intacto no es diferente significativamente de 0.0 mA ($p = 0.1166$) y Sch ($p = 0.1073$) (Fig. 24A).

El grupo 0.0 mA es diferente estadísticamente del grupo 1.0 mA ($p < 0.0001$) y 3.0 mA ($p < 0.0001$) y Sch ($p = 0.0041$). También se observan diferencias significativas en el grupo 1.0 mA con respecto a Sch ($p < 0.0001$); pero no es diferente de 3.0 mA ($p = 0.2202$); el grupo 3.0 mA es diferente estadísticamente de Sch ($p < 0.0001$) (Fig. 24A).

4.3.1.2 Espinas dendríticas tipo hongo en el estriado dorsolateral

La proporción de espinas dendríticas tipo hongo producidas en la evocación de la memoria de evitación inhibitoria en las neuronas espinosas medianas en la región dorsolateral son significativamente diferentes entre grupos (ANOVA, $F_{(4,15)} = 75.916$, $p < 0.0001$); el post hoc Bonferroni reporta diferencias significativas entre el grupo intacto y los grupos 0.0 mA ($p = 0.0112$), 1.0 mA ($p < 0.0001$) y 3.0 mA ($p < 0.0001$). Sin embargo, no hay diferencias significativas entre el grupo intacto y Sch ($p = 0.7767$) (Fig. 24B).

El grupo 0.0 mA es diferente estadísticamente del grupo 1.0 mA ($p < 0.0001$), 3.0 mA ($p < 0.0001$) y Sch ($p = 0.0062$). También se observan diferencias significativas en el grupo 1.0 mA con respecto 3.0 mA ($p < 0.0001$) y Sch ($p < 0.0001$); el grupo 3.0 mA es diferente de Sch ($p < 0.0001$) (Fig. 24B).

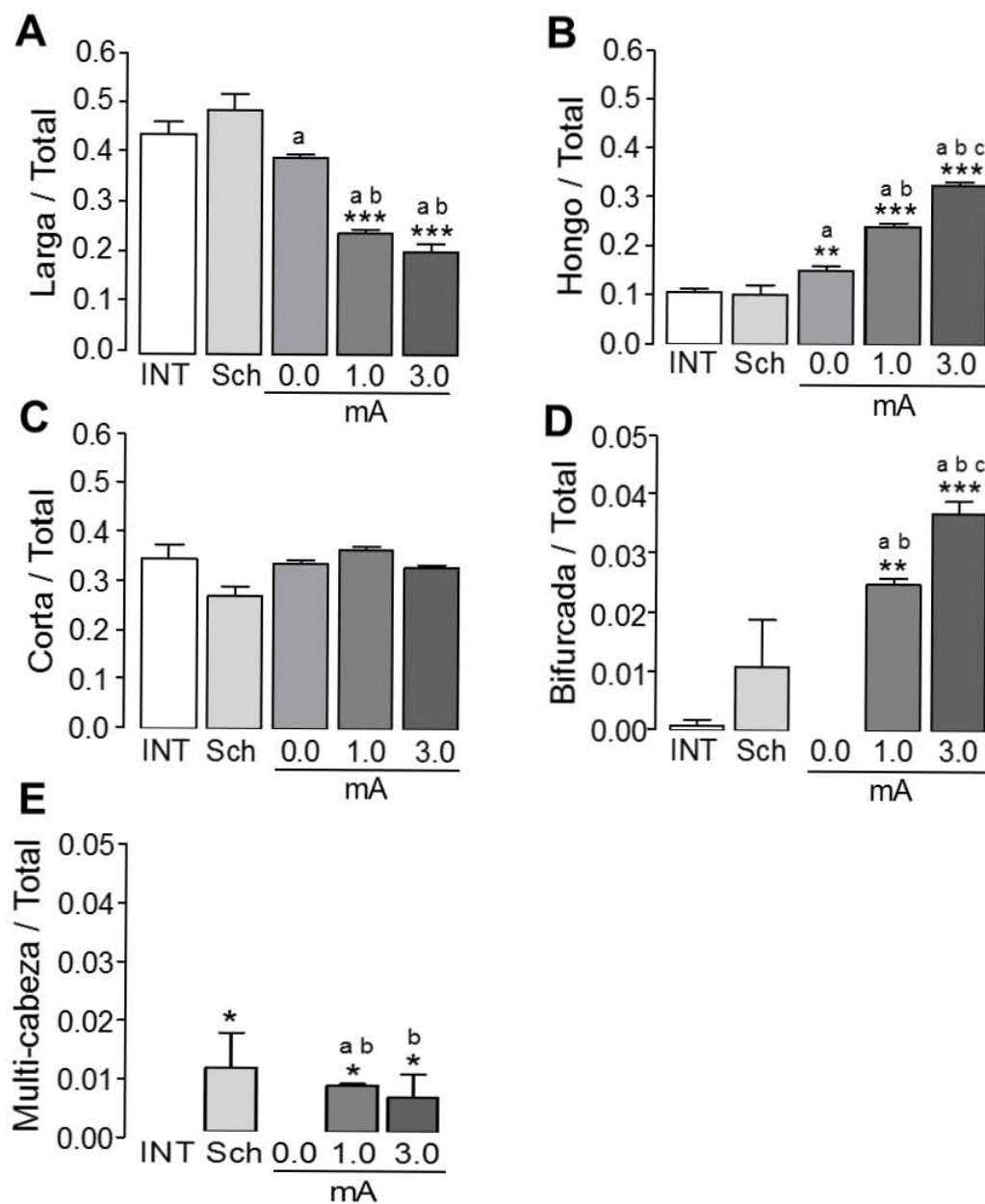


Figura 24. Tipos de espinas dendríticas en el estriado dorsolateral. **A.** Larga; **B.** Hongo; **C.** Corta; **D.** Bifurcada; **E.** Multi-cabeza. INT, intacto; Sch, Solo choque de 3.0 mA; grupos entrenados con choque eléctrico de 0.0 mA, 1.0 mA y 3.0 mA respectivamente. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$ vs INT; ^a $p < 0.05$, ^{aa} $p < 0.01$ entre grupos. Nota: diferentes escalas en las gráficas. Cada barra representa promedio \pm error estándar de 40 MSNs, obtenidas de cuatro ratas en cada condición.

4.1.3.3 Espinas dendríticas tipo corta en el estriado dorsolateral

La proporción de espinas dendríticas tipo corta producidas en la evocación en las neuronas espinosas medianas en la región dorsolateral no son significativamente diferentes entre grupos (ANOVA, $F_{(4,15)} = 1.983$, $p = 0.1566$) (Fig. 4C).

4.1.3.4 Espinas dendríticas tipo bifurcada en el estriado dorsolateral

La proporción de espinas dendríticas tipo bifurcada producidas en la evocación de la memoria de evitación inhibitoria en las neuronas espinosas medianas en la región dorsolateral son significativamente diferentes entre grupos (ANOVA, $F_{(4,15)} = 19.336$, $p < 0.0001$); el post hoc Bonferroni reporta diferencias significativas entre el grupo intacto y 1.0 mA ($p = 0.003$), 3.0 mA ($p < 0.0001$). Sin embargo, no hay diferencias significativas entre el grupo intacto y 0.0 mA ($p = 0.7989$) y Sch ($p = 0.0826$) (Fig. 24D).

El grupo 0.0 mA es diferente estadísticamente del grupo 1.0 mA ($p = 0.0002$) y 3.0 mA ($p < 0.0001$) pero no del grupo Sch ($p = 0.0512$). También se observan diferencias significativas en el grupo 1.0 mA con respecto 3.0 mA ($p = 0.0410$) y Sch ($p = 0.0124$); el grupo 3.0 mA es diferente de Sch ($p = 0.0001$) (Fig. 24D).

4.1.3.5 Espinas dendríticas tipo multi-cabeza en el estriado dorsolateral

La proporción de espinas dendríticas multi-cabeza producidas en la evocación de la memoria de evitación inhibitoria en las neuronas espinosas medianas en la región dorsolateral son significativamente diferentes entre grupos (ANOVA, $F_{(4,15)} = 3.508$, $p = 0.0327$); el post hoc Bonferroni reporta diferencias significativas entre el grupo intacto y 1.0 mA ($p = 0.0152$), 3.0 mA ($p = 0.0436$) y Sch ($p = 0.0405$). Sin embargo, no hay diferencias significativas entre el grupo intacto y 0.0 mA ($p > 0.05$) (Fig. 24E).

El grupo 0.0 mA es diferente estadísticamente del grupo 1.0 mA ($p = 0.0152$), 3.0 mA ($p = 0.0366$) y Sch ($p = 0.0405$). También se observan diferencias significativas en el grupo

1.0 mA con respecto Sch ($p = 0.0152$); pero no difiere de 3.0 mA ($p = 0.4735$); el grupo 3.0 mA no es diferente de Sch ($p = 0.0636$) (Fig. 24E).

4.1.3.6 Espinas dendríticas no clasificadas en el estriado dorsolateral

La proporción de espinas dendríticas tipo otras producidas en la evocación en las neuronas espinosas medianas en la región dorsolateral no son significativamente diferentes entre grupos (ANOVA, $F_{(4,15)} = 1.035$, $p = 0.4216$).

4.1.4 Estriado dorsomedial

4.1.4.1 Espinas dendríticas tipo larga en el estriado dorsomedial

La proporción de espinas dendríticas tipo larga producidas en la evocación de la memoria de evitación inhibitoria en las neuronas espinosas medianas en la región dorsomedial son significativamente diferentes entre grupos (ANOVA, $F_{(4,15)} = 55.893$, $p < 0.0001$); el post hoc Bonferroni reporta diferencias significativas entre el grupo intacto y los grupos 0.0 mA ($p = 0.0360$), 1.0 mA ($p < 0.0001$), 3.0 mA ($p < 0.0001$). Sin embargo, no hay diferencias significativas entre el grupo intacto y Sch ($p = 0.4881$) (Fig. 25A).

El grupo 0.0 mA es diferente estadísticamente del grupo 1.0 mA ($p < 0.0001$) y 3.0 mA ($p < 0.0001$), pero no es diferente de Sch ($p = 0.2532$). También se observan diferencias significativas en el grupo 1.0 mA con respecto 3.0 mA ($p = 0.0191$) y Sch ($p < 0.0001$); el grupo 3.0 mA es diferente de Sch ($p < 0.0001$) (Fig. 25A).

4.1.4.2 Espinas dendríticas tipo corta en el estriado dorsomedial

La proporción de espinas dendríticas tipo corta producidas en la evocación en las neuronas espinosas medianas en la región dorsomedial no son significativamente diferentes entre grupos (ANOVA, $F_{(4,15)} = 2.733$, $p = 0.0686$) (Fig. 25C).

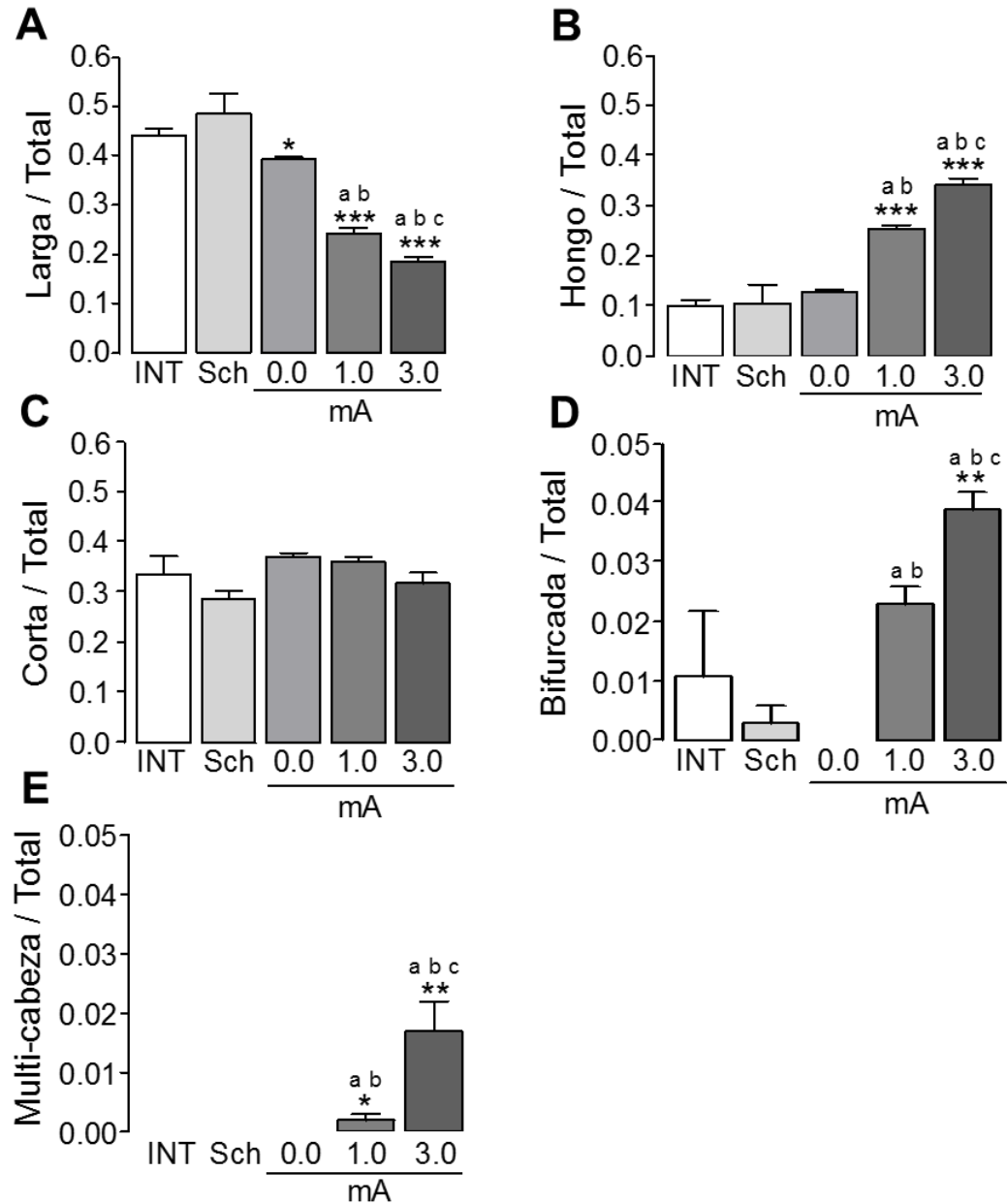


Figura 25. Tipos de espinas dendríticas en el estriado dorsomedial. **A.** Larga; **B.** Hongo; **C.** Corta; **D.** Bifurcada; **E.** Multi-cabeza. INT, intacto; Sch, Solo choque de 3.0 mA; grupos entrenados con choque eléctrico de 0.0 mA, 1.0 mA y 3.0 mA respectivamente. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$ vs INT; ^a $p < 0.05$, ^{aa} $p < 0.01$ entre grupos. Nota: diferentes escalas en las gráficas. Cada barra representa promedio \pm error estándar de 40 MSNs, obtenidas de cuatro ratas en cada condición.

4.1.4.3 Espinas dendríticas tipo bifurcada en el estriado dorsomedial

La proporción de espinas dendríticas tipo bifurcada producidas en la evocación de la memoria de evitación inhibitoria en las neuronas espinosas medianas en la región dorsomedial son significativamente diferentes entre grupos (ANOVA, $F_{(4,15)} = 9.673$, $p = 0.0004$); el post hoc Bonferroni reporta diferencias significativas entre el grupo intacto y 3.0 mA ($p = 0.0014$). Sin embargo, no hay diferencias significativas entre el grupo intacto y 0.0 mA ($p = 0.1719$), 1.0 mA ($p = 0.1104$) y Sch ($p = 0.3058$) (Fig. 25D).

El grupo 0.0 mA es diferente estadísticamente del grupo 1.0 mA ($p = 0.0069$) y 3.0 mA ($p < 0.0001$), pero no es diferente de Sch ($p = 0.7133$). También se observan diferencias significativas en el grupo 1.0 mA con respecto 3.0 mA ($p = 0.0436$) y Sch ($p = 0.0147$); el grupo 3.0 mA es diferente de Sch ($p = 0.0002$) (Fig. 25D).

4.1.4.4 Espinas dendríticas tipo multi-cabeza en el estriado dorsomedial

La proporción de espinas dendríticas multi-cabeza producidas en la evocación de la memoria de evitación inhibitoria en las neuronas espinosas medianas en la región dorsomedial son significativamente diferentes entre grupos (ANOVA, $F_{(4,15)} = 9.265$, $p = 0.0006$); el post hoc Bonferroni reporta diferencias significativas entre el grupo intacto y 1.0 mA ($p < 0.05$) y 3.0 mA ($p = 0.0014$). Sin embargo, no hay diferencias significativas entre el grupo intacto y 0.0 mA ($p = 0.1719$) y Sch ($p = 0.3058$) (Fig. 25E).

El grupo 0.0 mA es diferente estadísticamente del grupo 1.0 mA ($p < 0.05$) y 3.0 mA ($p = 0.0002$), pero no es diferente de Sch ($p = 0.0002$). También se observan diferencias significativas en el grupo 1.0 mA con respecto 3.0 mA ($p = 0.0007$) y Sch ($p < 0.05$); el grupo 3.0 mA es significativamente mayor que Sch ($p = 0.0002$) (Fig. 25E).

4.1.4.5 Espinas dendríticas no clasificadas en el estriado dorsomedial

La proporción de espinas dendríticas no clasificadas producidas en la evocación en las neuronas espinosas medianas en la región dorsomedial no son significativamente diferentes entre grupos (ANOVA, $F_{(4,15)} = 2.733$, $p = 0.0686$).

4.1.5 Núcleo accumbens core

4.1.5.1 Espinas dendríticas tipo larga en el núcleo accumbens core

La proporción de espinas dendríticas tipo larga producidas en la evocación de la memoria de evitación inhibitoria en las neuronas espinosas medianas en el núcleo accumbens core son significativamente diferentes entre grupos (ANOVA, $F_{(4,15)} = 16.979$, $p < 0.0001$); el post hoc Bonferroni reporta diferencias significativas entre el grupo intacto y los grupos 1.0 mA ($p = 0.0003$), 3.0 mA ($p < 0.0001$) y Sch ($p < 0.0001$). Sin embargo, el grupo intacto no es diferente significativamente de 0.0 mA ($p = 0.1010$) (Fig. 26A).

El grupo 0.0 mA es diferente estadísticamente del grupo 1.0 mA ($p = 0.0099$), 3.0 mA ($p = 0.0002$) y Sch ($p = 0.0003$). Sin embargo, no se observan diferencias significativas en el grupo 1.0 mA con respecto a 3.0 mA ($p = 0.0723$) y Sch ($p = 0.1192$); el grupo 3.0 mA no difiere estadísticamente de Sch ($p = 0.7825$) (Fig. 26A).

4.1.5.2 Espinas dendríticas tipo hongo en el núcleo accumbens core

La proporción de espinas dendríticas tipo hongo producidas en la evocación de la memoria de evitación inhibitoria en las neuronas espinosas medianas en el núcleo accumbens core son significativamente diferentes entre grupos (ANOVA, $F_{(4,15)} = 66.713$, $p < 0.0001$); el post hoc Bonferroni reporta diferencias significativas entre el grupo intacto y los grupos 1.0 mA ($p < 0.0001$), 3.0 mA ($p < 0.0001$) y Sch ($p < 0.0001$). Sin embargo, el grupo intacto no es diferente significativamente de 0.0 mA ($p = 0.1267$) (Fig. 26B).

El grupo 0.0 mA es diferente estadísticamente del grupo 1.0 mA ($p < 0.0001$), 3.0 mA ($p < 0.0001$) y Sch ($p < 0.0001$). También se observan diferencias significativas en el grupo 1.0 mA con respecto a 3.0 mA ($p = 0.0006$) y Sch ($p = 0.0002$); el grupo 3.0 mA no es diferente estadísticamente de Sch ($p = 0.5508$) (Fig. 26B).

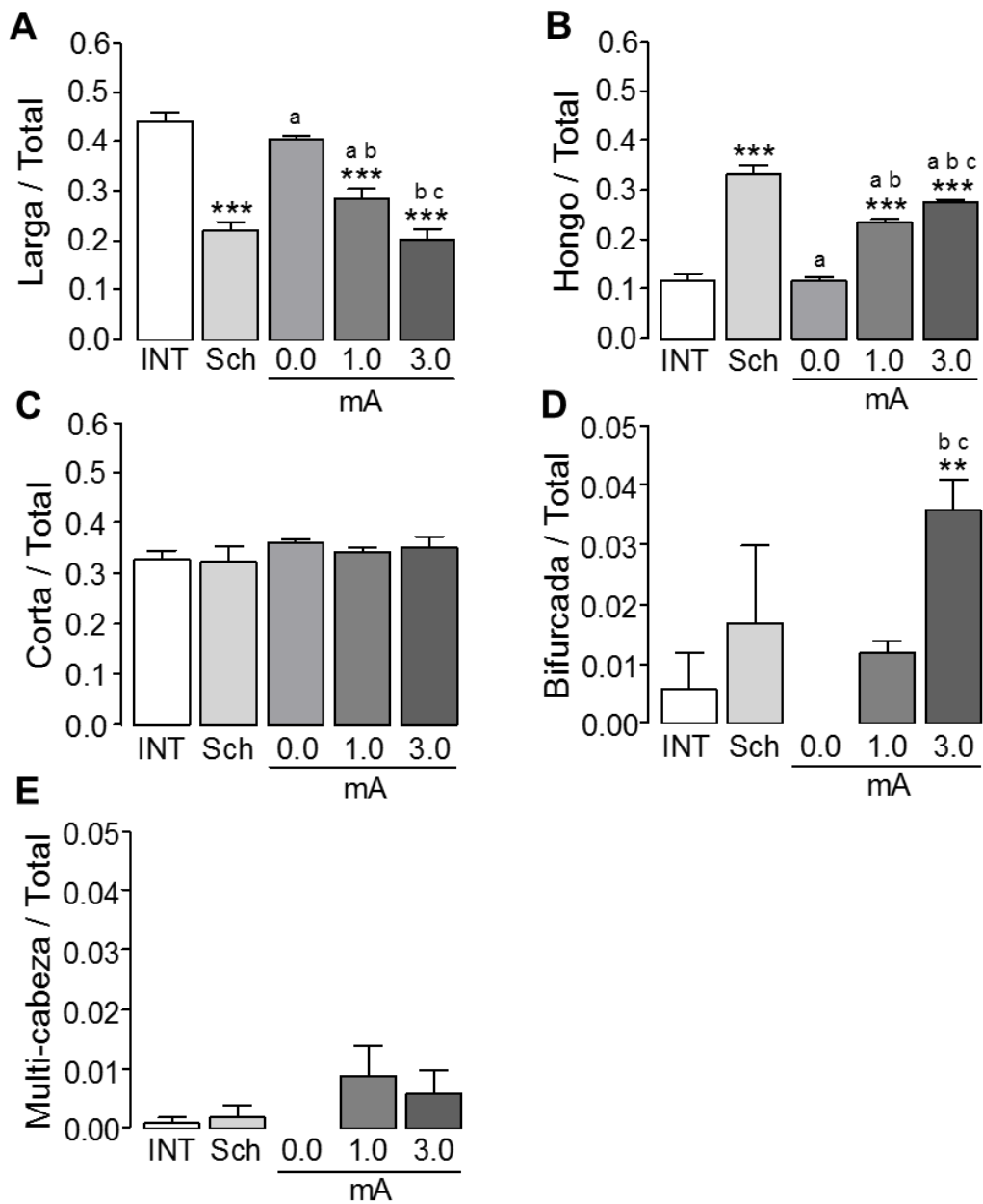


Figura 26. Tipos de espinas dendríticas en el núcleo accumbens core. **A.** Larga; **B.** Hongo; **C.** Corta; **D.** Bifurcada; **E.** Multi-cabeza. INT, intacto; Sch, Solo choque de 3.0 mA; grupos entrenados con choque eléctrico de 0.0 mA, 1.0 mA y 3.0 mA respectivamente. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$ vs INT; ^a $p < 0.05$, ^{aa} $p < 0.01$ entre grupos. Nota: diferentes escalas en las gráficas. Cada barra representa promedio \pm error estándar de 40 MSNs, obtenidas de cuatro ratas en cada condición.

4.1.5.3 Espinas dendríticas tipo corta en el núcleo accumbens core

La proporción de espinas dendríticas tipo corta producidas en la evocación en las neuronas espinosas medianas en el núcleo accumbens core no son significativamente diferentes entre grupos (ANOVA, $F_{(4,15)} = 0.572$, $p = 0.6874$) (Fig. 26C).

4.1.5.4 Espinas dendríticas tipo bifurcada en el núcleo accumbens core

La proporción de espinas dendríticas tipo bifurcada producidas en la evocación de la memoria de evitación inhibitoria en las neuronas espinosas medianas en el núcleo accumbens core son significativamente diferentes entre grupos (ANOVA, $F_{(4,15)} = 14.952$, $p < 0.0001$); el post hoc Bonferroni reporta diferencias significativas entre el grupo intacto y los grupos 3.0 mA ($p < 0.0001$) y Sch ($p = 0.0230$). Sin embargo, el grupo intacto no es diferente significativamente de 0.0 mA ($p = 0.8429$) y 1.0 mA ($p = 0.1259$) (Fig. 26D).

El grupo 0.0 mA es diferente estadísticamente del grupo 3.0 mA ($p < 0.0001$) y Sch ($p = 0.0154$). Sin embargo, no se observan estas diferencias entre 0.0 mA y 1.0 mA ($p = 0.0884$). Se encontraron diferencias significativas en el grupo 1.0 mA con respecto a 3.0 mA ($p = 0.0002$); pero no con Sch ($p = 0.3764$); el grupo 3.0 mA es diferente estadísticamente de Sch ($p = 0.0011$) (Fig. 26D).

4.1.5.5 Espinas dendríticas tipo multi-cabeza en el núcleo accumbens core

La proporción de espinas dendríticas tipo multi-cabeza producidas en la evocación de la memoria de evitación inhibitoria en las neuronas espinosas medianas en el núcleo accumbens core son significativamente diferentes entre grupos (ANOVA, $F_{(4,15)} = 2.465$, $p = 0.0899$); el post hoc Bonferroni reporta diferencias significativas entre el grupo intacto y los grupos 1.0 mA ($p = 0.0233$) y 3.0 mA ($p = 0.0306$). Sin embargo, el grupo intacto no es diferente significativamente de 0.0 mA ($p > 0.05$) y Sch ($p > 0.05$) (Fig. 26E).

El grupo 0.0 mA es diferente estadísticamente del grupo 1.0 mA ($p = 0.0233$) y 3.0 mA ($p = 0.0364$). Sin embargo, no se observan estas diferencias entre 0.0 mA y Sch ($p > 0.05$).

Se encontraron diferencias significativas en el grupo 1.0 mA con respecto a Sch ($p = 0.0233$); pero no con 3.0 mA ($p > 0.05$); el grupo 3.0 mA es diferente estadísticamente de Sch ($p < 0.05$) (Fig. 26E).

4.1.5.6 Espinas dendríticas no clasificadas en el núcleo accumbens core

La proporción de espinas dendríticas tipo otras producidas en la evocación en las neuronas espinosas medianas en el núcleo accumbens core no son significativamente diferentes entre grupos (ANOVA, $F_{(4,15)} = 3.839$, $p = 0.2416$).

4.1.6 Núcleo accumbens shell

4.1.6.1 Espinas dendríticas tipo larga en el núcleo accumbens shell

La proporción de espinas dendríticas tipo larga producidas en la evocación de la memoria de evitación inhibitoria en las neuronas espinosas medianas en el núcleo accumbens shell son significativamente diferentes entre grupos (ANOVA, $F_{(4,15)} = 40.466$, $p < 0.0001$); el post hoc Bonferroni reporta diferencias significativas entre el grupo intacto y los grupos 1.0 mA ($p < 0.0001$), 3.0 mA ($p < 0.0001$) y Sch ($p < 0.0001$). Sin embargo, el grupo intacto no es diferente significativamente de 0.0 mA ($p = 0.1669$) (Fig. 27A).

El grupo 0.0 mA es diferente estadísticamente del grupo 1.0 mA ($p = 0.0001$), 3.0 mA ($p < 0.0001$) y Sch ($p < 0.0001$). También se observan diferencias significativas en el grupo 1.0 mA con respecto a 3.0 mA ($p = 0.0036$) y Sch ($p = 0.0182$); sin embargo, el grupo 3.0 mA no es diferente estadísticamente de Sch ($p = 0.4382$) (Fig. 27A).

4.1.6.2 Espinas dendríticas tipo hongo en el núcleo accumbens shell

La proporción de espinas dendríticas tipo hongo producidas en la evocación de la memoria de evitación inhibitoria en las neuronas espinosas medianas en el núcleo

accumbens shell son significativamente diferentes entre grupos (ANOVA, $F_{(4,15)} = 68.494$, $p < 0.0001$); el post hoc Bonferroni reporta diferencias significativas entre el grupo intacto y los grupos 1.0 mA ($p < 0.0001$), 3.0 mA ($p < 0.0001$) y Sch ($p < 0.0001$). Sin embargo, el grupo intacto no es diferente significativamente de 0.0 mA ($p = 0.9765$) (Fig. 27B).

El grupo 0.0 mA es diferente estadísticamente del grupo 1.0 mA ($p < 0.0001$), 3.0 mA ($p < 0.0001$) y Sch ($p < 0.0001$). También se observan diferencias significativas en el grupo 1.0 mA con respecto a 3.0 mA ($p = 0.0236$) y Sch ($p < 0.0001$); el grupo 3.0 mA es diferente estadísticamente de Sch ($p = 0.0039$) (Fig. 27B).

4.1.6.3 Espinas dendríticas tipo corta en el núcleo accumbens shell

La proporción de espinas dendríticas tipo corta producidas en la evocación en las neuronas espinosas medianas en el núcleo accumbens shell no son significativamente diferentes entre grupos (ANOVA, $F_{(4,15)} = 0.733$, $p = 0.5838$) (Fig. 27C).

4.1.6.4 Espinas dendríticas tipo bifurcada en el núcleo accumbens shell

La proporción de espinas dendríticas tipo bifurcada producidas en la evocación de la memoria de evitación inhibitoria en las neuronas espinosas medianas en el núcleo accumbens shell son significativamente diferentes entre grupos (ANOVA, $F_{(4,15)} = 4.093$, $p = 0.0194$); el post hoc Bonferroni reporta diferencias significativas entre el grupo intacto y los grupos 3.0 mA ($p = 0.0067$). Sin embargo, el grupo intacto no es diferente significativamente de 0.0 mA ($p = 0.5655$) y 1.0 mA ($p = 0.5466$) Sch ($p = 0.2618$) (Fig. 27D).

El grupo 0.0 mA es diferente estadísticamente del grupo 3.0 mA ($p = 0.0020$). Sin embargo, no se observan estas diferencias con respecto a 1.0 mA ($p = 0.2471$) y Sch ($p = 0.0999$). Se encontraron diferencias significativas en el grupo 1.0 mA con respecto a 3.0 mA ($p = 0.0234$); pero no con Sch ($p = 0.5908$); el grupo 3.0 mA no es diferente estadísticamente de Sch ($p = 0.0671$) (Fig. 27D).

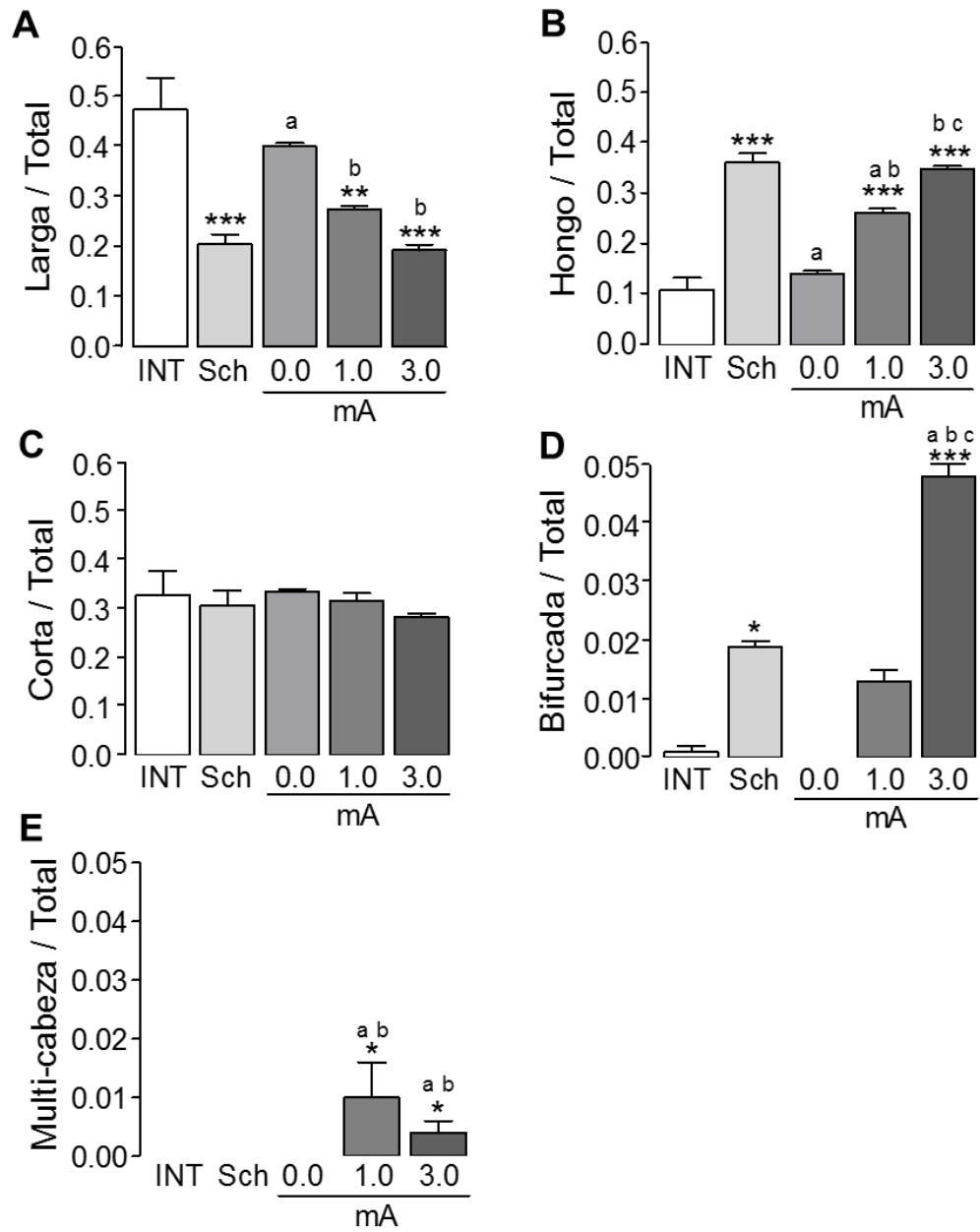


Figura 27. Tipos de espinas dendríticas en el núcleo accumbens shell. **A.** Larga; **B.** Hongo; **C.** Corta; **D.** Bifurcada; **E.** Multi-cabeza. INT, intacto; Sch, Solo choque de 3.0 mA; grupos entrenados con choque eléctrico de 0.0 mA, 1.0 mA y 3.0 mA respectivamente. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$ vs INT; ^a $p < 0.05$, ^{aa} $p < 0.01$ entre grupos. Nota: diferentes escalas en las gráficas. Cada barra representa promedio \pm error estándar de 40 MSNs, obtenidas de cuatro ratas en cada condición.

4.1.6.5 Espinas dendríticas tipo multi-cabeza en el núcleo accumbens shell

La proporción de espinas dendríticas tipo multi-cabeza producidas en la evocación de la memoria de evitación inhibitoria en las neuronas espinosas medianas en el núcleo accumbens Shell no son significativamente diferentes entre grupos (ANOVA, $F_{(4,15)} = 1.623$, $p = 0.2202$) (Fig. 27E).

4.1.6.6 Espinas dendríticas no clasificadas en el núcleo accumbens shell

La proporción de espinas dendríticas no clasificadas producidas en la evocación en las neuronas espinosas medianas en el núcleo accumbens shell no son significativamente diferentes entre grupos (ANOVA, $F_{(4,15)} = 0.517$, $p = 0.7243$).

4.3 Resumen de los resultados del experimento 2

	Estriado Dorsolateral			
	Contexto	Choque	Moderado	Alto
Total	↑	-	↑	↑ ⁺
Larga	-	-	↓	↓
Hongo	↑	-	↑	↑ ⁺
Corta	-	-	-	-
	Estriado Dorsomedial			
	Contexto	Choque	Moderado	Alto
Total	↑	-	↑	↑ ⁺
Larga	↓	-	↓	↓ ⁺
Hongo	-	-	↑	↑ ⁺
Corta	-	-	-	-
	Núcleo accumbens core			
	Contexto	Choque	Moderado	Alto
Total	-	-	↑	↑
Larga	-	↓	↓	↓
Hongo	-	↑	↑	↑ ⁺
Corta	-	-	-	-
	Núcleo accumbens shell			
	Contexto	Choque	Moderado	Alto
Total	↑	↑	↑	↑
Larga	-	↓	↓	↓ ⁺
Hongo	-	↑	↑	↑ ⁺
Corta	-	-	-	-

Tabla 3. Resumen de los resultados obtenidos en la densidad total de espinas dendríticas y en la proporción de espinas tipo larga, hongo y corta en el estriado dorsomedial, dorsolateral, accumbens core y shell durante la evocación de la memoria de la tarea de evitación inhibitoria. Se muestra con flechas el cambio con respecto al grupo intacto y el símbolo + indica que el cambio es mayor con respecto al grupo 1.0 mA.

5. Discusión

En este experimento se encontraron varios hallazgos que se describen a continuación:

(1) Se ha observado que la evocación de la memoria de evitación inhibitoria con un entrenamiento moderado y sobrerreforzado produce cambios estructurales en las neuronas medianas espinosas del estriado dorsal y el núcleo accumbens.

En la región dorsomedial y dorsolateral del estriado el aumento en la densidad total de espinas dendríticas durante la evocación de la memoria de EI es proporcional a la intensidad del choque eléctrico administrado durante el entrenamiento. Cabe resaltar que en ninguna de las dos regiones dorsales del estriado se encontró un cambio asociado únicamente a la administración del choque eléctrico.

En el núcleo accumbens core y shell, la espinogénesis es producida por el estímulo eléctrico administrado tanto en los grupos entrenados con choque alto y moderado, como en el grupo que recibió el choque eléctrico únicamente sin haber sido sometido al entrenamiento ni a la prueba de la memoria de EI.

El aumento en la producción de espinas dendríticas durante la evocación de la memoria también ha sido reportado en la tarea de condicionamiento de miedo al contexto (Moczulska et al., 2013). Así mismo, la inhibición de la Cdc42 (proteína de señalización que participa directamente en la reorganización de la actina) en el CA1 del hipocampo durante la recuperación de una memoria de condicionamiento de miedo, produjo una disminución en la densidad total de espinas dendríticas en esta región del hipocampo. Lo cual también produjo un deterioro en la memoria de dichos animales (Kim, Wang, Soderling, & Yasuda, 2014). Estos resultados sugieren que la evocación de la memoria es una etapa dinámica en la que podrían observarse cambios importantes en la plasticidad estructural neuronal.

(2) Se observó una disminución en la proporción de las espinas tipo larga conforme aumenta la proporción de espinas tipo hongo en el estriado dorsomedial y dorsolateral de los animales que evocaron la tarea de EI con un entrenamiento moderado e incrementado. Sin embargo, este efecto es más notable en los animales sobrerreforzados. En ninguna de las

dos regiones dorsales del estriado se encontró un cambio producido por la administración del choque eléctrico únicamente.

En el núcleo accumbens core y shell encontramos un efecto similar, es decir, una disminución en la proporción de espinas tipo larga y un aumento en las espinas tipo hongo. Esta dinámica fue observada en los grupos que evocaron la tarea de EI entrenada con choque eléctrico moderado y alto, así como en los animales que recibieron la estimulación eléctrica sin entrenamiento. Esto nos hace pensar que los cambios estructurales que ocurren en esta estructura cerebral ocurren en respuesta a la estimulación aversiva únicamente.

Como bien se mencionó en el primer experimento, existe una clara diferenciación en las aferencias del estriado dorsal y del núcleo accumbens. En la región dorsomedial y dorsolateral se está procesando información que tiene que ver con la navegación espacial y la memoria de procedimiento (Lozano et al., 2013; Packard & Knowlton, 2002). Mientras que el núcleo accumbens está involucrado en el procesamiento de información aversiva y de recompensa principalmente (Carlezon & Thomas, 2009; Setlow, 1997).

Por ello, es posible que la conectividad diferencial en estas estructuras cerebrales pueda provocar esta diferenciación morfológica en las espinas dendríticas observada durante la evocación de la memoria.

Actualmente, se desconoce el efecto de la evocación de la memoria de evitación inhibitoria sobre la liberación de corticosterona. No obstante, es de esperarse que la re-exposición a un contexto asociado a un estímulo aversivo pueda producir un aumento en la concentración de corticosterona en sangre. Se ha reportado que la administración de corticosterona directamente en el hipocampo y la amígdala previo a la evocación de una memoria aversiva produce un deterioro de la misma (Atsak et al., 2016; Schwabe, Joëls, Roozendaal, Wolf, & Oitzl, 2012). Estos datos sugieren que la corticosterona y sus receptores cerebrales podrían estar participando activamente durante la evocación de la memoria.

El aumento tanto de la densidad total de las espinas dendríticas como en la proporción de las espinas tipo hongo puede estar ocurriendo a través de la activación de la vía no

genómica de los receptores a glucocorticoides. Se ha observado que durante la evocación de la memoria de diferentes paradigmas conductuales como el condicionamiento de miedo, la tarea de evitación inhibitoria y en la memoria olfativa no se requieren moléculas que están involucradas en las cascadas de señalización genómicas, tal es el caso de los factores de transcripción, síntesis de ARNm y traducción de proteínas de *novo* (Tronel & Sara, 2002; Tronson et al., 2012; Vianna, Igaz, Coitinho, Medina, & Izquierdo, 2003). En cambio, se ha demostrado que durante la evocación de la memoria es necesaria la función de algunas moléculas que hacen parte de las cascadas de señalización no genómica, por ejemplo, las quinasas PKA, PKC y la MAPK (Barros et al., 2000; Miller & Marshall, 2005; Valjent, Corbillé, Bertran-Gonzalez, Hervé & Girault, 2006).

Estos resultados nos permiten inferir que el proceso de evocación de la memoria es un proceso dinámico, es decir, una vez que esa información que fue almacenada, puede ser recuperada por el animal para la toma de decisiones en un contexto específico y de esta forma esta información está disponible para continuar con uno de tantos procesos que pueden estar relacionados con la continuidad de la memoria, tal es el caso de la extinción la conducta de evitación inhibitoria, la actualización o la reconsolidación.

En el caso de las memorias altamente aversivas, como en el desorden de estrés postraumático es importante conocer cuáles son los mecanismos moleculares, estructurales y funcionales que permiten que la recuperación de esta información sea tan fuerte y poco susceptible a ser modificada o eliminada. De esta manera poder hallar un mecanismo por el cual pueda ser tratado.

VIII. CONCLUSIONES

- Los animales entrenados en la tarea de EI con un choque eléctrico alto (3.0 mA) muestran una mayor resistencia a la extinción, es decir, una mayor persistencia de la memoria que los animales entrenados con un estímulo eléctrico moderado (1.0 mA).
- El entrenamiento incrementado (3.0 mA) en la tarea de EI puede producir cambios morfológicos muy estables y duraderos, los cuales permiten que el almacenamiento de esta información sea difícil de extinguir.
- Existe una clara regionalización en el procesamiento de información de una tarea de EI producida por la conectividad diferencial del estriado dorsal y el núcleo accumbens, dada por los tres sistemas de memoria (espacial, procedimiento y emocional) que pueden modificar la plasticidad estructural.
- A diferencia de lo que se ha creído hasta el momento, la evocación de la memoria es un proceso dinámico capaz de producir cambios estructurales como punto de inicio a otras etapas de la memoria como son la extinción, la actualización o la reconsolidación.

IX. PERSPECTIVAS

Teniendo en cuenta que los cambios en la densidad y en la morfología de las espinas dendríticas ocurren como consecuencia de la intensidad de la intensidad del aprendizaje, es necesario evaluar si la inhibición en la formación de las espinas dendríticas pudieran evitar que ocurra el efecto protector de la memoria observado en los animales que son tratados con tratamientos amnésicos durante la consolidación de la memoria.

Evaluar la participación de los glucocorticoides, principalmente la corticosterona y la activación de la vía no genómica durante la consolidación de la memoria de evitación inhibitoria sobrerreforzada.

Confirmar si el efecto protector de la memoria que ha sido ampliamente reportado, depende de la participación de los glucocorticoides en las diferentes regiones estriatales.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Aceti, M., Vetere, G., Novembre, G., Restivo, L., & Ammassari-Teule, M. (2015). Progression of activity and structural changes in the anterior cingulate cortex during remote memory formation. *Neurobiology of Learning and Memory*, 123, 67–71.
- Arellano, J. I., Benavides-Piccione, R., Defelipe, J., & Yuste, R. (2007). Ultrastructure of dendritic spines: correlation between synaptic and spine morphologies. *Frontiers in Neuroscience*, 1(1), 131–143.
- Ashby, M. C., Maier, S. R., Nishimune, A., & Henley, J. M. (2006). Lateral diffusion drives constitutive exchange of AMPA receptors at dendritic spines and is regulated by spine morphology. *The Journal of Neuroscience*, 26(26), 7046–7055.
- Atsak, P., Guenzel, F. M., Kantar-Gok, D., Zalachoras, I., Yargicoglu, P., Meijer, O. C., ... Roozendaal, B. (2016). Glucocorticoids mediate stress-induced impairment of retrieval of stimulus-response memory. *Psychoneuroendocrinology*, 67, 207–215.
- Barros, D. M., Izquierdo, L. a., Mello E Souza, T., Ardenghi, P. G., Pereira, P., Medina, J. H., & Izquierdo, I. (2000). Molecular signalling pathways in the cerebral cortex are required for retrieval of one-trial avoidance learning in rats. *Behavioural Brain Research*, 114(1–2), 183–192.
- Bermúdez-Rattoni, F., & Prado-Alcala, R. A. (2001). *Memoria. ¿En donde está y como se forma?* (Editorial). México.
- Boersma, M. C. ., Dresselhaus, E. ., De Biase, L. ., Mihalas, A. ., Bergles, D. ., & Meffert, M. . (2011). A requirement for NF- κ B in developmental and plasticity- associated synaptogenesis. *Journal of Neuroscience*, 31(14), 5414–5425.
- Bourne, J., & Harris, K. M. (2007). Do thin spines learn to be mushroom spines that remember? *Current Opinion in Neurobiology*, 17(3), 381–386.
- Bourne, J., & Harris, K. M. (2008). Balancing structure and function at hippocampal dendritic spines. *Annu. Rev. Neurosci.*, 31, 47–67.

- Bower, G. T., & Hilgard, E. R. (1989). *Teoría del aprendizaje*. (Trillas, Ed.) (2nd ed.). México D.F.
- Caceres, A., Payne, M. R., Binder, L. I., & Steward, O. (1983). Immunocytochemical Localization of Actin and Microtubule-Associated Protein MAP2 in Dendritic Spines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(6), 1738–1742.
- Cain, C. K., & LeDoux, J. E. (2007). Escape from fear: a detailed behavioral analysis of two atypical responses reinforced by CS termination. *Journal of Experimental Psychology. Animal Behavior Processes*, 33(4), 451–463.
- Calabrese, B., Wilson, M. ., & Halpain, S. (2006). Development and Regulation of Dendritic Spine Synapses. *Physiology*, 21(1), 38–47.
- Cardinal, R. N., Parkinson, J. A., Hall, J., & Everitt, B. J. (2002). Emotion and motivation: The role of the amygdala, ventral striatum, and prefrontal cortex. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 26(3), 321–352.
- Carlezon, W. A., & Thomas, M. J. (2009). Biological substrates of reward and aversion: A nucleus accumbens activity hypothesis. *Neuropharmacology*, 56(SUPPL. 1), 122–132.
- Choi, J.-S., Cain, C. K., & LeDoux, J. E. (2010). The role of amygdala nuclei in the expression of auditory signaled two-way active avoidance in rats. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 17(3), 139–147.
- Cobos-Zapíaín, G. G., Salado-Castillo, R., Sánchez-Alavez, M., Quirarte, G. L., Roldán-Roldán, G., Díaz del Guante, M. A., & Prado-Alcalá, R. A. (1996). High Level of Footshock during Inhibitory Avoidance Training Prevents Amnesia Induced by Intranigral Injection of GABA Antagonists. *Neurobiology of Learning and Memory*, 65(3), 202–206.
- Comery, T. A., Shah, R., & Greenough, W. T. (1995a). Differential rearing alters spine density on medium-sized spiny neurons in the rat corpus striatum: evidence for association of morphological plasticity with early response gene expression. *Neurobiology of Learning and Memory*, 63(3), 217–9.

- Comery, T. A., Shah, R., & Greenough, W. T. (1995b). Differential rearing alters spine density on medium-sized spiny neurons in the rat corpus striatum: evidence for association of morphological plasticity with early response gene expression. *Neurobiology of Learning and Memory*, 63(3), 217–9.
- Comery, T. a, Stamoudis, C. X., Irwin, S. a, & Greenough, W. T. (1996). Increased density of multiple-head dendritic spines on medium-sized spiny neurons of the striatum in rats reared in a complex environment. *Neurobiology of Learning and Memory*, 66(2), 93–96.
- Cooney, J. R., Hurlburt, J. L., Selig, D. K., Harris, K. M., & Fiala, J. C. (2002). Endosomal compartments serve multiple hippocampal dendritic spines from a widespread rather than a local store of recycling membrane. *The Journal of Neuroscience*, 22(6), 2215–2224.
- Cordero, M. I., Merino, J. J., & Sandi, C. (1998). Correlational relationship between shock intensity and corticosterone secretion on the establishment and subsequent expression of contextual fear conditioning. *Behavioral Neuroscience*, 112(4), 885–91.
- Cottrell, G. A., & Nakajima, S. (1977). Effect of corticosteroids in the hippocampus on passive avoidance behavior in the rat. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 7(3), 277–280.
- de Kloet, E. R., Sibug, R. M., Helmerhorst, F. M., & Schmidt, M. (2005). Stress, genes and the mechanism of programming the brain for later life. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 29(2), 271–281.
- Devan, B. D., & White, N. M. (1999). Parallel information processing in the dorsal striatum: relation to hippocampal function. *The Journal of Neuroscience*, 19(7), 2789–2798.
- Díaz del Guante, M. A., Rivas, M., Prado-Alcalá, R. A., & Quirarte, G. L. (2004). Amnesia produced by pre-training infusion of serotonin into the substantia nigra. *Neuroreport*, 15(16), 2527–2529.
- Díaz del Guante, M. A., Rivas-Arancibia, S., Quirarte, G. L., & Prado-Alcalá, R. A. (1990). Over-reinforcement protects against memory deficits induced by muscarinic blockade of the striatum. *Bol Estud Med Biol*, 38(3–4), 49–53. Retrieved from

- 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), 310–4.
- Divac, I., & Öberg, R. G. E. (1979). *The Neostriatum*. (I. Divac & R. G. E. Öberg, Eds.). Oxford: Pergamon Press.
- Divac, I., Rosvold, H. E., & Szwarcbart, M. K. (1967). Behavioral Effects of Selective Ablation of the Caudate Nucleus. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 63(2), 184–190.
- Dubé, L., Smith, A. D., & Bolam, J. P. (1988). Identification of synaptic terminals of thalamic or cortical origin in contact with distinct medium-size spiny neurons in the rat neostriatum. *The Journal of Comparative Neurology*, 267(4), 455–71.
- Dudai, Y. (2004). The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annual Review of Psychology*, 55, 51–86.
- Durán-Arévalo, M., Cruz-Morales, S. E., & Prado-Alcalá, R. A. (1990). Is acetylcholine involved in memory consolidation of over-reinforced learning? *Brain Research Bulletin*, 24(6), 725–727.
- Eichenbaum, H. (2003). How does the hippocampus contribute to memory. *Trends in Cognitive Sciences*, 7(10), 427–429.
- Ethell, I. M., & Pasquale, E. B. (2005). Molecular mechanisms of dendritic spine development and remodeling. *Progress in Neurobiology*, 75(3), 161–205.
- Eyre, M. D., Richter-Levin, G., Avital, A., & Stewart, M. G. (2003). Morphological changes in hippocampal dentate gyrus synapses following spatial learning in rats are transient. *The European Journal of Neuroscience*, 17(9), 1973–80.
- Featherstone, R. E., & McDonald, R. J. (2005). Lesions of the dorsolateral or dorsomedial striatum impair performance of a previously acquired simple discrimination task. *Neurobiology of Learning and Memory*, 84(3), 159–167.

- Fiala, J. C., Spacek, J., & Harris, K. M. (2002). Cause or Consequence of Neurological Disorders? *Dendritic Spinen Pathology*, 39, 1–34.
- Fibiger, H. C. (1982). The organization and some projections of cholinergic neurons of the mammalian forebrain. *Brain Research Reviews*.
- 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.
- Freedman, N., & Yamamoto, K. (2004). Importin 7 and Importin alfa /Importin beta are nuclear import receptors for the glucocorticoid receptor. *Molecular Biology of the Cell*, 15(April), 3751–3737.
- Garín-Aguilar, M. E., Díaz-Cintra, S., Quirarte, G. L., Aguilar-Vázquez, A., Medina, A. C., & Prado-Alcalá, R. A. (2012). Extinction procedure induces pruning of dendritic spines in CA1 hippocampal field depending on strength of training in rats. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 6, 12.
- Garín-Aguilar, M. E., Medina, A. C., Quirarte, G. L., Mcgaugh, J. L., & Prado-Alcalá, R. A. (2014). Intense aversive training protects memory from the amnestic effects of hippocampal inactivation. *Hippocampus*, 24, 102–112.
- Gerfen, C. R. (1984). The neostriatal mosaic: compartmentalization of corticostriatal input and striatonigral output systems. *Nature*, 311(5985), 461–4.
- Gerfen, C. R. (1988). Synaptic organization of the striatum. *Journal of Electron Microscopy Technique*, 10(3), 265–281.
- Gerfen, C. R., Baimbridge, K. G., & Miller, J. J. (1985). The neostriatal mosaic: compartmental distribution of calcium-binding protein and parvalbumin in the basal ganglia of the rat and monkey. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(24), 8780–4.
- Giordano, M., & Prado-Alcalá, R. . (1986). Retrograde amnesia induced by post-trial injection

of atropine into the caudate-putamen. Protective effect of the negative reinforcer. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 24(4), 905–9.

González-Burgos, I. (2012). From synaptic transmission to cognition: An intermediary role for dendritic spines. *Brain and Cognition*, 80(1), 177–183.

Gonzalez-Tapia, D., Velazquez-Zamora, D. A., Olvera-Cortes, M. E., & Gonzalez-Burgos, I. (2015). The motor learning induces plastic changes in dendritic spines of Purkinje cells from the neocerebellar cortex of the rat. *Restorative Neurology and Neuroscience*, 33(5), 639–645.

Graybiel, A. M. (1986). Neuropeptides in the basal ganglia. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis*, 64, 135–61.

Graybiel, A. M., & Ragsdale, C. W. (1978). Histochemically distinct compartments in the striatum of human, monkeys, and cat demonstrated by acetylthiocholinesterase staining. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75(11), 5723–6.

Groenewegen, H. J. (2007). The ventral striatum as an interface between the limbic and motor systems. *CNS Spectrums*, 12(12), 887–892.

Grofová, I. (1975). The identification of striatal and pallidal neurons projecting to substantia nigra. An experimental study by means of retrograde axonal transport of horseradish peroxidase. *Brain Research*, 91(2), 286–291.

Harris, K. ., & Kater, S. . (1994). Dendritic Spines: Cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function. *Annual Review of Neuroscience*, 17, 341–371.

Harris, K. M., Jensen, F. E., & Tsao, B. (1992). Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation. *Journal of Neuroscience*, 12(7), 2685–2705.

Harris, K. M., & Stevens, J. K. (1988). Dendritic spines of rat cerebellar Purkinje cells: serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics. *The Journal of*

Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience, 8(12), 4455–4469.

Harris, K. M., & Weinberg, R. (2012). Mammalian Brain. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4, 1–30.

Hayashi, Y., & Majewska, A. K. (2005). Dendritic spine geometry: Functional implication and regulation. *Neuron*, 46(4), 529–532.

Heidbreder, C. A., & Groenewegen, H. J. (2003). The medial prefrontal cortex in the rat: Evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 27(6), 555–579.

Heinrichs, S. C., Leite-Morris, K. A., Guy, M. D., Goldberg, L. R., Young, A. J., & Kaplan, G. B. (2013). Dendritic structural plasticity in the basolateral amygdala after fear conditioning and its extinction in mice. *Behavioural Brain Research*, 248, 80–84.

Herkenham, M., & Pert, C. B. (1981). Mosaic distribution of opiate receptors, parafascicular projections and acetylcholinesterase in rat striatum. *Nature*, 291(5814), 415–418.

Holtmaat, A. J. G. D., Trachtenberg, J. T., Wilbrecht, L., Shepherd, G. M., Zhang, X., Knott, G. W., & Svoboda, K. (2005). Transient and persistent dendritic spines in the neocortex in vivo. *Neuron*, 45(2), 279–291.

Honkura, N., Matsuzaki, M., Noguchi, J., Ellis-Davies, G. C. R., & Kasai, H. (2008). The Subspine Organization of Actin Fibers Regulates the Structure and Plasticity of Dendritic Spines. *Neuron*, 57(5), 719–729.

Horner, C. H. (1993). Plasticity of the dendritic spine. *Progress in Neurobiology*, 41(3), 281–321.

Igaz, L. M., Vianna, M. R. M., Medina, J. H., & Izquierdo, I. (2002). Two time periods of hippocampal mRNA synthesis are required for memory consolidation of fear-motivated learning. *The Journal of Neuroscience*, 22(15), 6781–6789.

Ismaili, N., & Garabedian, M. J. (2004). Modulation of glucocorticoid receptor function via phosphorylation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1024, 86–101.

- Joëls, M., Sarabdjitsingh, R. A., & Karst, H. (2012). Unraveling the time domains of corticosteroid hormone influences on brain activity: rapid, slow, and chronic modes. *Pharmacological Reviews*, *64*(4), 901–38.
- Kandel, E. R. (2001). The Molecular Biology of Memory Storage: A Dialogue Between Genes and Synapses. *Science*, *294*, 1030–1039.
- Kasai, H., Matsuzaki, M., Noguchi, J., Yasumatsu, N., & Nakahara, H. (2003). Structure–stability–function relationships of dendritic spines. *Trends in Neurosciences*, *26*(7), 360–368.
- Kawaguchi, Y., Karube, F., & Kubota, Y. (2006). Dendritic branch typing and spine expression patterns in cortical nonpyramidal cells. *Cerebral Cortex*, *16*, 696–711.
- Kawaguchi, Y., Wilson, C. J., Augood, S. J., & Emson, P. C. (1995). Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends in Neurosciences*, *18*(12), 527–535.
- Kawaguchi, Y., Wilson, C. J., & Emson, P. C. (1990). Projection subtypes of rat neostriatal matrix cells revealed by intracellular injection of biocytin. *The Journal of Neuroscience*, *10*(10), 3421–38.
- Kelly, P. T., McGuinness, T. L., & Greengard, P. (1984). Evidence that the major postsynaptic density protein is a component of a Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *81*(3), 945–949.
- Kennedy, M. B. (2000). Signal-processing machines at the postsynaptic density. *Science (New York, N.Y.)*, *290*(5492), 750–754.
- Kim, I. H., Wang, H., Soderling, S. H., & Yasuda, R. (2014). Loss of Cdc42 leads to defects in synaptic plasticity and remote memory recall. *eLife*, e02839.
- Komatsuzaki, Y., Hatanaka, Y., Murakami, G., Mukai, H., Hojo, Y., Saito, M., ... Kawato, S. (2012). Corticosterone induces rapid spinogenesis via synaptic glucocorticoid receptors and kinase networks in hippocampus. *PLoS ONE*, *7*(4).

- Komatsuzaki, Y., Murakami, G., Tsurugizawa, T., Mukai, H., Tanabe, N., Mitsuhashi, K., ... Kawato, S. (2005). Rapid spinogenesis of pyramidal neurons induced by activation of glucocorticoid receptors in adult male rat hippocampus. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 335(4), 1002–1007.
- Kreitzer, A. C. (2009). Physiology and Pharmacology of Striatal Neurons. *Annual Review of Neuroscience*, 32, 127–147.
- Kröll, S., El-Gindi, J., Thanabalasundaram, G., Panpumthong, P., Schrot, S., Hartmann, C., & Galla, H. J. (2009). Control of the blood-brain barrier by glucocorticoids and the cells of the neurovascular unit. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1165, 228–239.
- Leuner, B., Falduo, J., & Shors, T. J. (2003). Associative memory formation increases the observation of dendritic spines in the hippocampus. *The Journal of Neuroscience* 23(2), 659–65.
- Lozano, Y. R., Serafín, N., Prado-Alcalá, R. A., Roozendaal, B., & Quirarte, G. L. (2013). Glucocorticoids in the dorsomedial striatum modulate the consolidation of spatial but not procedural memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, 101, 55–64.
- Lu, N. Z., & Cidlowski, J. A. (2006). Glucocorticoid receptor isoforms generate transcription specificity. *Trends in Cell Biology*, 16(6), 301–307.
- Lu, X. Y., Ghasemzadeh, M. B., & Kalivas, P. W. (1997). Expression of D1 receptor, D2 receptor, substance P and enkephalin messenger RNAs in the neurons projecting from the nucleus accumbens. *Neuroscience*, 82(3), 767–780.
- Luine, V., Martinez, C., Villegas, M., Magarinos, A., & McEwen, B. S. (1996). Restraint Stress Reversibly Enhances Spatial Memory Performance. *Physiology & Behavior*, 59(1), 27–32.
- Lynch, M. A. (2004). Long-term potentiation and memory. *Physiological Reviews*, 84(1), 87–136.
- Maiti, P., Manna, J., Ilavazhagan, G., Rossignol, J., & Dunbar, G. L. (2015). Molecular regulation of dendritic spine dynamics and their potential impact on synaptic plasticity

and neurological diseases. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 59(101), 208–237.

Malenka, R. C., & Nicoll, R. A. (1993). NMDA-receptor-dependent synaptic plasticity: multiple forms and mechanisms. *Trends in Neurosciences*, 16(12), 521–527.

Matsuzaki, M., Ellis-Davies, G. C., Nemoto, T., Miyashita, Y., Iino, M., & Kasai, H. (2001). Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nature Neuroscience*, 4(11), 1086–92.

McDonald, A. J. (1991). Topographical organization of amygdaloid projections to the caudatoputamen, nucleus accumbens, and related striatal-like areas of the rat brain. *Neuroscience*, 44(1), 15–33.

McDonald, R. J., & White, N. M. (1993). A triple dissociation of memory systems: hippocampus, amygdala, and dorsal striatum. *Behavioral Neuroscience*, 107(1), 3–22.

McGaugh, J. L. (1966). Time-dependent processes in memory storage. *Science (New York, N.Y.)*, 153(3742), 1351–1358.

McGaugh, J. L., Cahill, L., Ferry, B., & Roozendaal, B. (2000). Brain systems and the regulation of memory consolidation. In J. J. Bolhuis (Ed.), *Brain, Perception, Memory: Advances in Cognitive Neuroscience* (Oxford Uni, pp. 223–251). London.

McGaugh, J. L., Cahill, L., & Roozendaal, B. (1996). Involvement of the amygdala in memory storage: interaction with other brain systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(24), 13508–13514.

McGeorge, A. J., & Faull, R. L. (1989). The organization of the projection from the cerebral cortex to the striatum in the rat. *Neuroscience*, 29(3), 503–37.

Medina, A. C., Charles, J. R., Espinoza-González, V., Sánchez-Resendis, O., Prado-Alcalá, R. a, Roozendaal, B., & Quirarte, G. L. (2007). Glucocorticoid administration into the dorsal striatum facilitates memory consolidation of inhibitory avoidance training but not of the context or footshock components. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 14(10), 673–677.

- Medvedev, N. I., Dallérac, G., Popov, V. I., Rodriguez Arellano, J. J., Davies, H. A., Kraev, I. V., ... Stewart, M. G. (2014). Multiple spine boutons are formed after long-lasting LTP in the awake rat. *Brain Structure and Function*, 219(1), 407–414.
- Meredith, G. E., Agolia, R., Arts, M. P. M., Groenewegen, H. J., & Zahm, D. S. (1992). Morphological differences between projection neurons of the core and shell in the nucleus-accumbens of the rat. *Neuroscience*, 50(1), 149–162.
- Miller, C. A., & Marshall, J. F. (2005). Molecular substrates for retrieval and reconsolidation of cocaine-associated contextual memory. *Neuron*, 47(6), 873–884.
- Mink, J. (2003). The Basal Ganglia and Involuntary Movements. *Archives of Neurology*, 60(10), 1365–1368.
- Moczulska, K. E., Tinter-Thiede, J., Peter, M., Ushakova, L., Wernle, T., Bathellier, B., & Rumpel, S. (2013). Dynamics of dendritic spines in the mouse auditory cortex during memory formation and memory recall. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(45), 18315–20.
- Morimoto, M., Morita, N., Ozawa, H., Yokoyama, K., & Kawata, M. (1996). Distribution of glucocorticoid receptor immunoreactivity and mRNA in the rat brain: An immunohistochemical and in situ hybridization study. *Neuroscience Research*, 26(3), 235–269.
- 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.
- Müller, G. E., & Pilzecker, A. (1990). Experimentelle Beiträge zur Lehre vom Gedächtnis. *Z. Psychol. Ergänzungsband*, 1, 1–300.
- National Research Council. (2011). *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. (National Academy of Sciences, Ed.) (8th Ed). Washington DC.
- Nusser, Z., Cull-Candy, S., & Farrant, M. (1997). Differences in synaptic GABA(A) receptor

number underlie variation in GABA mini amplitude. *Neuron*, 19(3), 697–709.

Nusser, Z., Lujan, R., Laube, G., Roberts, J. D. B., Molnar, E., & Somogyi, P. (1998). Cell type and pathway dependence of synaptic AMPA receptor number and variability in the hippocampus. *Neuron*, 21(3), 545–559.

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.

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.

Oitzl, M. S., & Kloet, E. R. De. (1992). Selective Corticosteroid Antagonists Modulate Specific Aspects of Spatial Orientation Learning. *Behavioral Neuroscience*, 106(1), 62–71.

Ooishi, Y., Mukai, H., Hojo, Y., Murakami, G., Hasegawa, Y., Shindo, T., ... Kawato, S. (2012). Estradiol rapidly rescues synaptic transmission from corticosterone-induced suppression via synaptic/extranuclear steroid receptors in the hippocampus. *Cerebral Cortex*, 22(4), 926–936.

Ostroff, L. E., Fiala, J. C., Allwardt, B., & Harris, K. M. (2002). Polyribosomes redistribute from dendritic shafts into spines with enlarged synapses during LTP in developing rat hippocampal slices. *Neuron*, 35(3), 535–545.

Ouimet, C. C., da Cruz e Silva, E. F., & Greengard, P. (1995). The alpha and gamma 1 isoforms of protein phosphatase 1 are highly and specifically concentrated in dendritic spines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(8), 3396–400.

Packard, M. G., & Knowlton, B. J. (2002). Learning and memory functions of the Basal Ganglia. *Annual Review of Neuroscience*, 25, 563–93.

Parent, M. B., Tomaz, C., & McGaugh, J. L. (1992). Increased training in an aversively motivated task attenuates the memory-impairing effects of posttraining N-methyl-D-

aspartate-induced amygdala lesions. *Behav Neurosci*, 106(5), 789–797.

Park, M., Salgado, J. M., Ostroff, L., Helton, T. D., Robinson, C. G., Harris, K. M., & Ehlers, M. D. (2006). Plasticity-induced growth of dendritic spines by exocytic trafficking from recycling endosomes. *Neuron*, 52(5), 817–830.

Pasricha, N., Joëls, M., & Karst, H. (2011). Rapid effects of corticosterone in the mouse dentate gyrus via a nongenomic pathway. *Journal of Neuroendocrinology*, 23(2), 143–147.

Paxinos, G., & Watson, C. (2005). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* (Academic P). San Diego C.A.

Pérez-Ruiz, C., & Prado-Alcalá, R. A. (1989). Retrograde amnesia induced by lidocaine injection into the striatum: protective effect of the negative reinforcer. *Brain Research Bulletin*, 22(4), 599–603.

Persohn, E., & Schachner, M. (1990). Immunohistological localization of the neural adhesion molecules L1 and N-CAM in the developing hippocampus of the mouse. *Journal of Neurocytology*, 19(6), 807–819.

Peters, A., & Kaiserman-Abramof, I. R. (1970). The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The perikaryon, dendrites and spines. *American Journal of Anatomy*, 127(4), 321–355.

Prado, A. (1995). Serial and parallel processing during memory consolidation. In *Plasticity in the central nervous system: Learning and memory* (pp. 57–65). Lawrence Erlbaum Associates.

Prado-Alcalá, R. A. (1995). Serial and Parallel Processing During Memory Consolidation. In J. L. McGaugh, F. Bermúdez-Rattoni, & R. A. Prado-Alcalá (Eds.), *Plasticity in the Central Nervous System: Learning and Memory* (Psychology, pp. 57–65). New Jersey: Erlbaum.

Prado-Alcalá, R. A., & Cobos-Zapíaín, G. C. (1977). Learning deficits induced by cholinergic blockade of the caudate nucleus as a function of experience. *Brain Research*, 138(1), 190–6.

- Prado-Alcalá, R. A., & Cobos-Zapiaín, G. G. (1979). Interference with caudate nucleus activity by potassium chloride. Evidence for a “moving” engram. *Brain Research*, 172(3), 577–83.
- Prado-Alcalá, R. A., Cobos-Zapiaín, G. G., Salado-Castillo, R., Quiroz, C., Garín-Aguilar, M. E., Díaz-Trujillo, A., ... Quirarte, G. L. (2006). El aprendizaje incrementado protege a la memoria contra tratamientos amnésicos. *Revista Mexicana de Análisis de La Conducta*, 32, 203–218.
- Prado-Alcalá, R. A., Haiek, M., Rivas, S., Roldan-Roldan, G., & Quirarte, G. L. (1994). Reversal of extinction by scopolamine. *Physiology & Behavior*, 56(1), 27–30.
- Prado-Alcala, R. A., Kaufmann, P., & Moscona, R. (1980). Scopolamine and KCl injections into the caudate nucleus. Overtraining-induced protection against deficits of learning. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 12(2), 249–53.
- Prado-Alcala, R. A., Medina, A. C., Serafin Lopez, 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.
- Prado-Alcalá, R. A., & Quirarte, G. L. (2007). La consolidación de la memoria, un siglo después. *Rev Neurol*, 45(5), 284–292.
- Pratt, W. B., & Dittmar, K. D. (1998). Studies with purified chaperones advance the understanding of the mechanism of glucocorticoid receptor-hsp90 heterocomplex assembly. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 9(6), 244-252.
- Quiroz, C., Martínez, I., Quirarte, G. L., Morales, T., Díaz-Cintra, S., & Prado-Alcalá, R. A. (2003). Enhanced inhibitory avoidance learning prevents the memory-impairing effects of post-training hippocampal inactivation. *Experimental Brain Research*, 153(3), 400–402.
- Ramirez, F., Moscarello, J. M., LeDoux, J. E., & Sears, R. M. (2015). Active Avoidance Requires a Serial Basal Amygdala to Nucleus Accumbens Shell Circuit. *Journal of Neuroscience*, 35(8), 3470–3477.
- Restivo, L., Vetere, G., Bontempi, B., & Ammassari-Teule, M. (2009). The formation of recent

and remote memory is associated with time-dependent formation of dendritic spines in the hippocampus and anterior cingulate cortex. *The Journal of Neuroscience*, 29(25), 8206–8214.

Revest, J.-M., Di Blasi, F., Kitchener, P., Rougé-Pont, F., Desmedt, A., Turiault, M., ... Piazza, P. V. (2005). The MAPK pathway and Egr-1 mediate stress-related behavioral effects of glucocorticoids. *Nature Neuroscience*, 8(5), 664–672.

Robinson, T. E., & Kolb, B. (1997). Persistent structural modifications in nucleus accumbens and prefrontal cortex neurons produced by previous experience with amphetamine. *Journal of Neuroscience*, 17(21), 8491–8497.

Roitman, M. F., Wheeler, R. a, Tiesinga, P. H. E., Roitman, J. D., & Carelli, R. M. (2010). Hedonic and nucleus accumbens neural responses to a natural reward are regulated by aversive conditioning. *Learning & Memory*, 17(11), 539–546.

Roosendaal, B., Quirarte, G. L., & McGaugh, J. L. (2002). Glucocorticoids interact with the basolateral amygdala beta-adrenoceptor--cAMP/cAMP/PKA system in influencing memory consolidation. *The European Journal of Neuroscience*, 15(3), 553–560.

Rusakov, D. A., Davies, H. A., Harrison, E., Diana, G., Richter-Levin, G., Bliss, T. V, & Stewart, M. G. (1997). Ultrastructural synaptic correlates of spatial learning in rat hippocampus. *Neuroscience*, 80(1), 69–77.

Sala, C., & Segal, M. (2014). Dendritic Spines: The Locus of Structural and Functional Plasticity. *Physiological Reviews*, 94(1), 141–188.

Salado-Castillo, R., Díaz del Guante, M. A., Alvarado, R., Quirarte, G. L., & Prado-Alcalá, R. A. (1996). Effects of regional GABAergic blockade of the striatum on memory consolidation. *Neurobiology of Learning and Memory*, 66(2), 102–8.

Salado-Castillo, R., Sánchez-Alavéz, M., Quirate, G. ., Martínez García, M. I., & Prado-Alcalá, R. . (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(8).

- Salgado, S., & Kaplitt, M. G. (2015). The nucleus accumbens: A comprehensive review. *Stereotactic and Functional Neurosurgery*, 93(2), 75–93.
- Sandi, C., Loscertales, M., & Guaza, C. (1997). Experience-dependent Facilitating Effect of Corticosterone on Spatial Memory Formation in the Water Maze. *European Journal of Neuroscience* 9, 637-642.
- Schikorski, T., & Stevens, C. (1999). Quantitative fine-structural analysis of olfactory. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96, 4107–4112.
- Schultz, W. (2007). Multiple dopamine functions at different time courses. *Annual Review of Neuroscience*, 30, 259–88.
- Schwabe, L., Joëls, M., Roozendaal, B., Wolf, O. T., & Oitzl, M. S. (2012). Stress effects on memory: An update and integration. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 36(7), 1740–1749.
- Sesack, S. R., & Grace, A. a. (2010). Cortico-Basal Ganglia reward network: microcircuitry. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 35(1), 27–47.
- Setlow, B. (1997). The nucleus accumbens and learning and memory. *Journal of Neuroscience Research*, 49(5), 515–521.
- Sheng, M., & Hoogenraad, C. C. (2007). The postsynaptic architecture of excitatory synapses: a more quantitative view. *Annual Review of Biochemistry*, 76, 823–47.
- Shepherd, G. M. G. (2013). Corticostriatal connectivity and its role in disease. *Nature Reviews. Neuroscience*, 14(4), 278–91.
- Shors, T., Weiss, C., & Thompson, R. (1992). Stress-induced facilitation of classical conditioning. *Science*, 257(5069), 537–539.
- Smith, Y., Bevan, M. D., Shink, E., & Bolam, J. P. (1998). Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *Neuroscience*, 86(2), 353–387.
- Solana-Figueroa, R., Salado-Castillo, R., Quirarte, G. L., Galindo, L. E., & Prado-Alcalá, R. A.

- (2002). Enhanced inhibitory avoidance training protects against the amnesic effect of p-chloroamphetamine. *Life Sciences*, 71(4), 391–399.
- Sorra, K. E., & Harris, K. M. (1998). Stability in Synapse Number and Size at 2 hr after Long-Term Potentiation in Hippocampal Area CA1. *Journal of Neuroscience*, 18(2), 658–671.
- Squire, L. R. (1992). Memory and the Hippocampus: A Synthesis From Findings With Rats, Monkeys, and Humans. *Psychological Review*, 99(2), 195–231.
- Steward, O., & Schuman, E. M. (2001). Protein synthesis at synaptic sites on dendrites. *Annu. Rev. Neurosci.*, 24, 299–325.
- Tang, L., Hung, C. P., & Schuman, E. M. (1998). A role for the cadherin family of cell adhesion molecules in hippocampal long-term potentiation. *Neuron*, 20(6), 1165–1175.
- Tasker Jeffrey G., H. J. P. (2011). Mechanisms of rapid glucocorticoid feedback inhibition of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Stress*, 14(4), 398–406.
- Tepper, J. M., & Bolam, J. P. (2004). Functional diversity and specificity of neostriatal interneurons. *Current Opinion in Neurobiology*, 14(6), 685–692.
- Testa, C. M., Standaert, D. G., Young, a B., & Penney, J. B. (1994). Metabotropic glutamate receptor mRNA expression in the basal ganglia of the rat. *The Journal of Neuroscience* 14(5 Pt 2), 3005–3018.
- Toy, W. A., Petzinger, G. M., Leyshon, B. J., Akopian, G. K., Walsh, J. P., Hoffman, M. V, ... Jakowec, M. W. (2014). Treadmill exercise reverses dendritic spine loss in direct and indirect striatal medium spiny neurons in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*, 63, 201–9.
- Trommald, M., & Hulleberg, G. (1997). Dimensions and density of dendritic spines from rat dentate granule cells based on reconstructions from serial electron micrographs. *The Journal of Comparative Neurology*, 377(1), 15–28.
- Tronel, S., & Sara, S. J. (2002). Mapping of Olfactory Memory Circuits: Region-Specific c-fos Activation After Odor-Reward Associative Learning or After Its Retrieval. *Learning &*

Memory, 9(3), 105–11.

- Tronson, N. C., Wiseman, S. L., Neve, R. L., Nestler, E. J., Olausson, P., & Taylor, J. R. (2012). Distinctive roles for amygdalar CREB in reconsolidation and extinction of fear memory. *Learn Mem*, 19(5), 178–181.
- Tulving, E., & Thomson, D. M. (1973). Encoding specificity and retrieval processes in episodic memory. *Psychological Review*, 80(5), 352–373.
- Valjent, E., Corbillé, A.-G., Bertran-Gonzalez, J., Hervé, D., & Girault, J.-A. (2006). Inhibition of ERK pathway or protein synthesis during reexposure to drugs of abuse erases previously learned place preference. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(8), 2932–7.
- Ventura, R., Morrone, C., & Puglisi-Allegra, S. (2007). Prefrontal/accumbal catecholamine system determines motivational salience attribution to both reward- and aversion-related stimuli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(12), 5181–5186.
- Vianna, M. R., Igaz, L. M., Coitinho, A. S., Medina, J. H., & Izquierdo, I. (2003). Memory extinction requires gene expression in rat hippocampus. *Neurobiology of Learning and Memory*, 79(3), 199–203.
- Voorn, P., Vanderschuren, L. J. M. J., Groenewegen, H. J., Robbins, T. W., & Pennartz, C. M. A. (2004). Putting a spin on the dorsal-ventral divide of the striatum. *Trends in Neurosciences*.
- White, N. M. (2009). Some highlights of research on the effects of caudate nucleus lesions over the past 200 years. *Behavioural Brain Research*, 199(1), 3–23.
- White, N. M., & McDonald, R. J. (2002). Multiple parallel memory systems in the brain of the rat. *Neurobiology of Learning and Memory*, 77(2), 125–84.
- Wickens, J. R., Budd, C. S., Hyland, B. I., & Arbuthnott, G. W. (2007). Striatal contributions to reward and decision making: Making sense of regional variations in a reiterated processing matrix. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1104, 192–212.

- Wolf, M., Burgess, S., Misra, U. ., & Sahyoun, N. (1986). Postsynaptic densities contain a subtype of protein kinase C. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 140(2), 691–698.
- Yamaguchi, T., Goto, A., Nakahara, I., Yawata, S., Hikida, T., Matsuda, M., ... Nakanishi, S. (2015). Role of PKA signaling in D2 receptor-expressing neurons in the core of the nucleus accumbens in aversive learning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(36), 11383–8.
- Yin, H. H., & Knowlton, B. B. J. (2006). The role of the basal ganglia in habit formation. *Nature Reviews. Neuroscience*, 7(6), 464–76.
- Yin, H. H., Knowlton, B. J., & Balleine, B. W. (2004). Lesions of dorsolateral striatum preserve outcome expectancy but disrupt habit formation in instrumental learning. *European Journal of Neuroscience*, 19(1), 181–189.
- Yuste, R. (2009). *Dendritic Spines*. (R. Yuste, Ed.) (The MIT Pr). Cambridge, Massachusetts: 2009.
- Yuste, R., & Bonhoeffer, T. (2001). Morphological changes in dendritic spines associated with Long-Term synaptic plasticity. *Annu. Rev. Neurosci.*, 24, 1071–89.
- Yuste, R., Majewska, A., & Holthoff, K. (2000). From form to function: calcium compartmentalization in dendritic spines. *Nature Neuroscience*, 3(7), 653–9.
- Zhou, W., Koldzic-Zivanovic, N., Clarke, C. H., De Beun, R., Wassermann, K., Bury, P. S., ... Thomas, M. L. (2002). Selective estrogen receptor modulator effects in the rat brain. *Neuroendocrinology*, 75(1), 24–33.
- Zuo, Y., Yang, G., Kwon, E., & Gan, W.-B. (2005). Long-term sensory deprivation prevents dendritic spine loss in primary somatosensory cortex. *Nature*, 436(7048), 261–5.

XI. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sistema de clasificación de la memoria según el tipo de información	5
Figura 2. Representación esquemática de la clasificación temporal de la memoria	6
Figura 3. Administración de anisomicina en el CA1 del hipocampo dorsal	7
Figura 4. Reconstrucción tridimensional de espinas dendríticas.	9
Figura 5. Componentes importantes de las espinas dendríticas.....	11
Figura 6. Espinas dendríticas después de la tarea de evitación inhibitoria.....	14
Figura 7. Conectividad del estriado.....	18
Figura 8. Esquema representativo de la distribución de los receptores a glucocorticoides ..	21
Figura 9. Núcleo accumbens	24
Figura 10. Efecto de la administración de lidocaína en el estriado anterodorsal	26
Figura 11. Cámara de evitación inhibitoria.....	30
Figura 12. Análisis morfométrico.....	34
Figura 14. Diseño experimental experimento 1.....	39
Figura 15. Resultados conductuales, tarea de evitación inhibitoria	41
Figura 16. Densidad total de espinas dendríticas en el estriado.....	45
Figura 17. Tipos de espinas dendríticas en el estriado dorsolateral	49
Figura 18. Tipos de espinas dendríticas en el estriado dorsomedial	54
Figura 19. Tipos de espinas dendríticas en el núcleo accumbens core.....	58
Figura 20. Tipos de espinas dendríticas en el núcleo accumbens shell	63

Figura 21. Diseño experimental experimento 2.....	76
Figura 22. Resultados conductuales, tarea de evitación inhibitoria	77
Figura 23. Densidad total de espinas dendríticas en el estriado dorsal y ventral observadas durante la evocación de la memoria.....	80
Figura 24. Tipos de espinas dendríticas en el estriado dorsolateral.	82
Figura 25. Tipos de espinas dendríticas en el estriado dorsomedial	85
Figura 26. Tipos de espinas dendríticas en el núcleo accumbens core.	88
Figura 27. Tipos de espinas dendríticas en el núcleo accumbens shell.	92

XII. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características morfométricas de los principales tipos de espinas dendríticas	10
Tabla 2. Resumen de los resultados experimento 1	65
Tabla 3. Resumen de los resultados experimento 2	94



Mushroom spine dynamics in medium spiny neurons of dorsal striatum associated with memory of moderate and intense training

Paola C. Bello-Medina^a, Gonzalo Flores^b, Gina L. Quirarte^a, James L. McGaugh^{c,d,1}, and Roberto A. Prado Alcalá^{a,1}

^aDepartamento de Neurobiología Conductual y Cognitiva, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Queretaro, 76230, Mexico; ^bInstituto de Fisiología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, 72570, Mexico; ^cCenter for the Neurobiology of Learning and Memory, University of California, Irvine, CA 92697-3800; and ^dDepartment of Neurobiology and Behavior, University of California, Irvine, CA 92697-3800

Contributed by James L. McGaugh, August 24, 2016 (sent for review July 5, 2016; reviewed by Mark Packard and Tracey J. Shors)

A growing body of evidence indicates that treatments that typically impair memory consolidation become ineffective when animals are given intense training. This effect has been obtained by treatments interfering with the neural activity of several brain structures, including the dorsal striatum. The mechanisms that mediate this phenomenon are unknown. One possibility is that intense training promotes the transfer of information derived from the enhanced training to a wider neuronal network. We now report that inhibitory avoidance (IA) induces mushroom spinogenesis in the medium spiny neurons (MSNs) of the dorsal striatum in rats, which is dependent upon the intensity of the foot-shock used for training; that is, the effect is seen only when high-intensity foot-shock is used in training. We also found that the relative density of thin spines was reduced. These changes were evident at 6 h after training and persisted for at least 24 h afterward. Importantly, foot-shock alone did not increase spinogenesis. Spine density in MSNs in the accumbens was also increased, but the increase did not correlate with the associative process involved in IA; rather, it resulted from the administration of the aversive stimulation alone. These findings suggest that mushroom spines of MSNs of the dorsal striatum receive afferent information that is involved in the integrative activity necessary for memory consolidation, and that intense training facilitates transfer of information from the dorsal striatum to other brain regions through augmented spinogenesis.

dendritic spines | dorsal striatum | accumbens | memory consolidation | intense training

A growing body of evidence indicates that treatments that commonly produce amnesia become ineffective when animals are given enhanced training (i.e., a high number of training sessions or relatively high levels of aversive stimulation). This protective effect against amnesia induced by interference with normal activity of brain nuclei has been found in a wide variety of learning tasks (1). Extensive evidence indicates that the dorsal striatum is intimately involved in the acquisition, consolidation, and retrieval memory for many kinds of training experiences (2–5). Interference with cholinergic activity of the dorsal striatum and reversible inactivation of this structure induced after moderate training impair memory consolidation. However, notably, these treatments are ineffective in impairing memory when animals are overtrained (6–10). Such findings suggest that intense training may induce functional changes within the dorsal striatum that prevent the impairment of memory. Although the dorsal striatum seems histologically homogeneous, there is a functional differentiation along its medial-lateral axis related to memory consolidation (11). Prior studies have shown that the dorsomedial striatum (DMS) is predominantly involved in spatial/contextual learning, influencing goal-directed behaviors (12, 13). In contrast, the dorsolateral striatum (DLS) enables the formation of procedural learning (4, 14).

Previous research suggests that memory consolidation may involve changes in the density and morphology of dendritic spines in the hippocampus, amygdala, and cerebral cortex (15–23). Regarding

striatal spinogenesis, it has been reported that rearing rats in a rich environment produced an increase in spine density in medium spiny neurons (MSNs), which is indicative of experience-dependent neuronal modifications in this region (24, 25).

Other lines of research have shown that stressful events induce the release of corticosterone, which facilitates memory consolidation of a variety of learning tasks, and that corticosterone release correlates positively with the intensity of training (26–32). There is compelling evidence that activation of corticosterone receptors in the dorsal striatum, amygdala, hippocampus, and insular cortex facilitate memory consolidation of inhibitory avoidance (IA) learning (33–36).

Although there are no reports on the mechanisms underlying synaptogenesis in the striatum, related work shows that corticosterone administration to dorsal hippocampal slices induces dose-dependent spinogenesis within the first hour after treatment. This effect was impeded by blocking NMDA receptors and PI3K, MAPK, PKC, or PKA (37). Similarly, dexamethasone, a specific agonist of glucocorticoid receptor, increased the density of mushroom and thin spines, also within 1 h. These effects were blocked by RU-38486, an antagonist of the glucocorticoid receptor (38). Thus, these quick effects on mushroom genesis indicate that they are not genomic and that spinogenesis was induced via membrane-localized glucocorticoid receptors (39) and multiple kinase pathways (40–42).

Based on the foregoing, we hypothesized that in both DMS and DLS, intense training of IA would induce enhanced genesis of mushroom spines, which are thought to be a substrate of

Significance

Interference with activity of cerebral structures, including the dorsal striatum, produces amnesia after moderate levels of training; such interference, nonetheless, becomes ineffective when animals are subjected to intense training procedures. The mechanisms that mediate the protective effect of intense training are unknown. This report shows an increase in relative density of mushroom spines in medium spiny neurons (MSNs) of the dorsal striatum, which depends upon the intensity of training; relative density of mushroom spines in MSNs of nucleus accumbens, on the other hand, is augmented after noncontingent administration of a foot-shock alone. These findings suggest that increased mushroom spinogenesis produced by intense training strengthens memory consolidation and facilitates transfer of information from the dorsal striatum to other cerebral structures.

Author contributions: P.C.B.-M. and R.A.P.A. designed research; P.C.B.-M. performed research; P.C.B.-M. and R.A.P.A. analyzed data; and P.C.B.-M., G.F., G.L.Q., J.L.M., and R.A.P.A. wrote the paper.

Reviewers: M.P., Texas A&M University; and T.J.S., Rutgers University.

The authors declare no conflict of interest.

¹To whom correspondence may be addressed. Email: prado@unam.mx or jimcgaugh@uci.edu.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1613680113/-DC5-supplemental.

long-term memory (LTM) because of their longevity and structural and functional characteristics (43–45). If such spinogenesis occurred, then it might represent the basis of the protective effects of intense training against amnesic treatments that are administered to the dorsal striatum, as is the case with the administration of cholinergic and sodium channel blockers (8–10), which impede the activation of acetylcholine receptors and the production of action potentials, respectively, therefore inhibiting synaptic transmission. Thus, increased mushroom spine production could constitute a mechanism to store and relay information derived from the enhanced learning experience; by contrast, low or moderate levels of training would induce a limited increase of mushroom spines, which would not be sufficient to overcome the amnesic effects of treatments that interfere with neuronal activity of the dorsal striatum. Once normal activity is recovered, the increased density of mushroom spines would allow for strengthened consolidation of the task and for facilitated afferent activation of MSNs from other regions of the brain. In turn, when the animals are later tested for retention, afferent signals to the dorsal striatum would more easily activate MSN mushroom spines and their efferent connections.

The aim of this study was to determine whether low and intense foot-shock used in IA training induces distinct patterns of changes in dendritic spine density and morphology in the dorsal striatum. It was expected that both the DMS and DLS regions of the dorsal striatum would show the same patterns of spine dynamics because the IA task entails both spatial and procedural components (46). It was also expected that stronger learning would induce additional changes in spine density and morphology than weaker learning.

Results

Consolidation and LTM. Because one of the main objectives of this study was to evaluate possible changes in spine density and shape after moderate and intense training, it was important to demonstrate that training with 3.0 mA produces stronger learning than training with 1.0 mA. To this end, we measured resistance to extinction, which is stronger when a learning experience is also stronger. We found that animals trained with 3.0 mA took significantly longer to achieve extinction than animals trained with 1.0 mA (Fig. S1A).

We then proceeded to study dendritic spine dynamics associated with consolidation and LTM of moderate and enhanced IA training. Independent groups of rats were trained with 0.0, 1.0, or 3.0 mA (groups T-0, T-1, and T-3, respectively); half of the groups were tested for retention at 6 h, and the other half were tested at 24 h after training. These retention intervals have been shown to fall within the limits of consolidation and LTM of IA in the rat, respectively (47).

At the 6-h interval, significant differences in retention latencies among the groups became evident [$H_{(2)} = 24.03$, $P < 0.0001$]; pairwise comparisons yielded no significant differences between T-1 and T-3, which had perfect retention scores (600 s), but each of them differed from T-0 (24.5-s retention score) ($P < 0.001$ for each comparison). Essentially the same results were found at 24 h after training. A statistical difference was found in retention latencies among the groups [$H_{(2)} = 26.02$, $P < 0.0001$]. T-1 and T-3 had top scores, significantly higher than the score of T-0 (21.8-s retention score) ($P < 0.001$ for each comparison) (Fig. S1B).

Golgi-Cox Staining. Immediately after retention testing, the brains of these rats were processed according to the Golgi-Cox procedure (an explanation of the detailed procedure may be found in *SI Materials and Methods*). In addition to T-0, T-1, and T-3, two other groups were studied to factor out the effect of the foot-shock on spine dynamics. The animals of one control group were put inside the shock compartment, and a 5.6-s foot-shock of 3.0 mA (median duration of foot-shock received by the animals that had been trained with 3.0 mA) was delivered [shock-only (SO) group ($n = 8$)]; half of the animals were killed 6 h later, and the other

half were killed 24 h later. To determine the density and types of dendritic spines in basal conditions, the animals of the other control group ($n = 4$) were kept under identical living conditions as the animals used for the behavioral study, but they never left the bioterium, except for euthanasia [intact (INT) group]. Fig. 1 shows photomicrographs of a representative Golgi-Cox-stained slice with MSNs from DLS, DMS, nucleus accumbens core (NAcC), and nucleus accumbens shell (NAcS), as well as the different types of spines that were analyzed.

Spine Densities in Dorsal and Ventral Striatum. To find out if the spine populations in basal conditions were different across the striatal regions, we performed an analysis of spine density in DLS, DMS, NAcC, and NAcS of the INT group. There were significant differences among the four regions [$F_{(3,15)} = 5.62$, $P < 0.05$]. The Bonferroni test showed that NAcC had significantly higher spine density (18.84 ± 2.26) than NAcS (15.56 ± 0.67), DMS (15.13 ± 1.44), and DLS (14.95 ± 1.38) ($P < 0.05$ for each comparison) and that the latter three did not differ from each other (INT groups in Fig. 2). These results agree well with the results of Meredith et al. (48), who also found a higher density of spines in NAcC than in NAcS.

Changes in Spine Density in Dorsolateral Striatum. Significant differences in spine density among the groups were found during the consolidation period [$F_{(4,15)} = 18.206$, $P < 0.0001$]. Pairwise comparisons revealed that there were no significant differences between the INT and SO groups. INT had a significantly lower spine density than T-0, T-1, and T-3 ($P < 0.05$, $P < 0.005$, and $P < 0.0001$, respectively). SO had fewer spines than T-0, T-1, and T-3 ($P < 0.05$, $P < 0.01$, and $P < 0.001$, respectively). T-0 did not differ from T-1, but it had a lower spine density than T-3 ($P < 0.001$ and $P < 0.0001$, respectively). By the same token, there were significant differences in spine density 24 h after training [$F_{(4,15)} = 7.676$, $P = 0.005$]. There were no significant differences between INT and SO, and the former had fewer spines than T-0, T-1, and T-3 ($P < 0.05$, $P < 0.01$, and $P < 0.0001$, respectively); SO, T-0, and T-1 did not differ from each other, but they had a lower density of spines

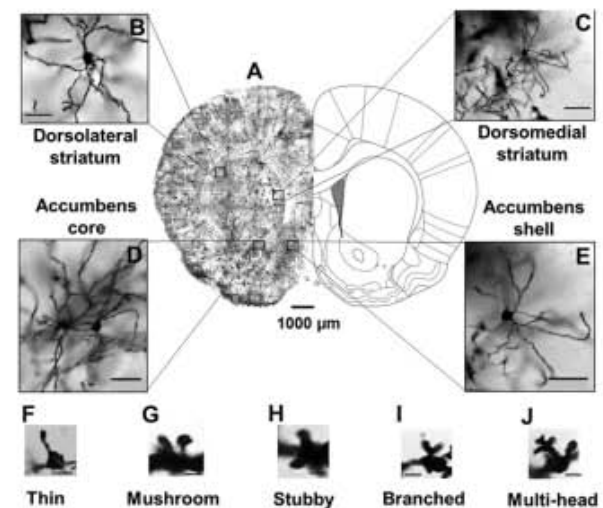


Fig. 1. Morphometric analysis. (A) Representative coronal slice impregnated with the Golgi-Cox stain. (Insets) Representative MSNs from the four regions that were analyzed. The DLS (B), DMS (C), NAcC (D), and NAcS (E) are shown. (Magnification: 40 \times , 0.8 N.A.) Also shown are microphotographs of the different types of spines that were studied: thin (F), mushroom (G), stubby (H), branched (I), and multihead (J). (Magnification: 100 \times , 1.25 N.A.) (Scale bar: 2 μ m.)

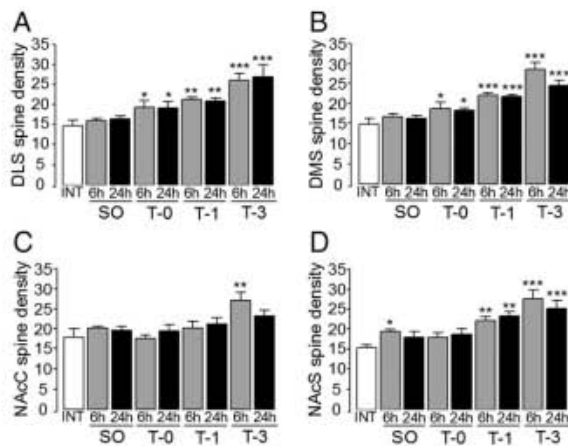


Fig. 2. Dendritic spine density in dorsal and ventral striatum observed during consolidation (6 h) and LTM (24 h) of IA training. The DLS (A), DMS (B), NAcC (C), and NAcS (D) are shown. The T-0, T-1, and T-3 groups were trained with 0.0 mA, 1.0 mA, and 3.0 mA, respectively. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.0001$ vs. INT. Each bar represents mean \pm SEM of 40 MSNs, obtained from four rats in each condition.

than T-3 ($P < 0.0005$, $P < 0.01$, and $P < 0.05$, respectively) (Fig. 2A). The two-way ANOVA (treatment \times retention interval) showed that there was not a significant interaction between these two variables [$F_{(3,24)} = 0.09$, $P = 0.97$].

Changes in Spine Density in Dorsomedial Striatum. There were significant changes in dendritic spine density during the consolidation stage (i.e., at the 6-h retention interval [$F_{(4,15)} = 21.120$, $P < 0.0001$]). The Bonferroni test revealed that INT did not differ from SO. On the other hand, T-0, T-1, and T-3 showed a significant increase in spine density compared with INT ($P < 0.05$, $P < 0.001$, and $P < 0.0001$, respectively); T-3 also showed more spines than SO, T-0, and T-1 ($P < 0.0001$, $P < 0.0001$, and $P < 0.05$, respectively); and T-1 had a higher spine count than SO ($P < 0.05$). Practically the same differences observed among the groups at 6 h also occurred 24 h after training (LTM) [$F_{(4,15)} = 15.93$, $P < 0.0001$]. The post hoc analyses showed that INT did not differ from SO, whereas a higher spine density was observed in T-0, T-1, and T-3 compared with INT ($P < 0.05$, $P < 0.001$, and $P < 0.0001$, respectively). T-3 also had a higher spine density than SO and T-0 ($P < 0.0001$ and $P < 0.001$, respectively) (Fig. 2B). The two-way ANOVA (treatment \times retention interval) indicated that the interaction between these two variables was not significant [$F_{(3,24)} = 1.73$, $P = 0.19$], indicating that there were no significant differences between the 6-h and 24-h groups in any of the treatment conditions.

Changes in Spine Density in Accumbens Core. There were significant changes in dendritic spine density at the 6-h retention interval [$F_{(4,15)} = 5.49$, $P < 0.01$]. The Bonferroni test showed that the spine density of T-3 was significantly higher than the rest of the groups (P values ranging between 0.05 and 0.0005); comparisons between the remaining pairs of groups were not significant. The ANOVA showed no significant differences in the groups at the 24-h interval [$F_{(4,15)} = 1.61$, $P = 0.22$] (Fig. 2C). The treatment \times retention interval interaction was not significant [$F_{(3,24)} = 1.56$, $P = 0.23$].

Changes in Spine Density in Accumbens Shell. Dendritic spine density changed significantly among the groups during consolidation [$F_{(4,15)} = 14.65$, $P < 0.0001$]. There were no significant differences between INT and T-0, but INT had fewer spines than SO, T-1, and

T-3 ($P < 0.05$, $P < 0.001$, and $P < 0.0001$, respectively); SO had fewer spines than T-3 ($P < 0.005$); T-0 had a lower score than T-1 ($P < 0.05$) and T-3 ($P < 0.0001$); and T-3 had more spines than T-1 ($P < 0.01$). Lastly, the comparisons between SO and T-0 and between SO and T-1 did not reach statistical significance. At the 24-h interval, the ANOVA also showed a significant difference among groups [$F_{(4,15)} = 8.38$, $P < 0.001$]. The post hoc analyses showed that INT did not differ from SO and T-0, but it had a lower spine density than T-1 ($P < 0.001$) and T-3 ($P < 0.001$). SO had a lower score than T-1 ($P < 0.05$) and T-3 ($P < 0.005$), but not T-0; T-0 also had a lower spine ratio than T-1 ($P < 0.05$) and T-3 ($P < 0.005$). T-1 and T-3 did not differ from each other (Fig. 2D). The treatment \times retention interval interaction was not significant [$F_{(3,24)} = 0.71$, $P = 0.56$].

After having analyzed the changes in striatal spine density produced by the different experimental and control manipulations, we went on to investigate changes in spine morphology that might be produced by such manipulations.

Thin Spine Ratios in Dorsolateral Striatum. There were significant differences among the groups regarding spine ratios at the 6-h interval [$F_{(4,15)} = 8.77$, $P < 0.001$]. The Bonferroni analysis showed that INT did not differ significantly from SO and T-0; INT had a higher ratio than T-1 ($P < 0.01$) and T-3 ($P < 0.005$). T-0 was not significantly different from T-1, but it had a higher score than T-3 ($P < 0.01$). T-1 and T-3 did not differ from each other. When spine ratio was analyzed at the 24-h interval, significant differences among the groups were found [$F_{(4,15)} = 19.47$, $P < 0.0001$]. Pairwise comparisons revealed that INT did not differ significantly from SO, and each of these two groups had a higher ratio than T-0, T-1, and T-3 (P values ranging from 0.005 to 0.0001). T-0 did not differ from T-1, but it had a higher ratio of spines than T-3 ($P < 0.05$). T-3 and T-1 did not differ from each other (Fig. 3A). The two-way ANOVA indicated that the treatment \times retention interval interaction was not significant [$F_{(3,24)} = 0.40$, $P = 0.75$].

Mushroom Spine Ratios in Dorsolateral Striatum. The result of the ANOVA indicated significant differences among the groups at the 6-h interval [$F_{(4,15)} = 43.83$, $P < 0.0001$]. Pairwise comparisons showed that INT did not differ significantly from SO, and that these two groups had lower spine ratios than the rest of the groups (P values ranging from 0.05 to 0.0001). T-0 had a significantly lower spine ratio than T-1 ($P < 0.05$) and T-3 ($P < 0.001$), and T-3 had a higher spine ratio than T-1 ($P < 0.05$). At the 24-h interval, significant differences among the groups appeared [$F_{(4,15)} = 8.91$, $P < 0.001$]. INT and SO were not significantly different, and their low ratio differed significantly from T-0, T-1, and T-3 (P values ranging from 0.005 to 0.0001). Lastly, T-0, T-1, and T-3 did not differ significantly from each other (Fig. 3B). The two-way ANOVA showed a nonsignificant treatment \times retention interval interaction [$F_{(3,24)} = 1.77$, $P = 0.18$].

Stubby Spine Ratios in Dorsolateral Striatum. There were no significant differences in stubby spine ratios among groups at the 6-h interval [$F_{(4,15)} = 1.02$, $P = 0.43$] or at the 24-h interval [$F_{(4,15)} = 2.21$, $P = 0.12$] (Fig. 3C). The two-way ANOVA showed a nonsignificant treatment \times retention interval interaction [$F_{(3,24)} = 1.29$, $P = 0.30$].

Branched Spine Ratios in Dorsolateral Striatum. The one-way ANOVA showed that there were significant differences among groups at 6 h after training [$F_{(4,15)} = 54.56$, $P < 0.0001$]. INT, SO, and T-0 did not differ significantly from each other, and each of these groups had significantly lower scores than T-1 and T-3 (P values ranging from 0.05 to 0.0001); T-3 had a higher score than T-1 ($P < 0.0001$). The data collected at the 24-h interval yielded a significant treatment effect [$F_{(4,15)} = 3.43$, $P < 0.05$]. T-3 showed a significant difference compared with each of the other groups

Branched Spine Ratios in Dorsomedial Striatum. There were significant differences among groups regarding the ratio of branched spines during consolidation [$F_{(4,15)} = 6.95, P < 0.005$]. There were no significant differences between any of the groups, except for T-3, which had a higher ratio that differed significantly from the rest of the groups (P values ranging between 0.005 and 0.0001). Significant differences among groups were also found at the 24-h interval [$F_{(4,15)} = 8.89, P < 0.05$]. Pairwise comparisons revealed that the only significant differences were the differences between T-3 compared with INT ($P < 0.05$) and with SO ($P < 0.0001$) (Fig. 4D). The two-way ANOVA indicated that the treatment \times retention interval interaction was not significant [$F_{(3,24)} = 1.05, P = 0.39$].

Multihead Spine Ratios in Dorsomedial Striatum. The one-way ANOVA showed that there were significant differences among groups 6 h after training [$F_{(4,15)} = 19.38, P < 0.0001$]. Pairwise comparisons proved that the only significant differences were the differences between T-3, which had a higher ratio of this type of spine, and each of the rest of the groups ($P < 0.0005$ for each comparison). At the 24-h interval, there were also significant differences among groups [$F_{(4,15)} = 3.64, P < 0.05$]. T-3 had a higher score than the rest of the groups (P values ranging from 0.005 to 0.0005), and T-1 also scored higher than INT and T-0 ($P < 0.05$ for both comparisons) (Fig. 4E). The two-way ANOVA indicated that there were no significant differences produced by the treatment \times retention interval interaction [$F_{(3,24)} = 0.27, P = 0.85$].

Thin Spine Ratios in Accumbens Core. There were significant changes in the ratio of thin spines in NAcC during consolidation [$F_{(4,15)} = 7.29, P < 0.005$]. Pairwise comparisons proved that the thin spine ratio was significantly higher in INT than in SO, T-1, and T-3, the foot-shocked groups (P values ranging between 0.005 and 0.0001), but it did not differ from T-0, the nonshocked group. SO had a lower spine ratio than T-0 ($P < 0.05$), and it did not differ significantly from T-1 and T-3; spine ratios were not significantly different between T-0 and T-1 or between T-1 and T-3, but there was a higher ratio in T-0 than in T-3 ($P < 0.01$). Measurements made at the 24-h interval revealed significant differences among groups [$F_{(4,15)} = 6.47, P < 0.005$]. As in the case of the evaluation at the 6-h interval, INT had a significantly higher thin spine ratio than SO, T-1, and T-3 (P values ranging between 0.005 and 0.0001), but it did not differ from T-0. SO had a lower spine ratio than T-0 ($P < 0.001$) and T-1 ($P < 0.001$); T-0 and T-1 did not differ from each other, although the former had a higher spine ratio than T-3 ($P < 0.01$). There were no significant differences between T-1 and T-3 (Fig. 5A). The treatment \times retention interval interaction was not significant [$F_{(3,24)} = 0.40, P = 0.75$].

Mushroom Spine Ratios in Accumbens Core. The results of the ANOVA indicated significant differences among the groups at the 6-h interval [$F_{(4,15)} = 15.63, P < 0.0001$]. The post hoc test showed that INT had a significantly lower ratio of mushroom spines than the groups that received a foot-shock [i.e., SO, T-1, T-3 (P values ranging from 0.005 to 0.0001)], but it did not differ from T-0. SO did not differ from T-1 and T-3, but it had more mushroom spines than T-0 ($P < 0.05$). T-0 had a lower score than T-1 ($P < 0.05$) and T-3 ($P < 0.001$). T-1 and T-3 did not differ from each other. The ANOVA showed that at the 24-h interval, there were significant differences among the groups [$F_{(4,15)} = 6.05, P < 0.005$]. The post hoc test revealed that INT had a significantly lower ratio of mushroom spines than the rest of the groups (P values ranging between 0.01 and 0.0001). SO had a higher ratio of mushroom spines than T-0 ($P < 0.05$), and it did not differ significantly from T-1 and T-3; T-0, T-1, and T-3 did not differ from each other (Fig. 5B). The two-way ANOVA showed that the treatment \times retention interval interaction was not significant [$F_{(3,24)} = 1.02, P = 0.40$].

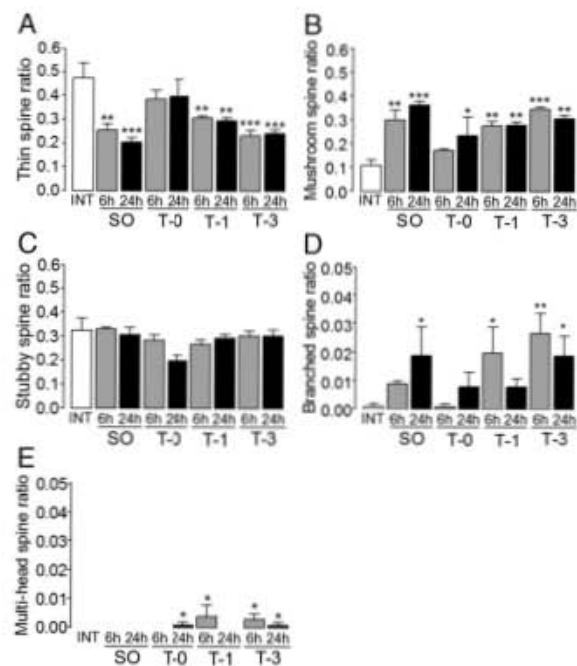


Fig. 5. Dendritic spine types in NAcC: thin (A), mushroom (B), stubby (C), branched (D), and multihead (E). The T-0, T-1, and T-3 groups were trained with 0.0 mA, 1.0 mA, and 3.0 mA, respectively. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.0001$ vs. INT. Note differences in abscissa scales. Each bar represents mean \pm SEM of 40 MNs, obtained from four rats in each condition.

Stubby Spine Ratios in Accumbens Core. The ANOVA indicated that there were no significant differences in stubby spine ratios at either the 6-h interval [$F_{(4,15)} = 0.92, P = 0.48$] or the 24-h interval [$F_{(4,15)} = 2.53, P = 0.08$] (Fig. 5C). The two-way ANOVA indicated that there were no significant differences produced by the treatment \times retention interval interaction [$F_{(3,24)} = 2.29, P = 0.10$].

Branched Spine Ratios in Accumbens Core. The one-way ANOVA showed that there were significant differences in spine ratios among groups at 6 h posttraining [$F_{(4,15)} = 4.55, P < 0.01$]. INT showed a significantly lower ratio of branched spines than T-1 ($P < 0.05$) and T-3 ($P < 0.005$), whereas SO had a lower ratio than T-3 ($P < 0.01$). There were no significant differences between T-1 and T-3, and each of them had a higher spine ratio than T-0 ($P < 0.05$ and $P < 0.005$, respectively).

Regarding the measurements made at the 24-h interval, the ANOVA revealed a significant difference among groups [$F_{(4,15)} = 3.81, P < 0.05$]. INT did not differ significantly from T-0 and T-1, but it had a significantly lower ratio of branched spines than SO ($P < 0.05$) and T-3 ($P < 0.05$). The pairwise comparisons demonstrated that there were no significant differences among the rest of the groups (Fig. 5D). The two-way ANOVA indicated that the treatment \times retention interval interaction was not significant [$F_{(3,24)} = 1.49, P = 0.24$].

Multihead Spine Ratios in Accumbens Core. The ANOVA indicated significant differences among the groups at the 6-h interval [$F_{(4,15)} = 2.38, P < 0.05$]. The spine ratio of INT was not statistically different from the spine ratios of SO and T-0, but it was lower than the spine ratios of T-1 ($P < 0.05$) and T-3 ($P < 0.0005$). SO did not differ from T-0 and T-1, but its spine ratio was significantly lower than the spine ratio of T-3 ($P < 0.01$). T-0 had a lower spine ratio

than T-1 ($P < 0.05$) and T-3 ($P < 0.0005$); T-1 and T-3 did not differ from each other. At the 24-h interval, the groups also differed significantly [$F_{(4,15)} = 2.38, P < 0.05$]. The post hoc test showed that INT did not differ significantly from S0 and T-1, and it had a lower spine ratio than T-0 ($P < 0.05$) and T-3 ($P < 0.0005$). Likewise, SO did not differ significantly from T-1, and it had a lower spine ratio than T-0 ($P < 0.05$) and T-3 ($P < 0.005$). T-0 had a higher spine ratio than T-1 ($P < 0.05$), and it did not differ from T-3, and T-1 also had a lower ratio than T-3 ($P < 0.05$) (Fig. 5E). The two-way ANOVA indicated that the treatment \times retention interval interaction was not significant [$F_{(3,24)} = 0.93, P = 0.44$].

Thin Spine Ratios in Accumbens Shell. Highly significant differences among the groups at the 6-h interval were revealed by the ANOVA [$F_{(4,15)} = 9.54, P = 0.0005$]. INT showed a higher spine ratio than the foot-shocked groups (SO, T-1, and T-3; P values ranging from 0.0005 to 0.0001), but it did not differ from T-0. SO showed a lower ratio than T-0 ($P < 0.05$), but its spine ratio was not significantly different from T-1 and T-3. T-0 had a higher spine ratio than T-1 and T-3 ($P < 0.05$ for both comparisons). Also, the foot-shocked groups did not differ significantly from each other. The ANOVA also showed a significant treatment effect at the 24-h interval [$F_{(4,15)} = 2.38, P < 0.05$]. Pairwise comparisons produced, basically, the same results as the results obtained at the 6-h interval. INT showed a higher spine ratio than the foot-shocked groups (SO, T-1, and T-3; P values ranging from 0.05 to 0.0005), but it did not differ from T-0. SO had a significantly lower spine ratio than T-0 ($P < 0.005$). T-0 did not differ from T-1, and it had a higher spine ratio than T-3 ($P < 0.01$). These two foot-shocked groups did not differ significantly from each other (Fig. 6A). The two-way ANOVA indicated that the treatment \times retention interval interaction was not significant [$F_{(3,24)} = 0.12, P = 0.95$].

Mushroom Spine Ratios in Accumbens Shell. The one-way ANOVA showed that there were significant differences in spine ratios among groups 6 h after training [$F_{(4,15)} = 13.72, P < 0.0001$]. INT showed a significantly lower mushroom spine ratio than the foot-shocked groups (SO, T-1, and T-3; P values ranging from 0.001 to 0.0001), but it did not differ from T-0. The foot-shocked groups (SO, T-1, and T-3) had higher scores than T-0 (P values ranging from 0.05 to 0.005), and these foot-shocked groups did not differ significantly from each other. Regarding the measurements made at the 24-h interval, the ANOVA revealed a significant difference among groups [$F_{(4,15)} = 5.26, P < 0.01$]. INT showed a significantly lower mushroom spine ratio than the rest of the groups (P values ranging from 0.05 to 0.0001). T-0 also had a lower spine ratio than T-3 ($P < 0.05$), but it did not differ significantly from T-1. The pairwise comparisons demonstrated that SO, T-1, and T-3 did not differ from each other (Fig. 6B). The two-way ANOVA indicated that the treatment \times retention interval interaction was not significant [$F_{(3,24)} = 0.86, P = 0.48$].

Stubby Spine Ratios in Accumbens Shell. The ANOVA indicated that there were no significant differences in stubby spine ratios at the 6-h interval [$F_{(4,15)} = 1.26, P = 0.33$] and 24-h interval [$F_{(4,15)} = 5.03, P = 0.06$] (Fig. 6C). The two-way ANOVA indicated that the treatment \times retention interval interaction was not significant [$F_{(3,24)} = 4.48, P = 0.12$].

Branched Spine Ratios in Accumbens Shell. The ANOVA indicated that there were significant differences in branched spine ratios at the 6-h interval [$F_{(4,15)} = 4.05, P < 0.05$]. The only significant difference between groups was the difference between T-0 and T-3 ($P < 0.05$). At the 24-h interval, no differences among groups were found [$F_{(4,15)} = 0.77, P = 0.56$] (Fig. 6D). The two-way ANOVA indicated that the treatment \times retention interval interaction was not significant [$F_{(3,24)} = 1.26, P = 0.31$].

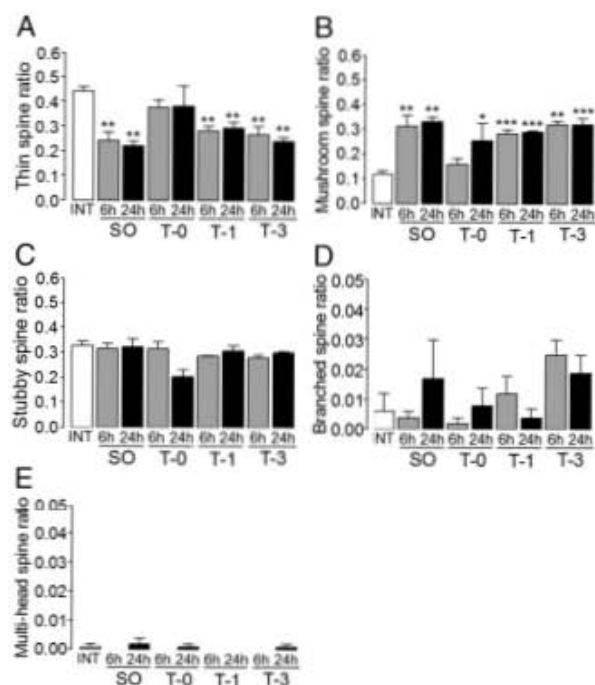


Fig. 6. Dendritic spine types in NAcS: thin (A), mushroom (B), stubby (C), branched (D), and multihead (E). The T-0, T-1, and T-3 groups were trained with 0.0 mA, 1.0 mA, and 3.0 mA, respectively. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.0001$ vs. INT. Note differences in abscissa scales. Each bar represents mean \pm SEM of 40 MSNs, obtained from four rats in each condition.

Multihead Spine Ratios in Accumbens Shell. The ANOVA indicated that there were no significant differences in multihead spine ratios at the 6-h interval [$F_{(4,15)} = 1.00, P = 0.44$] and the 24-h interval [$F_{(4,15)} = 0.27, P = 0.90$] (Fig. 6E). The two-way ANOVA indicated that the treatment \times retention interval interaction was not significant [$F_{(3,24)} = 0.35, P = 0.79$].

Discussion

The main findings of this work were that moderate training of IA induced increased spine density and an augmented ratio of mushroom spines in both the DLS and DMS. Intense training of this task further increased spine density in both striatal regions, as well as in the ratio of mushroom spines, but only in the DMS. This spinogenesis was specific to the association of the context and the foot-shock, because exposure to the context alone produced smaller changes and the foot-shock by itself produced no changes. These results strongly suggest that the effects are due to changes mediating memory.

The extinction results indicated that the higher foot-shock intensity used in training induced enhanced learning; that is, the 3.0-mA group showed significantly higher resistance to extinction in comparison to rats trained with the moderate foot-shock intensity (1.0-mA group), thus confirming earlier work from our group in which the same IA task was studied (49, 50).

At 6 h and 24 h after training, the increase in dendritic spine density in the MSNs of DLS and DMS was directly proportional to the foot-shock intensity administered during training (Fig. 2A and B). Exposure to the context provided by the conditioning box without the administration of foot-shock (T-0 group) also increased spine density. However, this increase was significantly lower than the increase in the trained groups. Interestingly, the foot-shock by itself did not induce a significant change in spine density (SO group).

As we had expected, there were no significant differences in spine density between DLS and DMS. These results indicate that MSNs of DLS and DMS are responsive to both the contextual and procedural information induced by the learning experience (4, 13, 14). In contrast, the finding that foot-shock administered alone did not induce changes in spine density suggests that MSNs of the dorsal striatum are not involved in processing nonassociative aversive stimulation. These patterns of spine dynamics seen at 6 h were maintained at 24 h, suggesting that the relatively early changes brought about by both procedural and contextual learning are persistent.

A different picture emerged from analysis of the accumbens. In the NAcS, an intensity-dependent increase in the amount of dendritic spines occurred after training with 1.0 mA and 3.0 mA, both at the 6-h and 24-h intervals, as was the case in dorsal striatum. Also, a significant increase in spine density was found at the 6-h interval after stimulation with the foot-shock alone. However, no changes were produced in the 0-mA (only context) group. These data seem to imply that spinogenesis in NAcS in the trained animals is only related to the effects of the foot-shock, rather than to the associative processes involved in IA learning. The only change in spine density found in the accumbens core was an increase when the 3.0-mA foot-shock was administered during IA training. This result also suggests that dendritic spines of this region of the accumbens are not sensitive to the complex interaction of stimuli and responses involved in IA training (Fig. 2 C and D), because no changes were produced in the context-alone situation or after training with the lower foot-shock.

In relation to the different types of spines that were studied, three very consistent findings emerged. First, in DLS and DMS, there was a significant reduction in the ratio of thin spines in the groups that were only exposed to the conditioning box (T-0 group) and in the groups that had been trained with 1.0 and 3.0 mA (T-1 and T-3 groups), both at the 6-h and 24-h intervals. In contrast, the ratio of mushroom spines of DMS increased significantly in T-0, T-1, and T-3 at 6 h and 24 h after training; this increase was dependent upon the intensity of the foot-shock that had been administered (i.e., the T-3 group showed a greater increment than the other groups). There was also a significant intensity-dependent increment of mushroom spine ratios in DLS in the context (T-0) and trained (T-1 and T-3) groups during the consolidation period. At variance with the intensity-dependent changes in mushroom spine ratios just described, the increments in mushroom ratios seen in DLS did not differ significantly between the T-1 and T-3 groups (i.e., intense training did not induce further mushroom spinogenesis). Interestingly, the foot-shock alone (SO group) did not induce changes in the number of thin and mushroom spines in these two regions at either interval. These data agree well with the assumption that thin spines are involved in learning and that as this process gives way to storing of information, there is a reduction in the number of thin spines and a correlative increase in the population of mushroom spines. Such effects may be involved in enabling LTM (43, 51–53).

Second, thin spine ratio declined significantly in both the accumbens core and shell at both time intervals in all foot-shocked groups, whether they had been trained or not. No changes in the ratio of thin spines were observed in the nonshocked groups. Mushroom spine ratios increased significantly in both the accumbens core and shell at both time intervals in all foot-shocked groups whether they had been trained or not, and no changes were observed in the nonshocked groups. These results suggest that, as in the case of spine density in these two regions, the changes in thin and mushroom spines are related to the aversive component of the learning experience rather than the complex associative processes derived from the interaction among the context, foot-shock, and motor performance involved in IA.

Third, in the two dorsal and two ventral striatal regions, stubby spine ratios remained unchanged despite the different manipula-

tions that were enforced. The role of stubby spines remains unknown, although this spine type is thought to regulate neuronal excitability (54), because the stubby spines facilitate the diffusion of calcium ions to the parental dendrite (53).

Branched spine ratio was increased in DMS only after training with the higher foot-shock intensity, both at the 6-h and 24-h intervals. This increase in branched spine ratio also happened in the DLS, where, additionally, there was an increase in the group that had been trained with 1.0 mA at the 6-h interval. These results indicate that high-intensity IA training, but not simple exposure to context or to the foot-shock alone, induced development of branched spines in both DMS and DLS. Thus, in these striatal regions, branched spines appear to participate in the afferent activity derived from the associative processes involved in intense training. In regard to the NAcC, the ratio of this type of spine was increased after training with 1.0 mA and 3.0 mA, as well as in the group that received the foot-shock alone; however, exposure to the context, by itself, did not modify this ratio. Although these results might suggest that branched spines in the accumbens core may also be engaged in memory of avoidance training, the fact that they were increased by foot-shock alone, and that no change was produced by exposure to the context, clearly argues against this interpretation. Surprisingly, branched spines in NAcS were not changed by any of the experimental manipulations.

Multihead spine dynamics showed some variability. There was an increase in the ratio of multihead spines in DLS after training with 1.0 mA at the 24-h testing interval, with 3.0 mA at the two testing intervals, and in the 0-mA (context) group at the 24-h interval. The same was true for DMS, except that the ratio remained unchanged in the 0-mA group. The foot-shock by itself did not produce changes in the ratio of multihead spines. Thus, development of multihead spines can be detected when LTM has already been formed after moderate and intense training, but only intense training promotes multihead spinogenesis during consolidation.

Multihead spine ratios in NAcC did not change at the 6-h interval in the SO and T-0 groups, but they were increased in the T-1 and T-3 groups; at 24 h, there was an increment in the ratio in the T-0 and T-3 groups. A remarkable feature of multihead spines in the NAcC was that, unlike all other spine types in this region and in the NAcS, their ratio did not change as a consequence of the administration of the foot-shock alone. However, this ratio increased after exposure to the context and after training with both low and high foot-shock intensities. It thus seems possible that the formation of new multihead spines may underlie the reported involvement of the accumbens in memory of aversive events (55–57). In view of the lack of consistency in the dynamics shown by the multihead spines, it is difficult at this time to determine a clear function of these spines in memory formation.

An important premise underlying this study was that dorsal striatum participates in the integration of information derived from the learning experience, which is provided by a number of structures. In general, the expectations of this study were met, namely, that both the DMS and DLS regions of the dorsal striatum would show the same patterns of spine dynamics after IA training (i.e., that stronger learning would induce increased spine density compared with weaker learning). Also, there was an increase in the ratio of mushroom spines in these two regions. Mushroom dendritic spines are stable; they can persist for months (58, 59). Mushroom dendritic spines have a greater head volume than other spines, which correlates positively with the area of postsynaptic density (60), the amount of presynaptic vesicles (60), the size of the presynaptic active zone (61), the number of postsynaptic receptors (62), and the current injected into the synapse (62, 63); all these features are important for generating long-term modifications in the efficiency of excitatory signals and lend support to the notion that mushroom spines represent a physical substrate of LTM.

As described above, in both DLS and DMS, the ratio of mushroom spines was augmented in an intensity-dependent fashion

during consolidation, indicating that the transfer from short-term memory to LTM is facilitated in intense training through increased mushroom spinogenesis. On the other hand, there was an important difference between DMS and DLS in relation to the behavior of this type of spine during LTM. Whereas in the former, training with the foot-shock of high intensity induced a higher ratio of this type of spine than training with the low-intensity foot-shock, in DLS, intense training did not increase the ratio of mushroom spines more than moderate training did. This dissimilar outcome may be due to the different types of learning these regions mediate (spatial/contextual vs. procedural), as well as their dissimilar connectivity. The DMS receives afferent fibers, directly or indirectly, from the dorsal hippocampus and medial prefrontal cortex, whereas the afferents to DLS originate mainly in somatosensory and motor cortical areas (64).

It is reasonable to postulate that in the INT animals, as the intensity of the training is increased and a stronger association between the context and the aversive stimulation is formed, a heightened glutamatergic synaptic activation of DMS MSNs by hippocampus and medial prefrontal cortex takes place, thus promoting a larger mushroom spinogenesis than produced by moderate training. Concurrent, stress-dependent activation of glucocorticoid receptors activates kinase pathways, which results in further mushroom spinogenesis, within an appropriate time frame (<6 h). When normal activity of the dorsal striatum is importantly disturbed, as when its synaptic activity is disrupted by sodium channel blockers, an amnesic state ensues in those animals that have been subjected to moderate training. Consolidation may take place, however, after intense training because the enhanced release of corticosterone promotes an increased nongenomic spinogenesis of mushroom spines.

In the case of DLS, an augmented ratio of mushroom spines was produced by moderate training of the one-trial IA task, indicating that a single stimulus–response association is sufficient to induce changes in mushroom spinogenesis. Increased intensity of training did not induce an additional increase in DLS mushroom spine density, maybe because there was not a further increase in the afferent signals from the neocortex. One can hypothesize that additional sessions of IA training (i.e., a higher number of stimulus–response associations) would produce a habitual type of response, which is characteristic of procedural learning. Thus, after additional training, an increase in mushroom spines in DLS would be induced by heightened activation of the cortical-striatal connections. Previous work from our laboratory, where cats and rats were trained to perform an instrumental lever-press response, showed that infusion of cholinergic blockers (65) or sodium channel blockers (7) into the caudate nucleus and dorsal striatum, respectively, produced amnesia when the animals were treated during the early phases of learning, but no deficits were seen after extended training (i.e., when the response had become habitual). We can hypothesize that this extended training should have induced enhanced spinogenesis and an increased ratio of mushroom spines in DLS, at least in the rat.

These findings also suggest that increased mushroom spinogenesis produced by intense training strengthens memory consolidation and facilitates the transfer of information from the dorsal striatum to other cerebral regions. Such increased spinogenesis may account for the protective effect against amnesic treatments. These mechanisms might be relevant for understanding why highly emotional memories, such as the ones causing posttraumatic stress disorder, are so enduring.

Materials and Methods

Animals. We studied male Wistar rats (250–350 g) bred at the Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México. They were maintained on a 12-h/12-h light/dark cycle (lights on at 0700 h) at a temperature between 22 °C and 23 °C, housed individually with food and tap water ad libitum. Behavioral observations were carried out between 0900 h and 1300 h. All procedures were in compliance with the *Guide for the Care and Use of Laboratory*

Animals of the NIH (66) and were approved by the Animal Ethics Committee of the Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México.

Inhibitory avoidance training apparatus. Subjects received 5-min daily handling sessions for three consecutive days before training in an IA task (details are provided in *SI Materials and Methods* and ref. 67). The apparatus is an alley with two distinct compartments separated by a guillotine door. The safe compartment has a floor of stainless-steel bars, and a 10-W light bulb located in the center of its lid illuminated it. The nonilluminated shock compartment was made of electrifiable stainless-steel plates.

Extinction. On the day of training, each animal was put inside the lit compartment; 10 s later, the door between the compartments was opened and the latency to cross to the dark shock compartment was measured (training latency). Upon crossing, the door was closed and a foot-shock of 1.0 mA ($n = 10$) or 3.0 mA ($n = 10$) was delivered. Five seconds after shock onset, the door was reopened, allowing the animal to escape to the lit compartment; this latency was also measured (escape latency). An additional group was subjected to the same training procedure except that the foot-shock was omitted ($n = 10$). Starting 24 h after training, extinction of the task was measured on seven consecutive days; the same procedure of training was followed except that the foot-shock was omitted. **Consolidation and LTM.** Assessment of spine density and morphology was carried out at 6 h and 24 h after training; these retention intervals fall within the limits of consolidation and LTM of IA in the rat (47). Two groups of rats were trained as described above using 1.0 mA (T-1 group, $n = 20$) and 3.0 mA (T-3 group, $n = 20$), respectively. A third group did not receive the foot-shock (T-0 group, $n = 20$); this group controlled for exploratory activity inside the conditioning chamber. Half of the animals in each group were given a test of retention at 6 h after training, and the other half were given a test of retention at 24 h after training; during these sessions, the same procedure of training was followed except that the electric foot-shock was omitted. Immediately after the retention session, four animals from each group were killed to perform the histological analyses.

Morphometric analysis. Upon euthanasia, the rats' brains were removed and processed according to the modified Golgi–Cox staining method, as described by Gibb and Kolb (68) (details are provided in *SI Materials and Methods*). The MSNs were identified by their soma size, dendritic extensions, and numerous dendritic spines. A total of 1,440 MSNs were analyzed: five neurons per hemisphere \times four brain regions \times nine groups \times four rats per group. Dendritic spines were classified into five different types: thin, mushroom, stubby, branched, and multihead (25, 69, 70). The total density of dendritic spines per region was expressed as the mean of dendritic spines in 10 neurons for each animal; spine counting was carried out in a single secondary dendrite in each neuron, along a 30- μ m segment, starting 130 μ m away from the soma. On the other hand, the quantification of dendritic spines according to shape was expressed as a ratio in relation to total dendritic spines (i.e., number of spines of a given shape/total number of spines in the 10 segments per region in each animal). This procedure would allow us to detect potential changes in the dynamics of spine formation as a function of the diverse independent variables that were studied (details are provided in *SI Materials and Methods*).

Statistical Analyses. Independent Kruskal–Wallis ANOVAs were computed for acquisition, escape, and retention latencies. When appropriate, the Mann–Whitney U test was used to make comparisons between any two groups.

The Friedman test was used in analyzing retention latencies across the 7 d of extinction, followed, when appropriate, by the Wilcoxon signed-rank test to make comparisons between any 2 d along the extinction sessions in each group. To compare retention scores among the three groups on each day of extinction testing, the Kruskal–Wallis and Mann–Whitney U tests were computed. One-way ANOVAs were used to determine if there were significant effects of treatments on total dendritic spines and ratios of spine shapes in each region at the 6-h retention interval; the same was done for the data at the 24-h retention interval. To compare spine density and ratios of spine shapes in each region obtained at 6 h vs. 24 h, two-way ANOVAs were run, excluding the INT group. Only the results of the treatment \times retention interval interactions were taken into account, because the one-way ANOVAs served to find potential differences induced by the treatments at each retention interval. In every case, the post hoc Bonferroni test was used when appropriate.

ACKNOWLEDGMENTS. We thank A. C. Medina, N. Serafin, M. G. Martínez, M. E. Torres, C. X. Ruiz, O. González, E. N. Hernández, A. Méndez, R. Vasquez, L. Casanova, and M. García for their excellent technical and administrative assistance, and Dr. J. Larriva-Sahd for helpful comments on the manuscript. This research was supported by grants provided by Dirección General de Asuntos del Personal Académico–UNAM (PAPIIT IN201415) and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT 237570). This work was carried out in partial fulfillment of the requirements to obtain the Doctor's Degree (Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México) by P.C.B.-M., who was a recipient of a Graduate Scholarship from CONACYT (Becario 234103).

1. Prado-Alcalá RA, Medina AC, Lopez NS, Quirarte GL (2012) Intense emotional experiences and enhanced training prevent memory loss induced by post-training amnesic treatments administered to the striatum, amygdala, hippocampus or substantia nigra. *Rev Neurosci* 23(5-6):501–508.
2. Divac I, Oberg RGE (1979) Current conceptions of neostriatal functions. History and evaluation. *The Neostriatum*, eds Divac I, Oberg RGE (Pergamon, Oxford), pp 215–230.
3. Prado-Alcalá RA (1995) Serial and parallel processing during memory consolidation. *Plasticity in the Central Nervous System: Learning and Memory*, eds McGaugh JL, Bermúdez-Rattoni F, Prado-Alcalá RA (Lawrence Erlbaum Associates, Mahwah, NJ), pp 57–65.
4. Packard MG, Knowlton BJ (2002) Learning and memory functions of the Basal Ganglia. *Annu Rev Neurosci* 25:563–593.
5. White NM (2009) Some highlights of research on the effects of caudate nucleus lesions over the past 200 years. *Behav Brain Res* 199(1):3–23.
6. Prado-Alcalá RA, Cobos-Zapain GG (1977) Learning deficits induced by cholinergic blockade of the caudate nucleus as a function of experience. *Brain Res* 138(1):190–196.
7. Prado-Alcalá RA, Cobos-Zapain GG (1979) Interference with caudate nucleus activity by potassium chloride. Evidence for a “moving” engram. *Brain Res* 172(3):577–583.
8. Salado-Castillo R, Sánchez-Alavéz M, Quirarte GL, Martínez García MI, Prado-Alcalá RA (2011) Enhanced training protects memory against amnesia produced by concurrent inactivation of amygdala and striatum, amygdala and substantia nigra, or striatum and substantia nigra. *Front Behav Neurosci* 5:83.
9. Giordano M, Prado-Alcalá RA (1986) Retrograde amnesia induced by post-trial injection of atropine into the caudate-putamen. Protective effect of the negative reinforcer. *Pharmacol Biochem Behav* 24(4):905–909.
10. Pérez-Ruiz C, Prado-Alcalá RA (1989) Retrograde amnesia induced by lidocaine injection into the striatum: protective effect of the negative reinforcer. *Brain Res Bull* 22(4):599–603.
11. Salado-Castillo R, Diaz del Guante MA, Alvarado R, Quirarte GL, Prado-Alcalá RA (1996) Effects of regional GABAergic blockade of the striatum on memory consolidation. *Neurobiol Learn Mem* 66(2):102–108.
12. Lozano YR, Serafin N, Prado-Alcalá RA, Roozendaal B, Quirarte GL (2013) Glucocorticoids in the dorsomedial striatum modulate the consolidation of spatial but not procedural memory. *Neurobiol Learn Mem* 101:55–64.
13. White NM, McDonald RJ (2002) Multiple parallel memory systems in the brain of the rat. *Neurobiol Learn Mem* 77(2):125–184.
14. Devan BD, White NM (1999) Parallel information processing in the dorsal striatum: role to hippocampal function. *J Neurosci* 19(7):2789–2798.
15. O'Malley A, O'Connell C, Murphy KJ, Regan CM (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.
16. Leuner B, Falduo J, Shors TJ (2003) Associative memory formation increases the observation of dendritic spines in the hippocampus. *J Neurosci* 23(2):659–665.
17. Restivo L, Vetere G, Bontempi A, Ammassari-Teule M (2009) The formation of recent and remote memory is associated with time-dependent formation of dendritic spines in the hippocampus and anterior cingulate cortex. *J Neurosci* 29(25):8206–8214.
18. Moser MB, 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. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(26):12673–12675.
19. O'Malley A, O'Connell C, Regan CM (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.
20. Eyre MD, Richter-Levin G, Avital A, Stewart MG (2003) Morphological changes in hippocampal dentate gyrus synapses following spatial learning in rats are transient. *Eur J Neurosci* 17(9):1973–1980.
21. Aceti M, Vetere G, Novembre G, Restivo L, Ammassari-Teule M (2015) Progression of activity and structural changes in the anterior cingulate cortex during remote memory formation. *Neurobiol Learn Mem* 123:67–71.
22. Heinrichs SC, et al. (2013) Dendritic structural plasticity in the basolateral amygdala after fear conditioning and its extinction in mice. *Behav Brain Res* 248:80–84.
23. González-Tapia D, Velázquez-Zamora DA, Olvera-Cortés ME, González-Burgos I (2015) The motor learning induces plastic changes in dendritic spines of Purkinje cells from the neocerebellar cortex of the rat. *Restor Neurol Neurosci* 33(5):639–645.
24. Comery TA, Stamoudis CX, Irwin SA, Greenough WT (1996) Increased density of multiple-head dendritic spines on medium-sized spiny neurons of the striatum in rats reared in a complex environment. *Neurobiol Learn Mem* 66(2):93–96.
25. Comery TA, Shah R, Greenough WT (1995) Differential rearing alters spine density on medium-sized spiny neurons in the rat corpus striatum: evidence for association of morphological plasticity with early response gene expression. *Neurobiol Learn Mem* 63(3):217–219.
26. McGaugh JL, Cahill L, Roozendaal B (1996) Involvement of the amygdala in memory storage: interaction with other brain systems. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(24):13508–13514.
27. Luine V, Martínez C, Villegas M, Magariños AM, McEwen BS (1996) Restraint stress reversibly enhances spatial memory performance. *Physiol Behav* 59(1):27–32.
28. Oitzl MS, de Kloet ER (1992) Selective corticosteroid antagonists modulate specific aspects of spatial orientation learning. *Behav Neurosci* 106(1):62–71.
29. Sandi C, Loscertales M, Guaza C (1997) Experience-dependent facilitating effect of corticosterone on spatial memory formation in the water maze. *Eur J Neurosci* 9(4):637–642.
30. Cordero MI, Merino JJ, Sandi C (1998) Correlational relationship between shock intensity and corticosterone secretion on the establishment and subsequent expression of contextual fear conditioning. *Behav Neurosci* 112(4):885–891.
31. Shors TJ, Weiss C, Thompson RF (1992) Stress-induced facilitation of classical conditioning. *Science* 257(5069):537–539.
32. Sandi C (1998) The role and mechanisms of action of glucocorticoid involvement in memory storage. *Neural Plast* 6(3):41–52.
33. Cottrell GA, Nakajima S (1977) Effect of corticosteroids in the hippocampus on passive avoidance behavior in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 7(3):277–280.
34. Fornari RV, et al. (2012) Involvement of the insular cortex in regulating glucocorticoid effects on memory consolidation of inhibitory avoidance training. *Front Behav Neurosci* 6:10.
35. Medina AC, et al. (2007) Glucocorticoid administration into the dorsal striatum [corrected] facilitates memory consolidation of inhibitory avoidance training but not of the context or footshock components. *Learn Mem* 14(10):673–677.
36. Roozendaal B, McGaugh JL (1996) Amygdaloid nuclei lesions differentially affect glucocorticoid-induced memory enhancement in an inhibitory avoidance task. *Neurobiol Learn Mem* 65(1):1–8.
37. Komatsuzaki Y, et al. (2012) Corticosterone induces rapid spinogenesis via synaptic glucocorticoid receptors and kinase networks in hippocampus. *PLoS One* 7(4):e34124.
38. Komatsuzaki Y, et al. (2005) Rapid spinogenesis of pyramidal neurons induced by activation of glucocorticoid receptors in adult male rat hippocampus. *Biochem Biophys Res Commun* 335(4):1002–1007.
39. Orchinik M, Murray TF, Moore FL (1991) A corticosteroid receptor in neuronal membranes. *Science* 252(5014):1848–1851.
40. Joëls M, Sarabdjitsingh RA, Karst H (2012) Unraveling the time domains of corticosteroid hormone influences on brain activity: rapid, slow, and chronic modes. *Pharmacol Rev* 64(4):901–938.
41. Pasricha N, Joëls M, Karst H (2011) Rapid effects of corticosterone in the mouse dentate gyrus via a nongenomic pathway. *J Neuroendocrinol* 23(2):143–147.
42. Tasker JG, Herman JP (2011) Mechanisms of rapid glucocorticoid feedback inhibition of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Stress* 14(4):398–406.
43. Bourne J, Harris KM (2007) Do thin spines learn to be mushroom spines that remember? *Curr Opin Neurobiol* 17(3):381–386.
44. Matsuzaki M, et al. (2001) Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nat Neurosci* 4(11):1086–1092.
45. Ashby MC, Maier SR, Nishimune A, Henley JM (2006) Lateral diffusion drives constitutive exchange of AMPA receptors at dendritic spines and is regulated by spine morphology. *J Neurosci* 26(26):7046–7055.
46. McDonald RJ, White NM (1993) A triple dissociation of memory systems: hippocampus, amygdala, and dorsal striatum. *Behav Neurosci* 107(1):3–22.
47. Igaz LM, Vianna MR, Medina JZ, Izquierdo I (2002) Two time periods of hippocampal mRNA synthesis are required for memory consolidation of fear-motivated learning. *J Neurosci* 22(15):6781–6789.
48. Meredith GE, Agolia R, Arts MPM, Groenewegen HJ, Zahm DS (1992) Morphological differences between projection neurons of the core and shell in the nucleus accumbens of the rat. *Neuroscience* 50(1):149–162.
49. Prado-Alcalá RA, Haiek M, Rivas S, Roldán-Roldán G, Quirarte GL (1994) Reversal of extinction by scopolamine. *Physiol Behav* 56(1):27–30.
50. Garin-Aguilar ME, et al. (2012) Extinction procedure induces pruning of dendritic spines in CA1 hippocampal field depending on strength of training in rats. *Front Behav Neurosci* 6:12.
51. Medvedev NI, et al. (2014) Multiple spine boutons are formed after long-lasting LTP in the awake rat. *Brain Struct Funct* 219(1):407–414.
52. Maiti P, Manna J, Ilavazhagan G, Rössignol J, Dunbar GL (2015) Molecular regulation of dendritic spine dynamics and their potential impact on synaptic plasticity and neurological diseases. *Neurosci Biobehav Rev* 59:208–237.
53. Hayashi Y, Majewska AK (2005) Dendritic spine geometry: functional implication and regulation. *Neuron* 46(4):529–532.
54. González-Burgos I (2012) From synaptic transmission to cognition: an intermediary role for dendritic spines. *Brain Cogn* 80(1):177–183.
55. Yamaguchi T, et al. (2015) Role of PKA signaling in D2 receptor-expressing neurons in the core of the nucleus accumbens in aversive learning. *Proc Natl Acad Sci USA* 112(36):11383–11388.
56. Ventura R, Morrone C, Puglisi-Allegra S (2007) Prefrontal/accumbal catecholamine system determines motivational salience attribution to both reward- and aversion-related stimuli. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(12):5181–5186.
57. Roitman MF, Wheeler RA, Tiesinga PHE, Roitman JD, Carelli RM (2010) Hedonic and nucleus accumbens neural responses to a natural reward are regulated by aversive conditioning. *Learn Mem* 17(11):539–546.
58. Holtmaat AJ, et al. (2005) Transient and persistent dendritic spines in the neocortex in vivo. *Neuron* 45(2):279–291.
59. Zuo Y, Yang G, Kwon E, Gan WB (2005) Long-term sensory deprivation prevents dendritic spine loss in primary somatosensory cortex. *Nature* 436(7048):261–265.
60. Harris KM, Stevens JK (1989) Dendritic spines of CA1 pyramidal cells in the rat hippocampus: serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics. *J Neurosci* 9(8):2982–2997.
61. Schikorski T, Stevens CF (1999) Quantitative fine-structural analysis of olfactory cortical synapses. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(7):4107–4112.
62. Nusser Z, et al. (1998) Cell type and pathway dependence of synaptic AMPA receptor number and variability in the hippocampus. *Neuron* 21(3):545–559.
63. Nusser Z, Cull-Candy S, Farrant M (1997) Differences in synaptic GABA_A receptor number underlie variation in GABA mini amplitude. *Neuron* 19(3):697–709.
64. McGeorge AJ, Faull RL (1989) The organization of the projection from the cerebral cortex to the striatum in the rat. *Neuroscience* 29(3):503–537.
65. Prado-Alcalá RA, Kaufmann P, Moscona R (1980) Scopolamine and KCl injections into the caudate nucleus. Overtraining-induced protection against deficits of learning. *Pharmacol Biochem Behav* 12(2):249–253.
66. National Research Council (2011) *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (National Academy of Sciences, Washington, DC), 8th Ed.
67. Garin-Aguilar ME, Medina AC, Quirarte GL, McGaugh JL, Prado-Alcalá RA (2014) Intense aversive training protects memory from the amnesic effects of hippocampal inactivation. *Hippocampus* 24(1):102–112.
68. Gibb R, Kolb B (1998) A method for vibratome sectioning of Golgi-Cox stained whole rat brain. *J Neurosci Methods* 79(1):1–4.

69. Robinson TE, Kolb B (1997) Persistent structural modifications in nucleus accumbens and prefrontal cortex neurons produced by previous experience with amphetamine. *J Neurosci* 17(21):8491–8497.
70. Harris KM, Jensen FE, 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. *J Neurosci* 12(7):2685–2705.
71. Paxinos G, Watson C (2007) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* (Academic, Burlington, MA), 6th Ed.
72. Flores G, Morales-Medina JC, Diaz A (2016) Neuronal and brain morphological changes in animal models of schizophrenia. *Behav Brain Res* 301:190–203.
73. Yager LM, Garcia AF, Wunsch AM, Ferguson SM (2015) The ins and outs of the striatum: role in drug addiction. *Neuroscience* 301:529–541.
74. Gerfen CR (1988) Synaptic organization of the striatum. *J Electron Microscop Tech* 10(3): 265–281.
75. Smith AD, Bolam JP (1990) The neural network of the basal ganglia as revealed by the study of synaptic connections of identified neurones. *Trends Neurosci* 13(7): 259–265.