

## **4. EXPERIMENTO II**

---

## 4.1. OBJETIVOS

Los resultados del experimento I indican que la lesión electrolítica bilateral del PPTg provoca un grave deterioro de la adquisición del condicionamiento de EV2, deterioro que se ve agravado si se aumenta el nivel de dificultad de la tarea. En contraste, se ha constatado en otros trabajos que las lesiones post-entrenamiento del PPTg no alteran la retención ni de las tareas de EV2 (Fujimoto y cols., 1992), ni de evitación activa de un sentido (Müller y Klingberg, 1986). Cabe tener en cuenta, sin embargo, que en los experimentos que han estudiado los efectos de la lesión post-entrenamiento del PPTg sobre la retención de tareas de evitación, la lesión se practicaba como mínimo 24 horas después de la última sesión de entrenamiento. Ello implica, por tanto, que el proceso de consolidación de la memoria se había iniciado cuando los animales todavía conservaban el PPTg intacto. Si tenemos en cuenta que la mayoría de los tratamientos moduladores de la memoria suelen tener mayor influencia en la misma cuando son aplicados con la menor demora posible respecto al entrenamiento (McGaugh, 2000), resulta plausible considerar que el hecho de que los animales de los experimentos citados mostraran un buen nivel de RLP de las tareas de evitación podría ser debido a que no se interfirió con el proceso de consolidación de la memoria para dicho condicionamiento.

Por otro lado, en el experimento I se puso de manifiesto que los animales lesionados no sólo mostraban alteraciones en la ejecución de la tarea de EV2, sino que también mostraban alteraciones motoras probablemente relacionadas con la situación de aprendizaje, como una mayor latencia de las respuestas de escape, un menor número de cruzamientos entre-ensayos e incluso en algunos ensayos dejaban de emitir la respuesta tanto condicionada como incondicionada. Aunque trabajos llevados a cabo en otros laboratorios ya habían puesto de manifiesto la existencia de una grave disrupción del mismo tipo de aprendizaje tras las lesiones excitotóxicas del PPTg, en estos estudios no se describe la aparición de cambios motores en los animales lesionados. Ello todavía resulta más sorprendente si tenemos en cuenta que Fujimoto y cols. (1989, 1990 y 1992) utilizaron un EI de sólo 5 segundos de duración, lo cual requiere que el animal escape con rapidez del mismo. Por ello, existe la posibilidad de que, aunque el aprendizaje de EV2 se vea alterado tanto tras las lesiones electrolíticas como tras las lesiones excitotóxicas del PPTg, los mecanismos que median dicha alteración sean diferentes en función del tipo de lesión (y, por tanto, de si hay afectación o no de las vías de paso que atraviesan el núcleo). Si las

alteraciones motoras y/o de la nocicepción fueran determinantes en la inducción de disrupción del condicionamiento de EV2 tras este tipo de lesiones, entonces deberíamos hallar también una reducción en el número de cruzamiento entre-ensayos, un aumento de la latencia de escape y la aparición de ensayos sin respuesta no sólo tras la lesión pre-entrenamiento, sino también tras la lesión post-entrenamiento del PPTg.

Por las razones aquí expuestas, decidimos realizar un segundo experimento cuyo principal objetivo era determinar si la lesión del PPTg, practicada inmediatamente después del entrenamiento, tiene efectos deteriorantes sobre la retención de una tarea de EV2 adquirida con anterioridad a la lesión. Un segundo objetivo de este trabajo era estudiar si la lesión post-entrenamiento del PPTg induce cambios en la actividad locomotora durante la prueba de retención a largo plazo del condicionamiento, similares a los observados en el experimento I cuando las lesiones eran pre-entrenamiento.

En este experimento entrenamos a dos grupos de animales en una tarea de EV2 (entrenamiento masivo, con una única sesión de 30 ensayos) e, inmediatamente después practicamos lesiones electrolíticas bilaterales o los correspondientes procedimientos de control. Diez días más tarde, se realizaba una sesión de condicionamiento para examinar el nivel de RLP de la tarea, así como para determinar la existencia de posibles cambios en la actividad motora de los animales. En las dos sesiones de condicionamiento se utilizó un EC de 3 segundos de duración, ya que ésta es una condición de mayor dificultad, como vimos en el experimento I, y, por tanto, presumiblemente en dicha condición debería resultar más probable que aparecieran los posibles efectos deteriorantes causados por la lesión. El intervalo de diez días entre la sesión de adquisición y la de RLP se escogió porque estudios previos de nuestro laboratorio han puesto de manifiesto que se trata de un intervalo que permite observar tanto efectos deteriorantes como facilitadores de diversos tratamientos sobre la RLP. Finalmente, las razones por las cuales utilizamos lesiones electrolíticas son las siguientes: 1) este tipo de lesiones se habían utilizado ya en el experimento I, por los motivos indicados con anterioridad (véase apartado 3.1.), y un cambio en la técnica de lesión habría complicado la comparación entre los resultados de las lesiones pre-entrenamiento y post-entrenamiento; y 2) se ha descrito que la administración de excitotoxinas en el PPTg simultáneamente en los dos hemisferios va acompañada de una elevada mortalidad, por lo que se recomienda realizar este tipo de lesiones primero en un hemisferio y, al cabo de un tiempo, en el otro hemisferio (Florio y cols., 1999).

Además, la recuperación de los animales tras la lesión excitotóxica, y en contraposición a lo que ocurre tras la lesión electrolítica, es lenta. Ello implica que, en la práctica, no resulta de momento factible utilizar excitotoxinas para determinar los efectos de la lesión post-entrenamiento del PPTg cuando ésta ha de practicarse inmediatamente después del entrenamiento y de manera bilateral.

## 4.2. MATERIALES Y MÉTODO

Igual que en el experimento I, todos los procedimientos empleados en este trabajo han sido realizados en conformidad con la directiva de la Comunidad Económica Europea para el cuidado y uso de los animales de laboratorio (86/609/EEC, del 24 de noviembre de 1986) y bajo las Directrices que establece la Generalitat de Catalunya (DOGC 2450 7/8/1997), y han sido aprobados por el comité de Ética de nuestra Universidad (Número de procedimiento del DARP: 604).

### 4.2.1. Sujetos

Se utilizaron 11 ratas macho albinas de la cepa Wistar, procedentes de nuestro estabulario de animales experimentales. Su edad media en el día del aislamiento era de 95.18 días (SD = 4.77) y su peso medio era de 450.36 gramos (SD = 38.05). De estos sujetos iniciales 10 superaron todas las fases experimentales según los criterios establecidos, tal y como se indica más adelante (ver punto 4.3.1.).

Las condiciones de aislamiento y mantenimiento de los animales durante los periodos entre sesiones fueron iguales que las del experimento I (ver punto 3.2.1.).

### 4.2.2. Grupos experimentales

Los sujetos se distribuyeron al azar en los dos grupos experimentales siguientes: *Lesión* (n=6) y *Control* (n=5). Los sujetos del grupo Lesión fueron sometidos a lesiones electrolíticas bilaterales del PPTg post-entrenamiento, mientras que los animales del grupo control fueron sometidos a los correspondientes procedimientos de control.

### 4.2.3. Tarea de evitación activa de dos sentidos

Cinco o seis días después de que los animales fueran separados en jaulas individuales, las ratas eran entrenadas en una única sesión de EV2, de 30 ensayos. El EC utilizado era de 3 segundos, condición que, como indican los resultados del experimento I, comporta una mayor demanda para los sujetos. Al igual que en el experimento I, esta sesión de entrenamiento iba precedida por una fase de adaptación a la jaula experimental, de diez minutos de duración, en la que no se presentaban ninguno de los estímulos

relacionados con el condicionamiento y durante la cual se medía la actividad básica de las ratas (número de cruzamientos entre compartimentos).

Una vez finalizada la sesión, los sujetos eran intervenidos quirúrgicamente (ver punto 4.2.4.) para posteriormente ser retornados a sus jaulas habituales en el estabulario general hasta la sesión de retención.

Con el fin de evaluar si las lesiones del PPTg alteran la RLP del condicionamiento de EV2, diez días después de la fase de adquisición, todas las ratas fueron sometidas a otra sesión de condicionamiento, similar a la sesión de adquisición, excepto por el hecho de que el periodo de libre deambulaci3n previo era de sólo 1 minuto.

Las variables registradas en ambas sesiones fueron las mismas que en el experimento I (ver punto 3.2.4.): número de respuestas de evitaci3n y escape, latencia de dichas respuestas, número de cruzamientos entre los dos lados de la caja de EV2, así como la conducta abierta de los animales mientras realizaban la tarea.

Posteriormente a la realizaci3n de la prueba de retenci3n, los animales eran estabulados nuevamente hasta el momento de ser sacrificados.

#### **4.2.4. Cirugía**

Para realizar las operaciones se utilizaron los mismos aparatos, coordenadas, electrodos, fármacos, y procedimientos que en el experimento I (ver punto 3.2.3.).

Tras realizar la intervenci3n los animales fueron retornados al estabulario, bajo las mismas condiciones que antes de la cirugía, hasta el momento de llevarse a cabo la sesi3n de RLP del condicionamiento de EV2 (10 días después). Todos los sujetos fueron sometidos al protocolo de supervisi3n indicado en el anexo 1 del punto 9.

#### **4.2.5. Histología**

Al final del experimento se procedió al análisis histológico del tejido cerebral, mediante tinci3n con violeta de cresilo, para verificar la localizaci3n de los electrodos y la extensi3n de las lesiones en el cerebro de los sujetos. Se siguieron los mismos procedimientos que en el análisis histológico del experimento I (ver punto 3.2.5.)

#### 4.2.6. Análisis estadísticos

Para los análisis estadísticos utilizamos los análisis multivariantes de la variancia (MANOVA; SPSS 10.0) esta vez con un diseño de 2×2: (1) Tratamiento (dos categorías: Lesión y Control) × Sesión (dos medidas intra-sujeto: adquisición y recuperación a largo plazo); y también el análisis de la variancia de un factor (ANOVA; SPSS 10.0) cuando fue preciso. La significación se fijó también al nivel de  $p \leq 0.050$ .

#### 4.2.7. Resumen del diseño experimental

GRUPO	FASES EXPERIMENTALES		
Lesión	10 min. de adaptación + 1 sesión de 30 ensayos de EV2 con el EC=3 s.	10 días de descanso y supervisión postoperatoria	1 min. de adaptación + 1 sesión de 30 ensayos de EV2 con el EC=3 s. para valorar la retención a los 10 días
Control	Intervención estereotáxica con lesión electrolítica bilateral del PPTg o inserción bilateral de los electrodos sin lesión para los controles		

**Tabla 7.** Resumen del diseño del experimento II.

## **4.3. RESULTADOS**

### **4.3.1. Análisis histológicos, observaciones generales y peso corporal**

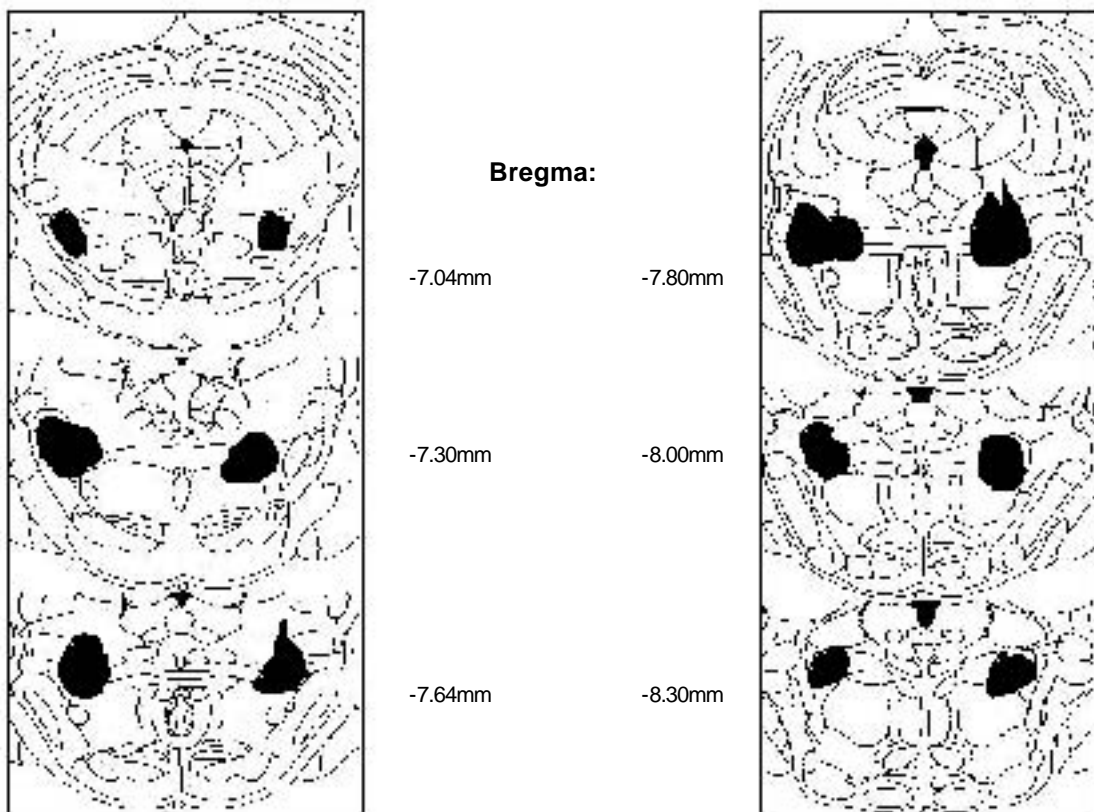
Los análisis histológicos se realizaron de la misma manera que en el experimento I.

Uno de los sujetos del grupo Lesión fue excluido de los análisis debido a que presentaba una lesión que afectaba en gran medida estructuras adyacentes al PPTg. Por consiguiente, la muestra final estaba compuesta por 10 ratas distribuidas en los siguientes dos grupos: Lesión (n=5) y Control (n=5).

A continuación (pág. siguiente), se muestra la reconstrucción de las extensión mínima (áreas rayadas) y máxima (áreas punteadas) de la lesión de los sujetos incluidos en los análisis (fig. 16). En los animales del grupo Control la traza de los electrodos se halló en las coordenadas correspondientes al PPTg.

En los animales incluidos en este experimento no se observó ningún tipo de anomalía comportamental, ya sea antes de la intervención como después de esta. No se encontraron diferencias entre grupos (MANOVA) en el peso corporal de las ratas en ninguna de las sesiones experimentales, así como tampoco hubo cambios en esta variable entre las diferentes fases experimentales.





**Fig. 16.** Reconstrucción, en las diferentes coordenadas anteroposteriores correspondientes al PPTg (según el atlas de Paxinos y Watson, 1997) de la extensión mínima (áreas rayadas) y máxima (áreas punteadas) de las lesiones.

**PESO DE LOS ANIMALES EN LAS DIFERENTES FASES EXPERIMENTALES**

GRUPO EXPERIMENTAL	SEPARACIÓN		ADQUISICIÓN		RETENCIÓN	
	Media	D.E.	Media	D.E.	Media	D.E.
Lesión	435.4	38.9	445.6	40.62	438	40.76
Control	452.4	27.88	460	22.76	460.8	17.08
TOTAL	443.9	33.14	452.8	31.95	449.4	31.82

**Tabla 8.** Medias y desviaciones estándar del peso corporal de las ratas en cada una de las fases del experimento.

### EVOLUCIÓN DEL PESO A LO LARGO DEL EXPERIMENTO 2

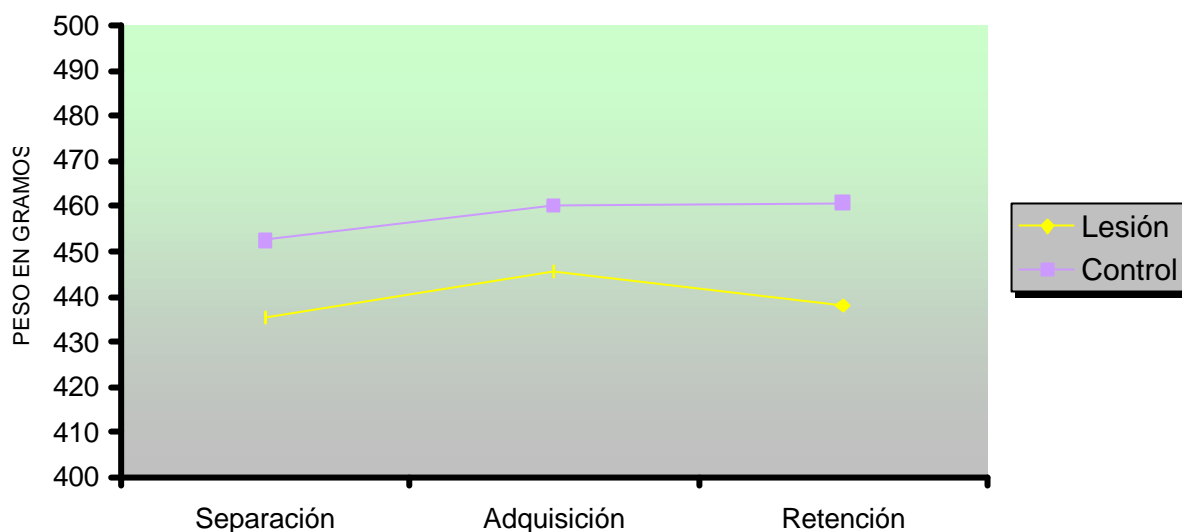


Fig. 17. Evolución del peso de los diferentes grupos a lo largo de todo el procedimiento experimental.

#### 4.3.2. Adquisición y retención a largo plazo de la evitación activa de dos sentidos: número de respuestas de evitación

La tabla 9 presenta las medias y las desviaciones estándar del número de respuestas de evitación para cada grupo experimental.

##### RESPUESTAS DE EVITACIÓN

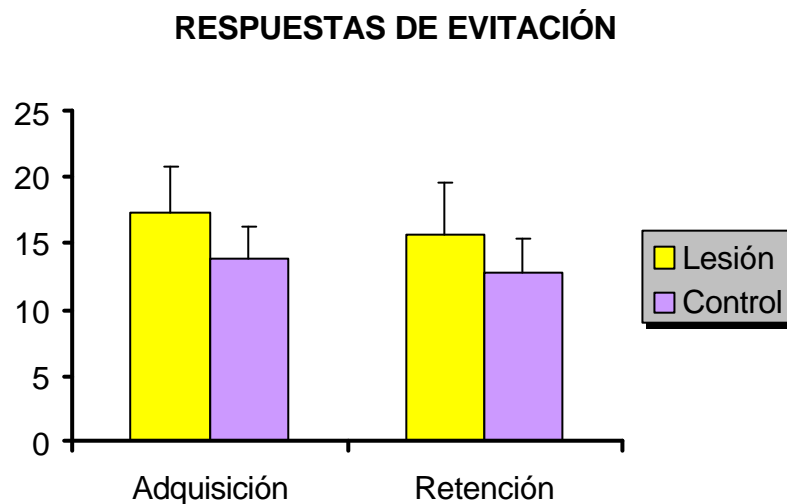
GRUPO EXPERIMENTAL	ADQUISICIÓN		RETENCIÓN	
	Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar
Lesión	17.4	7.47	15.6	8.9
Control	13.8	5.40	12.8	5.67
TOTAL	15.6	6.43	14.2	7.19

Tabla 9. Medias y desviaciones estándar de las respuestas de evitación para los dos grupos en la sesión de adquisición y en la de retención.

Los análisis estadísticos (MANOVA) revelaron que no había diferencias entre los dos grupos en cuanto el número de evitaciones [Grupo:  $F(1,8) = 0.83$ ;  $p = 0.390$ ], no

siendo significativa tampoco la interacción entre grupo y sesión [Grupo  $\times$  Sesión:  $F(1,8) = 0.02$ ;  $p = 0.886$ ]. Tampoco se hallaron diferencias significativas entre las dos sesiones de condicionamiento [Sesión:  $F(1,8) = 0.27$ ;  $p = 0.617$ ]. Por lo tanto, la lesión post-entrenamiento del PPTg no alteró la sesión de recuperación del condicionamiento. A diferencia de lo que ocurre normalmente, y de lo que se observó en el grupo control del experimento I, la ejecución de los animales tanto lesionados como controles no mostró ninguna mejoría en la sesión de RLP, sino un leve deterioro, aunque no estadísticamente significativo. Probablemente esta falta de mejoría sea atribuible a la anestesia inducida, justo después de la sesión de adquisición, para realizar el procedimiento estereotáxico.

En la fig. 18 se representa el número medio de respuestas de evitación realizadas por cada uno de los grupos experimentales en las sesiones de adquisición y retención.

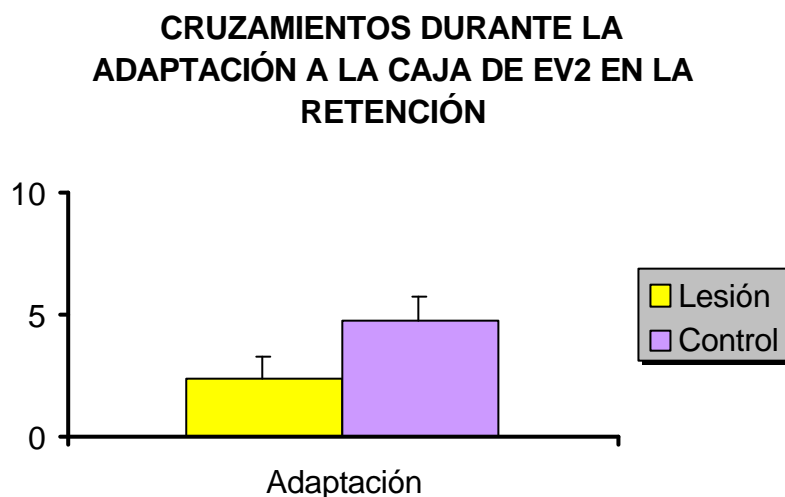


**Fig. 18.** Número medio de respuestas de evitación (+SEM) para los dos grupos experimentales durante la adquisición y la retención. No se observaron diferencias significativas entre los dos grupos en ninguna de las sesiones ni tampoco entre sesiones.

Estos resultados ponen en evidencia que la lesión del PPTg realizada inmediatamente después de una sesión masiva de adquisición de EV2 con un EC de 3 segundos no afecta a la retención de esta misma tarea a largo plazo (al cabo de diez días).

### 4.3.3. Número de cruzamientos durante la adaptación y el entrenamiento en la tarea de condicionamiento

Por otro lado, los análisis de la variancia de un factor (ANOVA) pusieron de manifiesto que los grupos lesión y control no difirieron en cuanto al número de cruzamientos entre los dos lados de la caja de evitación durante los 10 minutos de adaptación a dicho aparato [ $F(1,9) = 1.11$ ;  $p = 0.321$ ] y tampoco lo hicieron en el minuto de adaptación de la sesión de retención [ $F(1,8) = 3.58$ ;  $p = 0.100$ ]. En un sujeto control no se registraron los cruzamientos durante esta segunda sesión de adaptación, por lo que dicho análisis se realizó con cinco sujetos del grupo lesión y cuatro del grupo control.



**Fig. 19.** Número medio de cruzamientos entre compartimentos durante el minuto de adaptación a la jaula experimental en la sesión de retención.

Como se puede ver en la fig. 20 y en la tabla 10 (pág. siguiente), el número de cruzamientos entre-ensayos era similar en los dos grupos experimentales (MANOVA) [Grupo:  $F(1,8) = 0.30$ ;  $p = 0.598$ ], tanto en la sesión de adquisición como en la sesión de RLP, ya que la interacción Grupo por Sesión no era significativa [Grupo  $\times$  Sesión:  $F(1,8) = 0.14$ ;  $p = 0.716$ ]. Tampoco hubo diferencias entre ambas sesiones en ninguno de los dos grupos [Sesión:  $F(1,8) = 0.6$ ;  $p = 0.461$ ].

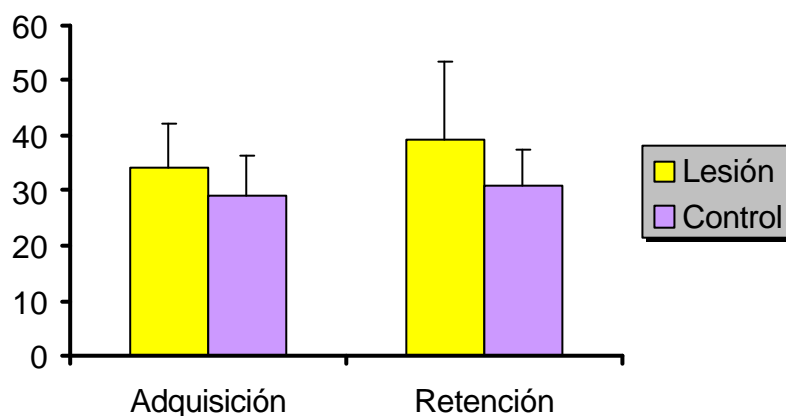
En resumen, a diferencia de lo hallado en el experimento I, la lesión no afectó al número de cruzamientos entre-ensayos, es decir, no produjo alteraciones motoras relacionadas con el entrenamiento.

**CRUZAMIENTOS ENTRE-ENSAYOS**

GRUPO EXPERIMENTAL	ADQUISICIÓN		RETENCIÓN	
	Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar
Lesión	34.2	17.62	39.4	31.69
Control	29	16.29	30.8	14.19
TOTAL	31.6	16.23	35.1	23.58

**Tabla 10.** Medias y desviaciones estándar del número de cruzamientos entre-ensayos para cada grupo en la sesión de adquisición y en la de retención.

**CRUZAMIENTOS ENTRE-ENSAYOS**



**Fig. 20.** Número medio de cruzamientos entre-ensayos (+SEM) durante las sesiones de adquisición y de retención para el grupo lesión y el grupo control. No hay diferencias significativas entre los dos grupos experimentales en ninguna de las sesiones y el número de carreras fue similar en la tarea de adquisición y la de retención para los dos grupos experimentales.

**4.3.4. Latencias de las respuestas de evitación y de escape**

Las tablas 11 y 12 muestran la media y desviación estándar de la latencia de evitación (tiempo transcurrido entre el inicio del EC y la respuesta de evitación) y la latencia de escape (tiempo transcurrido entre el inicio del EI y la conducta de escape) en las sesiones de adquisición y RLP en cada uno de los dos grupos experimentales.

**LATENCIAS DE EVITACIÓN**

GRUPO EXPERIMENTAL	ADQUISICIÓN		RETENCIÓN	
	Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar
Lesión	1.56	0.18	1.93	0.52
Control	1.83	0.085	1.75	0.19
TOTAL	1.7	0.195	1.84	0.38

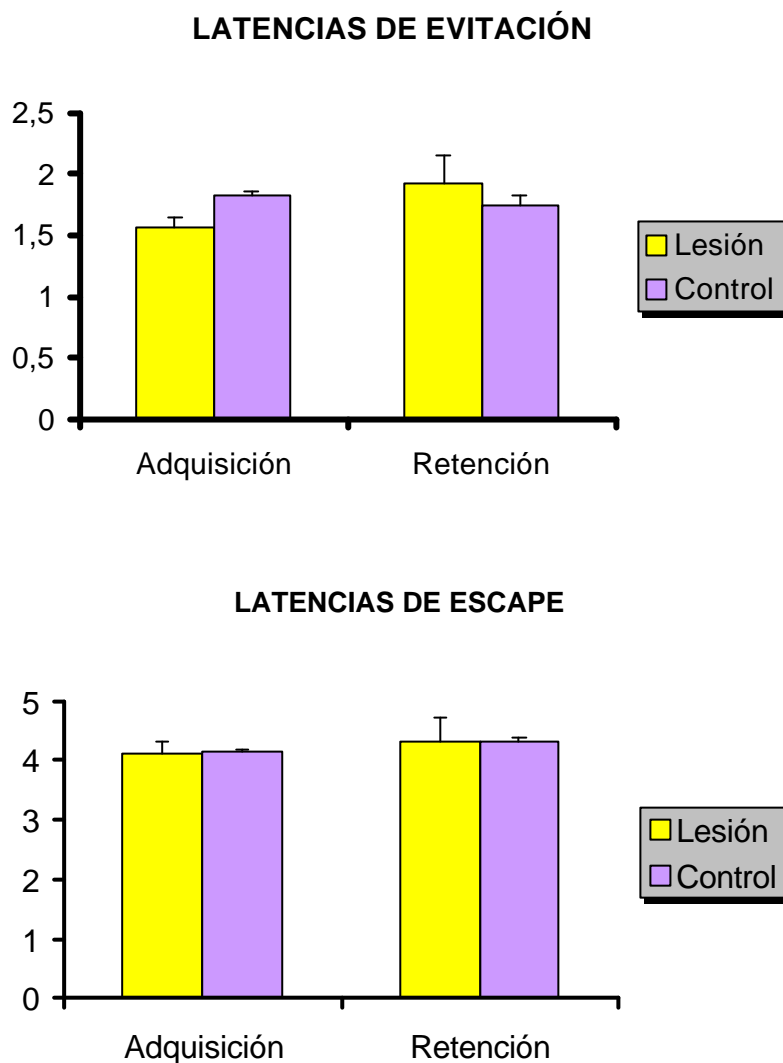
**Tabla 11.** Medias y desviaciones estándar de las latencias de evitación para cada grupo en la sesión de adquisición y en la de retención.

**LATENCIAS DE ESCAPE**

GRUPO EXPERIMENTAL	ADQUISICIÓN		RETENCIÓN	
	Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar
Lesión	4.11	0.46	4.32	0.92
Control	4.13	0.15	4.3	0.2
TOTAL	4.12	0.32	4.31	0.63

**Tabla 12.** Medias y desviaciones estándar de las latencias de escape para cada grupo en la sesión de adquisición y en la de retención.

Los análisis de la variancia (MANOVA) señalaron que las lesiones no alteraron las latencias de la respuesta de evitación [Grupo:  $F(1,8) = 0.10$ ;  $p = 0.758$ ] ni las de escape [Grupo:  $F(1,8) = 0.00$ ;  $p = 0.993$ ]. Tampoco había diferencias entre sesiones ni interacción entre el grupo y la sesión en ninguna de las dos variables: latencia de evitación [Sesión:  $F(1,8) = 1.8$ ;  $p = 0.216$ ] [Grupo  $\times$  Sesión:  $F(1,8) = 4.18$ ;  $p = 0.075$ ] y latencia de escape [Sesión:  $F(1,8) = 1.56$ ;  $p = 0.247$ ] [Grupo  $\times$  Sesión:  $F(1,8) = 0.01$ ;  $p = 0.907$ ].



**Fig. 21.** Medias (+SEM) de las latencias de las respuestas de evitación y de escape. No se encontraron diferencias significativas en estas dos variables entre los animales lesionados y sus controles.

Por lo tanto, la lesión post-entrenamiento no alteró la velocidad de respuesta de los animales en el condicionamiento de EV2.

#### 4.3.5. Ensayos sin respuesta

A diferencia de lo ocurrido en el experimento I, en que una proporción sustancial de sujetos con lesión del PPTg dejaban de emitir respuestas de evitación y de escape en algunos ensayos, este tipo de comportamiento no se observó en ninguno de los sujetos de este experimento.

## 4.4. DISCUSIÓN

Los resultados hallados en el experimento II permiten concluir que la lesión electrolítica bilateral del PPTg, inmediatamente posterior al entrenamiento, no influye en la RLP (al cabo de 10 días) de la tarea de EV2 en ratas entrenadas previamente. Estos hallazgos están en consonancia con los trabajos previos en los que se había observado que las lesiones excitotóxicas del PPTg practicadas con demora respecto al entrenamiento tampoco alteraban la retención del mismo tipo de condicionamiento (Fujimoto y cols., 1992). En definitiva, y a diferencia de lo que esperábamos, estos resultados permiten concluir que la integridad del PPTg durante el periodo inmediatamente posterior al entrenamiento, no es esencial para que tenga lugar el proceso de consolidación de la memoria para la tarea de EV2. Sin embargo, ello no implica necesariamente que el PPTg no intervenga en el proceso de consolidación; podría ser, por ejemplo, que la actividad del PPTg pudiera modular positivamente la consolidación de determinados tipos de aprendizajes, pero que esa consolidación pudiera tener lugar (aunque a un nivel menos óptimo) sin la participación de dicho núcleo. Es decir, en contra de lo que ocurre con la adquisición de la tarea de EV2, proceso en el cual el PPTg parece ejercer una influencia esencial, la retención de esta misma tarea puede tener lugar sin la intervención de esta estructura. En cambio, la actividad del PPTg podría contribuir a facilitar la consolidación de la EV2 en determinadas situaciones en las que este proceso pudiera ser deficitario, por ejemplo a consecuencia de determinadas lesiones cerebrales. En este sentido, sería interesante estudiar la influencia de la estimulación eléctrica o química del PPTg sobre la consolidación de la memoria para la tarea de EV2 en animales que presentan alteraciones de memoria causadas por daño cerebral.

Los resultados de este experimento permiten descartar nuevamente que la afectación de las fibras de paso que cruzan el PPTg influya de manera relevante en los efectos de la lesión de dicho núcleo sobre este tipo de tarea. Por otro lado, el hecho de que no se hayan encontrado alteraciones motoras, ni se haya afectado la RLP del condicionamiento al cabo de diez días refuerza las conclusiones sugeridas en la discusión del experimento I de que: 1) el grave deterioro de la adquisición del condicionamiento de EV2 hallado tras la lesión pre-entrenamiento del PPTg no es atribuible a cambios motores o emocionales; y 2) las alteraciones motoras (disminución del número de cruzamientos entre-ensayos, aumento de la latencia de escape y existencia de ensayos sin respuesta) observadas tras el mismo tipo



de lesión parecen ser secundarias a la incapacidad de los animales para ejecutar correctamente la tarea, y no parecen ser atribuibles a déficits en la motricidad espontánea ni a la alteración de mecanismos nociceptivos.

Los efectos de la lesión del PPTg sobre el condicionamiento de EV2 son similares a los hallados tras la lesión de la amígdala. En ambos casos, está alterada la adquisición de dicho aprendizaje, pero no su retención. En cambio, la lesión del estriado dorsal y estructuras relacionadas (como la SN-pc) deteriora tanto la adquisición como la retención de esta tarea. Ello sugiere que, entre los diversos mecanismos apuntados con anterioridad como responsables del deterioro del condicionamiento de EV2 tras la lesión pre-entrenamiento del PPTg (véase apartado 3.4.), destacaría la alteración de las conexiones entre el estriado dorsal y el complejo amigdalóide causada por la lesión del PPTg.

En definitiva, los resultados del experimento II permiten concluir que: 1) la integridad del PPTg no parece necesaria para la consolidación del aprendizaje de EV2, aunque no puede descartarse que este núcleo ejerza un efecto modulador sobre la memoria; 2) los efectos de la lesión electrolítica del PPTg sobre la conducta de EV2 son similares a los obtenidos con lesiones excitotóxicas (y, por tanto, la afectación de las vías de paso no parece ser un factor clave); y 3) los efectos sobre la actividad locomotora y las respuestas de escape hallados en los animales lesionados en el experimento I parecen ser consecuencia de las dificultades de aprendizaje de los mismos, y no ser atribuibles a una influencia de la lesión sobre la ansiedad y/o la motricidad espontánea.

## **5. EXPERIMENTO III**

---

## 5.1. OBJETIVOS

Los resultados de los dos experimentos anteriores indican que el PPTg resulta una estructura clave para la adquisición del condicionamiento de EV2, aunque no para su retención una vez adquirido. La alteración de las influencias que el PPTg ejerce a través del estriado dorsal y estructuras relacionadas, o a través de los núcleos talámicos inespecíficos, incluyendo la modulación de la actividad cortical en momentos críticos del aprendizaje o la consolidación de la memoria, podría explicar los efectos observados tras la lesión de este núcleo en tareas aversivamente motivadas, como la EV2.

Si la función del PPTg es, al menos en parte, de carácter genérico y modulador, habríamos de esperar que sus lesiones afectasen también en el mismo sentido a otros tipos diferentes de aprendizajes, como, por ejemplo, los de naturaleza espacial apetitiva, que también han sido estudiados en relación con este núcleo. Sin embargo, el panorama respecto a los efectos de la lesión del PPTg sobre este último tipo de aprendizaje es bastante confuso. Así, tras la lesión bilateral del PPTg no se ha observado impedimento en la adquisición de una tarea espacial como la navegación en el laberinto de Morris con la plataforma visible (Dellu y cols., 1991), que se considera dependiente del estriado dorsal (Packard y McGaugh, 1992). Tampoco se ha hallado deterioro de una tarea de no-alternancia demorada en un laberinto de tres brazos basado en una combinación de claves intra-laberinto visuales, táctiles y olfatorias, aunque las ratas lesionadas sí mostraban un deterioro cuando se aumentaba la demora entre las fases de muestra y de test (Kessler y cols., 1986). Asimismo, la lesión tampoco afectó a la ejecución de una tarea de memoria de referencia en un laberinto en cruz en la que los animales tenían que buscar comida siempre en el mismo brazo del laberinto, pero el brazo de partida del animal se modificaba en cada ensayo, es decir, una tarea que requería guiarse por la configuración de estímulos visuales extra-laberinto y que, por tanto, se considera hipocampo-dependiente (Dellu y cols., 1991).

En contraste, se han descrito efectos disruptores, tras la lesión del PPTg, sobre otras tareas espaciales hipocampo-dependientes, como: 1) alteraciones en la memoria de trabajo en tareas de “búsqueda aleatoria de comida” (“random foraging”, según la terminología utilizada por Floresco y cols., 1999), en laberintos radiales de ocho brazos con claves visuales extra-laberinto (Dellu y cols., 1991; Keating y Winn, 2002), así como en laberintos de tres brazos con claves intra-laberinto (Kessler y cols., 1986); 2) déficits en la

memoria de trabajo y la memoria de referencia en una tarea de “win-shift”, tarea que se lleva a cabo en laberintos radiales de ocho brazos y que consta de dos fases. En la primera, cuatro de los brazos están abiertos y reforzados y los otros cuatro se hallan cerrados. El animal ha de entrar sucesivamente en los cuatro brazos abiertos para obtener el reforzador, y no debe entrar más de una vez en el mismo brazo (memoria de trabajo). En la segunda fase, todos los brazos están abiertos y sólo hay reforzador en los cuatro brazos que se hallaban cerrados en la primera fase. El animal ha de aprender a buscar comida en los brazos previamente cerrados (regla de alternancia, que se almacenaría en la memoria de referencia), y a entrar de manera eficiente en los cuatro brazos reforzados (memoria de trabajo). La lesión del PPTg no alteraba la ejecución de los animales en la primera fase (sólo cuatro brazos abiertos), pero deterioraba tanto la memoria de referencia como la memoria de trabajo en la segunda fase (ocho brazos abiertos). Y 3) deterioro de la tarea de navegación en el laberinto de Morris con la plataforma oculta (Dellu y cols., 1991).

Al analizar el conjunto de estos datos contradictorios, notamos que, salvo en la navegación en el laberinto de Morris con la plataforma oculta, en todas las tareas espaciales en las que se ha hallado deterioro tras la lesión del PPTg está siempre implicada la memoria de trabajo y/o la adquisición de una regla de alternancia (búsqueda de comida en los lugares no reforzados previamente). Sabemos asimismo, que tanto la memoria de trabajo (Floresco y cols., 1997; Goldman-Rakic, 1990), como las tareas que involucran una regla de alternancia suelen verse afectadas tanto por la lesión de la formación hipocampal como de algunas áreas de la corteza prefrontal, aunque las tareas de alternancia parecen implicar también al núcleo accumbens y sus conexiones con la formación hipocampal (Floresco y cols., 1997; Porter y cols., 2000). Además, tareas que involucran memoria de trabajo en laberintos radiales, como el “random foraging” y el “win-shift” (Floresco y cols., 1999), son también sensibles tanto a la lesión del PPTg como a la del estriado ventral. Por su parte, la navegación en el laberinto de Morris se ve deteriorada por la lesión no sólo de la formación hipocampal (Morris y cols., 1982), sino también de la corteza prefrontal (De Bruin y cols., 1994), aunque probablemente el efecto deteriorante de la lesión de estas dos estructuras esté mediado por mecanismos diferentes.

En conjunto, estos datos sugieren que uno de los factores que parecen tener en común las tareas espaciales afectadas por la lesión del PPTg es su relación con el estriado ventral (accumbens, principalmente) y con la corteza prefrontal. En este contexto, es

importante recordar que el PPTg participa en los bucles fronto-estriatales dependientes tanto del estriado dorsal como del ventral, ya que envía eferencias indirectas al caudado-putamen, a través de la sustancia negra, y recibe aferencias de aquéllos, también indirectas (a través de la SN-pr y del GP). Por lo que respecta al estriado ventral, el PPTg recibe conexiones directas tanto del núcleo accumbens como del pálido ventral. Aunque originalmente los circuitos córtico-estriatales se consideraban bucles cerrados y segregados, la visión actual es que estos bucles serían abiertos e interdigitados (Joel y Weiner, 1994). Es decir, a pesar de su indudable segregación topográfica, la información procesada por los diferentes bucles se solapa parcialmente. Además, Winn y colaboradores (Inglis y Winn, 1995; Winn y cols., 1997; Winn, 1998) consideran que, aunque los bucles córtico-estriatales son esencialmente, y por definición, cerrados, una parte del flujo de información procesada en ellos puede fluir hacia los mecanismos de control motor no sólo a través de la corteza motora, sino también a través del PPTg. Según estos mismos autores, una de las funciones críticas del PPTg sería la de constituir una interface entre la información sobre aspectos motivacionales (procedente del núcleo accumbens) y el output motor organizado por el estriado dorsal. Sería de esperar, por tanto, que la lesión del PPTg afectara especialmente a todos aquellos aprendizajes en los que el flujo córtico-estriatal jugara un papel relevante.

Sin embargo, Deltu y cols. (1991) han propuesto una explicación diferente, aunque no necesariamente excluyente, del efecto diferencial de la lesión del PPTg sobre diversas tareas espaciales. Según estos autores, lo que determinaría la aparición o no de déficit tras la lesión sería el nivel de dificultad de la tarea, incluido el número de opciones de respuesta disponibles. Ello explicaría que no se hallara déficit cuando los animales tenían una (laberinto de Morris con la plataforma visible; Deltu y cols., 1991), tres (laberinto de tres brazos; Kessler y cols., 1986) o cuatro opciones de respuesta (laberinto en cruz; Deltu y cols., 1991), pero sí cuando el número de opciones se ampliaba a ocho (laberintos radiales; Deltu y cols., 1991; Keating y Winn, 2002) o resultaba virtualmente infinita (laberinto de Morris con la plataforma oculta; Deltu y cols., 1991). Esta relación entre la dificultad de la tarea y el deterioro en el aprendizaje estaría mediada por la alteración de la activación o “arousal” cortical y de procesos atencionales causados por la lesión.

Esta última explicación concuerda parcialmente con los datos hallados en este trabajo en relación a la EV2. Así, la lesión induce un mayor deterioro de la conducta de los

animales en esta tarea en la condición de mayor dificultad. Sin embargo, también se observó un deterioro, aunque menor, del condicionamiento de EV2 en la condición de baja dificultad. Por tanto, creemos que, aunque la dificultad de la tarea es un factor que influye en los efectos de la lesión del PPTg sobre el aprendizaje, hay otros factores a considerar. En el caso de los aprendizajes espaciales, y como hemos indicado más arriba, otro factor que parece ser de gran relevancia para determinar si la lesión del PPTg inducirá disrupción, es su dependencia de los sistemas fronto-estriatales. En definitiva, nuestra conclusión es que la lesión del PPTg podría afectar sobre todo a los aprendizajes espaciales en los que interviene la corteza prefrontal y/o el estriado ventral, siendo menos relevante el nivel de dificultad de la tarea. El PPTg, pues, podría ser una estructura capaz de modular el aprendizaje y la memoria a través principalmente de sus interacciones fronto-estriatales.

Para contrastar esta hipótesis y avanzar en nuestra exploración de las funciones del PPTg, hemos diseñado un tercer experimento cuyo principal objetivo era estudiar el efecto de la lesión bilateral de este núcleo sobre tareas espaciales relativamente simples, en el sentido de que presentan únicamente dos opciones de respuesta disponibles, y que se ven afectadas por la lesión de diversas regiones de la corteza prefrontal medial (Brito y cols., 1982; Dunnett y cols., 1987; Brito y Brito, 1990; Granon y cols., 1994; Shaw y Aggleton, 1993; Sánchez-Santed y cols., 1997; Steckler y cols., 1998b), y del estriado ventral (accumbens, principalmente; Gal y cols., 1997). Las dos tareas seleccionadas son la no-alternancia demorada (emparejamiento demorado con la posición o “delayed matching to position” –DMTP-) y la alternancia demorada (no-emparejamiento demorado con la posición o “delayed non-matching to position” –DNMTP-), en un laberinto en T. En ambas, los animales sólo tienen dos opciones de respuesta, por lo que el aprendizaje no debería verse afectado por la lesión del PPTg si el número de opciones de respuesta fuera un factor determinante. Utilizamos además un tipo de entrenamiento en que la elección tenía que hacerse siempre entre los dos mismos brazos (“elección recurrente”), ya que esta condición parece especialmente sensible a la lesión de la corteza prefrontal (Porter y Mair, 1997).

## 5.2. MATERIALES Y MÉTODO

El procedimiento experimental se ha realizado siguiendo las directrices de la Comunidad Europea (86/609/EEC) y de la Generalitat de Catalunya (DOGC 2073 10/7/1995) en relación con el uso de animales para experimentación, y ha sido aprobado por la Comisión de Ética en experimentación Animal y Humana (CEEAH) de nuestra Universidad, con el número de orden 1585 del Departament d'Agricultura, Ramaderia i Pesca (DARP) de la Generalitat de Catalunya.

### 5.2.1. Sujetos

Se utilizaron 33 ratas albinas macho de la cepa Wistar, nacidas y criadas en nuestro estabulario, con una edad media al inicio del experimento de 98.45 días (SD = 9.06) y un peso medio de 454.54 gramos (SD = 34.96). No obstante, únicamente 21 consiguieron pasar por todas las fases experimentales y fueron incluidos en los análisis estadísticos (ver punto 5.3.1.).

Los animales eran aislados como mínimo un día antes de las primeras manipulaciones experimentales y a continuación se estabulaban en jaulas individuales de plástico del mismo tipo que en los anteriores experimentos. Las condiciones ambientales mientras los animales estaban en el estabulario fueron también idénticas a las de los otros trabajos presentados en esta tesis. Por otro lado, los sujetos tuvieron acceso “ad libitum” a la comida hasta el inicio de la fase de restricción alimentaria, y al agua durante todo el experimento. Además, diariamente se controlaban el peso, el estado general y la higiene de los animales.

### 5.2.2. Procedimiento

#### 5.2.2.1. Grupos experimentales

Tras su separación, los sujetos fueron distribuidos al azar en dos grupos experimentales: *Lesión* (n=18) y *Control* (n=15). Los animales del grupo lesión fueron intervenidos quirúrgicamente para la inducción de la lesión química con ácido iboténico en el PPTg. Los sujetos del grupo control se sometieron al mismo tipo de operación, pero sin que se les provocara ninguna lesión.

### 5.2.2.2. Manipulaciones previas

Para que los animales estuvieran acostumbrados a ser cogidos, transportados, y pesados por el experimentador, y para reducir las reacciones emocionales de los sujetos en el momento de ser manipulados para la administración de la anestesia por inyección intraperitoneal, se llevaban a cabo cuatro sesiones de manipulación de los animales (“handling”), en días consecutivos. Estas sesiones consistían en pesar al animal, y posteriormente cogerlo con un guante por el lomo y ponerlo en una posición vertical durante unos 10 segundos tres veces en un periodo de dos minutos.

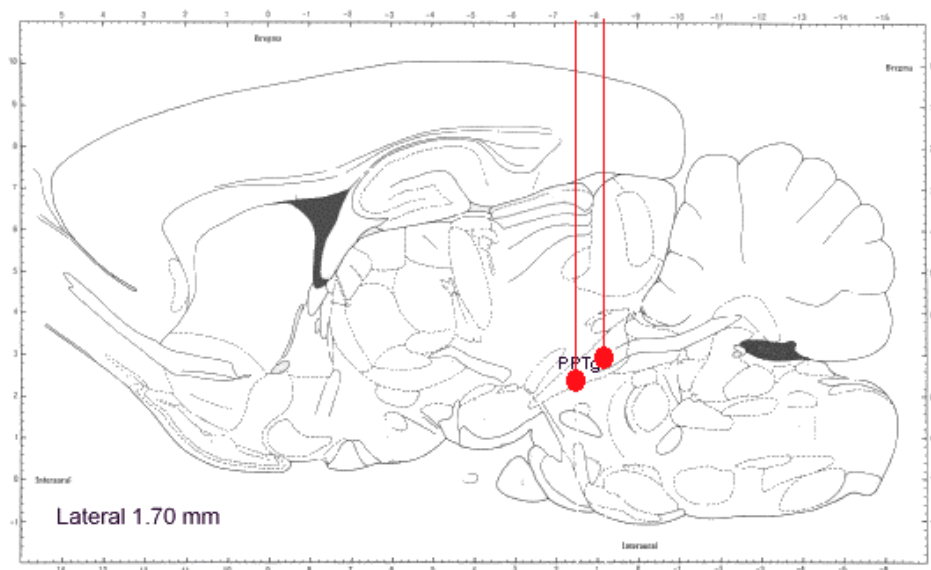
### 5.2.2.3. Cirugía estereotáxica y postoperatorio

Al cabo de una semana de la separación, aproximadamente, y después de las sesiones de manipulación de los animales, se efectuaron las intervenciones quirúrgicas.

Se ha descrito que las lesiones del PPTg con ácido iboténico practicadas el mismo día dan lugar a una elevada mortalidad (Inglis y cols., 1994a; Florio y cols., 1999). Por este motivo, los animales eran sometidos a dos intervenciones quirúrgicas, separadas entre sí por un mínimo de 7 días. En cada una de las intervenciones quirúrgicas se procedía a infundir ácido iboténico (grupo Lesión) o vehículo (solución salina en tampón fosfato – PBS-, grupo Control) en el PPTg, en uno de los dos hemisferios. El primer hemisferio lesionado era el derecho en la mitad de los sujetos y el izquierdo en la otra mitad.

Basándonos en los procedimientos utilizados en otros laboratorios (Inglis y cols., 1994a), y con el objetivo de producir una lesión que abarcara al máximo la extensión anteroposterior del PPTg, pero con una afectación mínima de las estructuras adyacentes, las lesiones excitotóxicas de cada hemisferio se practicaban inyectando ácido iboténico en dos coordenadas distintas del núcleo, una situada en la parte anterior del mismo y otra en la región caudal. La barra incisoria se situó a 3.3 mm debajo de la línea interaural y las coordenadas estereotáxicas que se emplearon en este caso, según el atlas estereotáxico de Paxinos y Watson (1997), fueron; a) para las inyecciones anteriores o rostrales: AP:+1.5 desde la interaural, L:+/-1.7 tomando como referencia la sutura sagital, y P:-8.0 mm desde el cráneo; y b) para las inyecciones caudales o posteriores: AP:+0.8 desde la línea interaural, L:+/-1.7 a partir de la línea media, y P:-7.2 mm desde la superficie craneal (ver figura 22).





**Fig. 22.** *Coordenadas estereotáxicas correspondientes al PPTg, según el atlas de Paxinos y Watson (1997), y representación de la trayectoria de paso y la localización del electrodo.*

La cirugía estereotáxica se realizó bajo condiciones de anestesia general con tiopental sódico (Pentothal Sodico®, Abbott; 50 mg/Kgr). También se administró sulfato de gentamicina (Gevramycin®, Schering-Plough; dosis única de 0.1 ml i.m.), un antibiótico de amplio espectro, para evitar posibles infecciones postoperatorias. Una vez finalizada la intervención, se aplicaba un antiséptico tópico (Topionic®, Rius) sobre la sutura. Por otro lado, se utilizó el mismo aparato estereotáxico que en los experimentos anteriores (ver puntos 3.2.3 y 4.2.4.). Durante todo el proceso quirúrgico, la temperatura corporal de los animales se mantuvo constante mediante una almohadilla eléctrica termostataada.

Para producir la lesión, se introducía una aguja de infusión en las coordenadas anteriormente citadas. Esta aguja estaba unida a un tubito de polietileno (PE-20) el cual, a su vez, estaba conectado o bien a una microjeringa Hamilton de un microlitro, que era activada manualmente, o bien a una microjeringa Hamilton de 10 microlitros conectada a una bomba de infusión (Sp 100i; WPI). En cada una de las coordenadas se administraban 0.2 microlitros de ácido iboténico durante 200 segundos. Posteriormente a cada inyección se mantenía la aguja de infusión “in situ” unos 300 segundos para facilitar la difusión de la sustancia. Los animales del grupo Control se sometieron a los mismos procedimientos quirúrgicos, pero en lugar de infusionárseles ácido iboténico se les inyectaba una solución de PBS.

Una vez finalizaba cada una de las dos intervenciones a las que se sometía a los animales, estos eran devueltos a sus jaulas, colocados en el estabulario, y diariamente durante una semana, se controlaba su estado de salud según el protocolo de supervisión indicado en el anexo 2 (punto 9).

#### **5.2.2.4. Laberinto elevado en cruz**

Catorce días después de la segunda intervención, los sujetos eran sometidos a dos sesiones de laberinto elevado en cruz (“elevated plus-maze”), con el fin de obtener medidas de reactividad emocional y de motricidad. Las dos sesiones, realizadas en días consecutivos, tenían una duración de cinco minutos. Estas pruebas no serán descritas en el presente estudio y se incluyen en el trabajo de Homs-Ormo (2000).

#### **5.2.2.5. Restricción de comida**

Después de la segunda sesión de laberinto elevado en cruz, se iniciaba la restricción de comida realizada con el objetivo de tener a las ratas motivadas para las pruebas siguientes. Los sujetos se dejaban durante dos días sin alimento, exceptuando el que pudieran consumir en las sesiones de habituación al reforzador (ver punto siguiente 5.2.2.6.). A continuación, para mantenerlos al 85% de su peso “ad libitum”, se iniciaba el programa de control de la cantidad de comida a consumir diariamente según la fórmula:

$$\text{Grs.} = 80\% (85\% \text{ del peso "ad libitum"} - \text{peso real})$$

Los sujetos recibían un mínimo de 5 grs. diarios de pienso especial para ratas. Se pesaban cada día después de pasar las pruebas de habituación o aprendizaje a todo el grupo de ratas testadas, y seguidamente se les ponía la cantidad correspondiente de comida dentro de la jaula, para evitar que se cayera y no ingirieran toda la dosis. En todas las fases del experimento, no obstante, se mantuvo el acceso libre de los animales al agua.

### **5.2.2.6. Habitación al reforzador**

Durante la fase de aprendizaje se usaron como reforzadores bolitas de arroz inflado cubiertas con chocolate. Para habituar a los animales a este alimento, y reducir las reacciones de neofobia, se llevaban a cabo varias sesiones de habitación, dos como mínimo y cuatro como máximo, hasta que el animal se habituaba a este tipo de comida, en las cuales los sujetos tenían acceso libre a este reforzador durante dos horas diarias, entre las 11 y las 13 horas de la mañana.

Estas sesiones consistían en colocar a los animales en una jaula de estabulación sin viruta con diez bolitas esparcidas por el suelo; el primer día con la luz de la sala donde se realizaba la habitación apagada y el segundo día encendida. Las ratas permanecían en la jaula hasta haber consumido todos los reforzadores, pero si alguna no los comía después de una hora, se ponían las bolitas en un recipiente de plástico dentro de la jaula de la rata y se la estabulaba hasta el día siguiente; si los había ingerido, entonces se procedía a hacer la sesión con las luces encendidas igual que las otras ratas, y, si no, se comprobaba si era capaz de comer alimento de laboratorio. Si una rata no consumía los reforzadores pero sí el pienso normal, se insistía otra vez con la sesión de habitación; si no era así, se eliminaba del experimento.

Mientras se realizaba la habitación al reforzador, en cada una de estas sesiones, se aprovechó para registrar el tiempo que tardaban los animales en consumir la primera bolita y el total de reforzadores, el número de defecaciones y la presencia o ausencia de micción, variables todas ellas que podían ser de utilidad para valorar aspectos como la ansiedad o la preferencia por la novedad.

### **5.2.2.7. Habitación al laberinto**

Previamente al inicio de la fase de aprendizaje de las tareas de no-alternancia y alternancia en el laberinto en T, y una vez los sujetos se habían habituado al reforzador, aunque no hubieran llegado todavía al 85% de su peso “ad libitum”, los animales eran habituados al aparato, a las condiciones ambientales y a comer el reforzador en el laberinto.

El aparato consistía en un laberinto en cruz de madera pintada de negro, sobrepuesto sobre un laberinto radial de metacrilato. El laberinto en cruz se utilizó en todas las fases

experimentales en la configuración de laberinto en T, manteniéndose uno de los brazos siempre cerrado por un bloque de madera. El laberinto estaba elevado a 60 cm del suelo (ver figura 23). Cada uno de los brazos medía 72 cm de largo y 12 cm de ancho, y las paredes tenían una altura de 12 cm. El brazo de salida disponía de un compartimento de 20 cm donde se podía recluir al animal en el tiempo de espera entre carreras. Para ello tenía una puerta de metacrilato negro de 27 cm de altura, que el experimentador controlaba manualmente desde la posición de observación. En cada uno de los brazos de respuesta había una puerta de metacrilato, esta vez transparente, de 27 cm de altura situada a 3 cm del extremo proximal y controlada también por el experimentador. Estas puertas permitían forzar la permanencia en uno de los dos brazos (manteniendo la otra puerta cerrada) y evitar así el retroceso una vez el sujeto había efectuado una elección. El extremo distal de los brazos de respuesta disponía de un hoyo de 3 cm de diámetro y de 1,3 cm de profundidad en donde se colocaba el reforzador que habían de consumir los animales, impidiendo de esta manera que éstos lo visualizaran antes de llegar a él. El laberinto estaba situado en una habitación casi cuadrada (3,60m × 3,50m × 2,90m), en una posición ligeramente desviada del centro. La sala se iluminaba con una bombilla de 60W situada 2m por encima del punto central del laberinto; y fue mantenida a una temperatura de entre 22 y 23°C mientras se realizaban todas las pruebas. Para facilitar la orientación de los sujetos en el aprendizaje de las tareas se colocaron diferentes objetos por las paredes.

Entre los objetos que se encontraban en la sala se incluyeron los necesarios para la realización del experimento, como el monitor, el tablero de control de las puertas, y el mismo experimentador; los propios de la sala, como dos puertas, una papelera, un radiador, un aparato de aire acondicionado, un mueble de madera, una escalera pequeña y un soporte con un rollo de papel de un solo uso; así como una variedad de objetos como juguetes y telas de diferentes formas y tamaños que se colgaban del techo para quedar situados en las paredes a una altura del suelo de aproximadamente un metro y medio, perfectamente visibles desde el interior del laberinto.

Como hemos comentado, las puertas del laberinto eran controladas manualmente por el experimentador desde la posición de observación, que contenía el panel de mandos, y estaba situada en una esquina de la sala actuando como un estímulo más. Por otro lado, la conducta de los sujetos se observaba mediante una cámara de vídeo (Panasonic RX22),

situada 2m sobre el centro del laberinto, que estaba conectada a un monitor (Sony Triniton KX-14CP1).



**Fig. 23.** *Sujeto experimental mientras realizaba una de las sesiones de habituación al laberinto. (Area Psicobiología, U.A.B.)*

Todos los sujetos pasaban diariamente por una sesión de habituación de 10 ensayos hasta alcanzar el criterio que permitía empezar la fase de aprendizaje, que consistía en completar cada uno de los ensayos en menos de diez segundos durante dos días consecutivos.

En cada ensayo se situaba al animal en el compartimento de salida del laberinto en T, se ponía el reforzador (una bolita de arroz con chocolate) en el dispensador del final de uno de los brazos y se abría la compuerta de ese brazo. Seguidamente se levantaba la puerta de la caja de salida para que el animal se dirigiera hacia la comida; una vez el animal salía del compartimento de salida se cerraba la compuerta del mismo para evitar su retroceso, y cuando introducía las 4 patas en el brazo reforzado se bajaba la puerta de éste y se esperaba hasta que el animal consumiera el alimento. La secuencia de brazos reforzados la determinaba el experimentador pseudoaleatoriamente, de manera que las elecciones de los sujetos se distribuyeran por igual entre el brazo de respuesta derecho e izquierdo, y no

reforzando durante más de dos ensayos consecutivos el mismo lado. Después del sexto ensayo se dejaba descansar a la rata para posteriormente completar la sesión realizando los 10 ensayos.

En los casos en que el sujeto no se movía de la caja de salida al abrir la puerta, el experimentador esparcía varias bolitas de chocolate por el laberinto, haciendo un camino de reforzadores, orientando el animal hacia el brazo de respuesta. El ensayo se consideraba finalizado cuando la rata consumía el reforzador del dispensador del brazo de respuesta o después de esperar 15 minutos a que lo hiciera desde que se abría la puerta de salida. Si el animal casi no se movía y no comía ni siquiera las bolitas del camino de reforzadores después de dos ensayos consecutivos en los primeros 6 ensayos se le dejaba descansar hasta el día siguiente. Siempre que se cogía al sujeto se hacía por la cola y con un guante de plástico, si no se podía hacer así, se utilizaba un guante de piel.

Los animales eran transportados a la habitación donde estaba el laberinto de dos en dos. Cuando uno de ellos completaba seis de los diez ensayos de cada sesión de habituación, se iniciaba la sesión del otro animal. Una vez finalizaban los seis primeros ensayos los dos miembros de la pareja de ratas, éstas eran transportadas a un pasillo del laboratorio, contiguo a la sala experimental; cuando todas las ratas del grupo habían pasado por esta fase, se completaban los ensayos que faltaban para terminar la sesión siguiendo el mismo procedimiento anterior, exceptuando que si el animal no entraba en el brazo, aunque comiera alguna bolita del camino de reforzadores, se terminaba la sesión y se le dejaba descansar hasta el día siguiente. Para cada ensayo se anotaba si el sujeto llegaba o no al brazo reforzado, así como el tiempo que tardaba en hacerlo; también si consumía las bolitas de chocolate (del dispensador o del camino de reforzadores), el número de defecaciones y la presencia o ausencia de micción. Además se registraba si la rata saltaba a los otros brazos y si se tiraba o caía del laberinto.

La fase de aprendizaje propiamente dicha se iniciaba al día siguiente de que cada uno de los animales alcanzara el criterio de habituación al laberinto. Si algún sujeto no conseguía este criterio en veinte sesiones, era eliminado del experimento.

### **5.2.2.8. Adquisición de las tareas de alternancia y no-alternancia en el laberinto en T**

En esta parte del experimento, los animales tenían que aprender una tarea de emparejamiento demorado con la posición (“delayed matching to position” o DMTP). La demora entre la carrera forzada y la carrera libre era de 15 segundos; posteriormente, tenían que cambiar de estrategia y adquirir una tarea de alternancia demorada o no-emparejamiento demorado con la posición (“delayed non-matching to position” o DNMTP), utilizando igualmente una demora de 15 segundos entre las carreras forzada y libre. Si conseguían alcanzar el criterio de aprendizaje de esta segunda fase, se les entrenaba en la misma tarea pero aumentando la demora a 30 segundos.

Cada una de las tres fases de aprendizaje consistían en sesiones consecutivas, separadas por intervalos de 24 horas, de 6 ensayos cada una. Cada ensayo estaba compuesto por dos carreras, la primera de elección forzada y la segunda de elección libre, separadas por un intervalo temporal o demora. Lo único que variaba entre las diferentes pruebas era que en la primera (DMTP) el animal en la carrera libre tenía que ir al mismo brazo que en la carrera forzada; en cambio, en la segunda y la tercera (DNMTP) tenía que ir al otro brazo, el que no había sido reforzado en la carrera forzada; por otra parte, las dos últimas tareas diferían, como hemos señalado, en la demora.

El procedimiento que se seguía era el siguiente:

1. Al principio de cada ensayo se abría la puerta del brazo elegido para ser reforzado en la carrera forzada y se ponía una bolita de reforzador en el dispensador de éste. Para decidir qué brazo se reforzaba en cada ensayo se seguía un orden pseudoaleatorio prefijado que garantizaba la distribución derecha-izquierda al 50% y evitaba la elección de un mismo brazo más de dos veces consecutivas. Se llevaba la jaula con la rata delante de la caja de salida, se cogía la rata por la cola y se colocaba en este compartimento.
2. Inmediatamente después, se abría la puerta de salida, cerrándola una vez el animal había salido, para evitar el retroceso. El sujeto únicamente podía entrar en uno de los dos brazos de respuesta, y una vez lo hacía se cerraba la puerta de detrás de él y se esperaba 10 segundos como máximo a que consumiera la comida (se

consideraba que el sujeto había entrado en el brazo cuando tenía las cuatro patas dentro de éste y en contacto con el suelo).

3. A continuación la rata se colocaba de nuevo en el compartimento de salida. Se ponía una bolita de reforzador en el brazo que se quería reforzar en la carrera libre, el mismo que en la carrera forzada en la tarea de DMTP y el brazo contrario en la tarea de DNMTP, y se simulaba que también se ponía una bolita de cereales de chocolate también en el brazo no reforzado.
4. Después de la demora, de 15 o 30 segundos según la tarea, se abrían todas las compuertas. Se esperaba a que la rata saliera de esta caja para cerrar la puerta de salida y se esperaba como máximo 30 segundos a que eligiera en qué brazo de respuesta entraba. Una vez el animal efectuaba su respuesta se cerraba la puerta del brazo que hubiera escogido, o de los dos brazos si se quedaba en el medio, y se esperaba 10 segundos antes de sacarlo y situarlo en su jaula, mientras consumía el reforzador si la respuesta era correcta.
5. Se limpiaba el laberinto, y se repetía el mismo procedimiento para otra rata. Igual que en la fase de habituación al laberinto, las ratas eran transportadas de dos en dos a la sala experimental, y los ensayos se iban alternando entre los dos animales.

Si una rata no entraba en el brazo en la carrera forzada se esperaba como máximo 2 minutos, y si aún así no lo hacía se sacaba del laberinto, se realizaba el ensayo con la otra rata y después se intentaba de nuevo con el animal anterior. Si la rata continuaba sin entrar se dejaba descansar hasta el día siguiente y esa sesión no se contabilizaba.

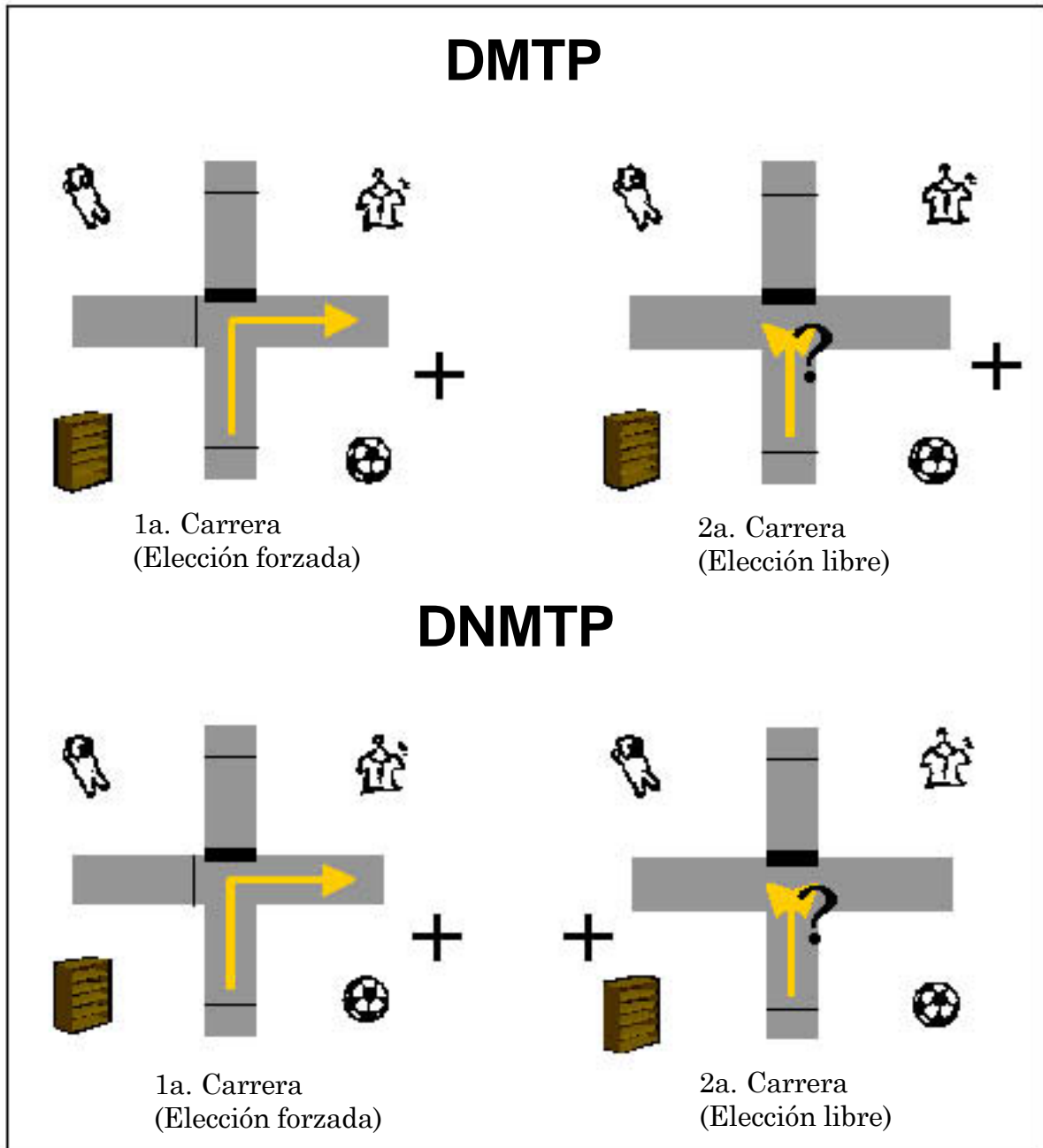
Cuando la rata no elegía el brazo antes de 30 segundos en la carrera libre, se cerraban los brazos y se registraba que se había quedado en el medio; pero si el problema era que no salía de la caja de salida después de dos ensayos consecutivos, se sacaba el sujeto del laberinto y se dejaba reposar ese día sin apuntar el segundo ensayo.

Por otro lado, si el sujeto entraba en el brazo pero no comía el reforzador cuando antes si lo hacía, se dejaba descansar hasta el próximo día.

En cada ensayo se anotaba la respuesta que emitía la rata en la carrera de libre elección (derecha, izquierda, medio o caja de salida), el tiempo invertido en completar las



dos carreras, las defecaciones, la presencia de micción, así como conductas extrañas que pudiera realizar (tirarse del laberinto, saltar de un brazo a otro, etc.).



**Fig. 24.** Representación de las tareas de DMTP y de DNMTP en el laberinto en T.

Todos los animales pasaban por las tareas de DMTP y de DNMTP con la demora de 15 segundos, y sólo los que alcanzaban el criterio de aprendizaje preestablecido en la segunda prueba pasaban a realizar la tarea de DNMTP con la demora de 30 segundos. El criterio que se estableció para considerar que un sujeto había adquirido cada una de las

diferentes tareas consistía en realizar correctamente al menos 5 de los 6 ensayos en dos sesiones consecutivas. Cuando se alcanzaba este criterio de aprendizaje para el DMTP, o bien se habían realizado las 30 sesiones máximas, se pasaba al DNMTP con la demora de 15 segundos; y si se conseguía de nuevo este criterio se realizaba esta misma tarea con la demora de 30 segundos hasta que se adquiría o se agotaban las 30 sesiones; si no era así, se daba por finalizada la fase conductual del experimento.

Una vez el animal terminaba las diferentes pruebas de aprendizaje, era estabulado con comida y agua “ad libitum” hasta el momento de su sacrificio.

### **5.2.3. Histología**

Al final del experimento, los animales se sacrificaban mediante una sobredosis de tiopental sódico (Pentothal Sodico®, Abbott; 200 mg/Kgr). La mitad de los sujetos fueron perfusionados intra-cardíacamente con solución salina fisiológica al 0.9% seguida de formalina al 10%, y tras ello se procedió a la extracción del cerebro y a su tinción mediante violeta de cresilo, igual que en los experimentos I y II (para una descripción detallada ver punto 3.2.5.). En la otra mitad de los sujetos, la perfusión se llevó a cabo mediante PBS heparinizado seguido de una solución fijadora compuesta por paraformaldehído al 4%, glutaraldehído al 0.4% y un 2% de sacarosa, según el método descrito por Wolf, Henschke y Würdig (1993) (ver anexo 3 del apartado 9 para una descripción precisa). Una vez extraídos los cerebros se conservaban en la solución fijadora durante una hora y en una solución de PBS con sacarosa al 15% durante las 24 horas siguientes. Pasado este tiempo se procedía a su seccionamiento (CRYOCUT 1800, con un microtomo 2020, JUNG). La mitad de las secciones obtenidas se montaban sobre portaobjetos y, posteriormente, eran sometidas al método de tinción con violeta de cresilo. La otra mitad de las secciones se procesaban para la determinación de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato diaforasa (NADPH-d), según el método especificado en el anexo 3. Esta técnica histoquímica permite determinar la presencia o ausencia de neuronas que contienen óxido nítrico. Debido a que las neuronas colinérgicas del PPTg, al igual que el resto de las neuronas colinérgicas troncoencefálicas, contienen óxido nítrico, esta técnica resulta útil para determinar la muerte selectiva de neuronas colinérgicas de estos núcleos. Por lo tanto, la tinción con violeta de cresilo permitía determinar la extensión de la lesión tanto de neuronas no colinérgicas como colinérgicas, tanto del PPTg como de las estructuras

adyacentes, mientras que la técnica de la NADPH-d servía para evaluar específicamente la muerte de neuronas colinérgicas.

El examen neuroanatómico de las lesiones se realizó mediante una lupa binocular Leica Zoom 2000, un microscopio Leitz Diaplan, y con la ayuda de un sistema fotográfico<sup>1</sup> digital (Kodak DC280 Zoom).

#### **5.2.4. Análisis estadísticos**

Los resultados se analizaron mediante varias herramientas estadísticas del programa SPSS 10.0: el análisis de la variancia de un factor (ANOVA), el análisis multivariante de la variancia (MANOVA), la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney, la correlación de Pearson y el análisis de la supervivencia según el método de Kaplan-Meier. Esta última técnica estadística es especialmente adecuada para datos longitudinales recogidos durante periodos de tiempo variable en función de un criterio de finalización (o muerte) marcado "a priori"; además, permite trabajar con datos censurados, es decir, con los datos de aquellos sujetos que por diferentes motivos abandonan el experimento antes de llegar al criterio, y comparar las curvas obtenidas por los diferentes grupos mediante contrastes. La significación se fijó al nivel de  $p \leq 0.050$ .

---

<sup>1</sup> Profesora Rosa Arévalo. Universidad de la Laguna (Tenerife)

### 5.2.5. Resumen del diseño experimental

FASE EXPERIMENTAL	GRUPO LESIÓN	GRUPO CONTROL
SEPARACIÓN + HANDLING	Separación + 4 días de manipulación (“handling”)	
INTERVENCIÓN 1	Lesión excitotóxica unilateral del PPTg	Infusión unilateral de vehículo en el PPTg
RECUPERACIÓN	Protocolo de supervisión (7 días)	
INTERVENCIÓN 2	Lesión excitotóxica unilateral del PPTg ( hemisferio contralateral)	Infusión unilateral de vehículo en el PPTg (hemisferio contralateral)
RECUPERACIÓN	Protocolo de supervisión	
PLUS MAZE	2 sesiones de 5 minutos cada una de laberinto elevado en cruz	
PRIVACIÓN DE COMIDA + HABITUACIÓN AL REFORZADOR + HABITUACIÓN AL LABERINTO	<p>Inicio del mantenimiento de los animales al 85% de su peso “ad libitum”</p> <p>Habitación a las bolitas de comida usadas como reforzador</p> <p>Habitación al laberinto</p>	
ADQUISICIÓN DMTP	Entrenamiento en una tarea de DMTP en un laberinto en T (6 ensayos por día, 30 días consecutivos máximo) aplicando una demora de 15 seg. entre la fase de muestra y la de test	
ADQUISICIÓN DNMTp	Entrenamiento en una tarea de DNMTp en el mismo laberinto (6 ensayos por día, 30 días consecutivos máximo) con una demora de 15 seg. Si el animal adquiría la tarea se pasaba al entrenamiento de la misma tarea aumentando la demora a 30 seg.	

**Tabla 13.** Resumen del diseño del experimento III.