

# **UNIVERSIDAD CATÓLICA SAN PABLO**

**FACULTAD DE CIENCIAS ECONÓMICO EMPRESARIALES Y  
HUMANAS**

**ESCUELA PROFESIONAL DE PSICOLOGÍA**



**“CREACIÓN DE UNA MEMORIA DE PREFERENCIA DURANTE EL SUEÑO EN  
ROEDORES”**

Tesis presentada por el bachiller:

**JUAN PABLO QUINTANILLA CALVI**

Para optar por el Título Profesional de

**LICENCIADO EN PSICOLOGÍA**

Asesor: Dr. Marcio Soto Añari

**AREQUIPA – PERÚ, 2019**

**Creación de una memoria de preferencia durante el sueño en roedores**

Quintanilla Calvi, Juan Pablo  
Universidad Católica San Pablo

AGRADECIMIENTOS: Este trabajo hubiera sido imposible de no ser por el constante apoyo del profesor Fernando Cárdenas a lo largo de mi formación de pregrado. No tengo palabras suficientes para agradecerle. De igual manera, las actividades desarrolladas en el laboratorio fueron posibles por el apoyo de Karen, Johana, María José, Laura, Víctor, Alejandro, Ángela, Juan Manuel, Diego y Andrés. Finalmente, gracias a los que siempre estuvieron ahí y contribuyeron a mi formación como psicólogo y como persona: Marcio y Andrea.

## INDICE

	<b>Pág.</b>
RESUMEN.....	6
ABSTRACT.....	7
INTRODUCCIÓN.....	8
OBJETIVOS.....	9
METODOLOGÍA.....	10
JUSTIFICACIÓN.....	11
CAPÍTULO 1: LOS SISTEMAS DE MEMORIA.....	14
CAPÍTULO 2: MECANISMOS DE CONSOLIDACIÓN DE LA MEMORIA.....	20
2.1 Consolidación de sistemas.....	21
2.2 Estudios sobre la neurobiología de la consolidación de sistemas.....	25
2.3 Consolidación sináptica.....	30
CAPÍTULO 3: SUEÑO Y MEMORIA.....	33
CAPÍTULO 4: TENDENCIAS Y AVANCES ACTUALES EN MANIPULACIÓN DE LA MEMORIA.....	36
4.1 Mejoramiento de la memoria.....	36
4.2 Borrar memorias.....	45
4.3 Creación (implante) de memorias.....	52
CONCLUSIONES.....	57
CAPÍTULO 5: PROPUESTA DE INVESTIGACIÓN: CREACIÓN DE UNA MEMORIA DE PREFERENCIA DURANTE EL SUEÑO MEDIANTE LA REACTIVACIÓN DE UNA MEMORIA DE CONTEXTO MEDIANTE ESTÍMULOS AUDITIVOS Y ESTIMULACIÓN EN EL HAZ PROSENCEFÁLICO MEDIAL.....	58
Resumen.....	58
Planteamiento del problema.....	58
Pregunta de investigación.....	61
Objetivos.....	61
Diseño de investigación.....	62

CAPÍTULO 6: METODOLOGÍA PROPUESTA .....	73
1. Fabricación de electrodos.....	73
2. Procedimiento quirúrgico.....	75
3. Determinación de la coordenada del haz prosencefálico medial.....	76
4. Determinación de las características de la estimulación eléctrica intracerebral.....	77
5. Prueba de preferencia de lugar.....	78
6. Registro de la actividad electroencefalográfica y detección del sueño no- rem. ....	84
7. Elaboración de protocolos experimentales.....	85
REFERENCIAS.....	86
ANEXO 1: PROTOCOLOS EXPERIMENTALES.....	104
ANEXO 2: REGISTRO FOTOGRÁFICO.....	113

## RESUMEN

En este trabajo se presenta una revisión del estado del arte del campo de la manipulación de la memoria y una propuesta de investigación que busca crear una memoria de preferencia durante el sueño en roedores. La metodología propuesta para este proyecto se fundamenta en actividades preliminares desarrolladas en el Laboratorio de Neurociencia y Comportamiento de la Universidad de los Andes, Bogotá, las cuales se describen en este documento. El desarrollo de estas actividades permitió perfeccionar las técnicas a utilizar en el desarrollo del proyecto, así como revisar el diseño metodológico.

## ABSTRACT

Here I present a review on the field of memory manipulation and a research proposal intended to create a preference memory during sleep in rodents. The proposed methodology for this project is grounded in preliminary activities developed in the Neuroscience and Behavior Laboratory of Los Andes university, which are described in this document. The development of these activities allowed to review the experimental design of the project, as well as the improvement of the techniques to be applied.

## INTRODUCCIÓN

La manipulación de la memoria es un área emergente en las neurociencias que estudia los procesos e intervenciones para la modificación de memorias y el mejoramiento de procesos mnésicos, así como para la eliminación de recuerdos y su creación sintética (implante). En las últimas décadas se han logrado avances en este campo que han revelado mucho acerca de la memoria y el cerebro humano, abriendo posibilidades para el abordaje de algunas enfermedades neurológicas y psiquiátricas cuyos tratamientos actuales son limitados.

En este trabajo se revisará la literatura existente hasta el momento acerca de los procesos de manipulación de la memoria y se propondrá un proyecto de investigación –relacionado a la revisión bibliográfica- que busca crear una memoria de preferencia durante el sueño en roedores. La metodología de esta propuesta se determinó a partir de actividades preliminares desarrolladas en el Laboratorio de Neurociencia y Comportamiento de la Universidad de los Andes, las cuales se describen en este documento. El proyecto propuesto se encuentra actualmente en proceso de desarrollo en este laboratorio, bajo la dirección del Dr. Fernando Cárdenas.



## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Realizar una revisión del estado del arte en el campo de la manipulación de la memoria, y plantear una propuesta de investigación que logre crear una memoria de preferencia durante el sueño en ratas.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Realizar una búsqueda bibliográfica completa acerca del estado del arte en el campo de la manipulación de la memoria, que concluya en la redacción de una revisión teórica que recopile la información recolectada.

Formular un proyecto de investigación con el objetivo de crear una memoria de preferencia durante el sueño en roedores.

Desarrollar actividades preliminares del proyecto propuesto, de forma que se revise el diseño de la metodología y se resuelvan dudas acerca de los alcances del proyecto y técnicas a utilizar.

## METODOLOGÍA

Se realizó una búsqueda bibliográfica con el objetivo de recopilar todos los trabajos realizados en el campo de la manipulación de memorias, así como fuentes de información importantes en lo referente a la neurobiología de la memoria. La principal base de datos utilizada fue Pubmed, y se complementó con búsquedas a través de Google Scholar. La información fue seleccionada por su valor y confiabilidad de acuerdo al criterio del autor de este documento, y fue sintetizada y redactada buscando lograr una revisión comprensible y completa en lo que respecta a manipulación de la memoria, que puede servir como una buena introducción para quien esté interesado en el tema.

Adicionalmente, a partir de la información recopilada, se propuso un proyecto de investigación que tiene el objetivo de crear una memoria de preferencia durante el sueño en roedores. Este “implante” de memoria se llevaría a cabo mediante el acople de la reactivación de una memoria de contexto inducida por un estímulo auditivo y estimulación intracerebral en el haz prosencefálico medial.

Dada la complejidad de la propuesta, fue necesario realizar actividades preliminares para determinar la metodología y los procedimientos a realizar. El resultado de estas actividades preliminares es una propuesta teórica y metodológica más sólida para la investigación, así como la adquisición de conocimientos y habilidades fundamentales para la realización del proyecto.

## JUSTIFICACIÓN

Los procedimientos para la manipulación de memorias abarcan el mejoramiento de la memoria (ya sea en la codificación, consolidación, o evocación), cambiar el contenido de memorias o borrarlas, bloquear la formación de nuevas memorias, e implantar memorias. La investigación en este campo tiene la finalidad de lograr objetivos terapéuticos a los que esta área del conocimiento puede contribuir, como por ejemplo perfeccionando tratamientos de salud mental y proponiendo intervenciones para enfermedades neurológicas. Otros tipos de aportes también pueden mejorar las condiciones de vida humana, por ejemplo, optimizando la efectividad del aprendizaje y la educación en general, que son procesos relacionados a la formación de memorias. Por otro lado, la generación de conocimiento por sí mismo y el aporte a la ciencia básica no debe menospreciarse, siendo la manipulación de la memoria un campo que hace grandes contribuciones a la comprensión del cerebro y, por tanto, del ser humano.

Mejorando los procesos de adquisición, consolidación, o evocación de la memoria se puede contribuir al tratamiento de patologías como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, o muchas otras enfermedades neurodegenerativas conocidas por cursar con problemas de memoria (Naismith, Mowszowski, Diamond, & Lewis, 2013; Simmons-Stern et al., 2012). Mejorar la memoria es también deseable en el tratamiento de otras condiciones como daño encefálico producido por traumatismos, abuso de sustancias, o enfermedades psiquiátricas como la esquizofrenia, en las que los problemas de memoria pueden empeorar otros síntomas y disminuir la eficacia de las intervenciones (Goodman & Packard, 2016; Sharma & Antonova, 2003; Shelton, 2004). Además de brindar alternativas terapéuticas,

manipular la memoria para aumentar su capacidad sería muy útil para aprovechar mejor los espacios de aprendizaje y educación, acortando el tiempo de enseñanza necesario para estos fines.

Por otro lado, cambiar o borrar memorias, al igual que bloquear la formación de algunas memorias, tiene un potencial especial para el tratamiento de trastornos mentales relacionados a experiencias traumáticas como el trastorno por estrés postraumático (TEPT), o condiciones relacionadas a traumas emocionales o experiencias de miedo intenso (Donovan, 2010; Sandkühler & Lee, 2013). Además, se han realizado intentos para optimizar tratamientos de adicciones mediante la supresión de memorias de señales relacionadas a drogas (parafernalia), las cuales aumentan notablemente las recaídas (Dennis & Perrotti, 2015). Estas técnicas también podrían ser beneficiosas para el tratamiento de ansiedad y fobias (Glannon, 2017; Schiller et al., 2010; Spiers & Bendor, 2014), lo que tendría lugar mediante la reducción del impacto de memorias negativas.

Como se revisará más adelante, el implante de nuevas memorias directamente en el cerebro ya no es ciencia ficción. Aunque este campo está todavía emergiendo, se han logrado grandes avances en los últimos años (Deadwyler et al., 2013; De Lavilléon, Lacroix, Rondi-Reig, & Benchenane, 2015; Ramirez et al., 2013). El implante de memorias puede ser una herramienta invaluable en el tratamiento de enfermedades relacionadas a la pérdida o deterioro de la memoria, así como puede ser una contribución importante a la educación. Además, el implante de memorias podría contribuir a la generación de conocimiento científico al permitir una mejor formación de investigadores.

Hoy en día, el conocimiento es generado a una velocidad casi imposible de seguir incluso para especialistas. Este tipo de tecnologías contribuirían al desarrollo del trabajo de científicos, dejándoles tiempo suficiente para desarrollar otro tipo de actividades de

esparcimiento. Esto último es, sin embargo, materia de especulación y por ahora el futuro de este campo es incierto.

Por otro lado, los intentos de implantar memorias desde la psicología (es decir, sin intervenir directamente sobre el cerebro), han demostrado que estos procedimientos pueden ser de mucha ayuda en casos para cambiar conductas poco adaptativas como consumo riesgoso de alcohol o hábitos nutricionales negativos (Bernstein, Laney, Morris, & Loftus, 2005; Clifasefi, Bernstein, Mantonakis, & Loftus, 2013). Incluso siendo éticamente debatido, queda claro que el implante de memorias puede ser utilizado para ayudar a personas con problemas de memoria, con conductas desadaptativas, y para mejorar nuestro potencial para adquirir y generar conocimiento, lo que lo convierte en una herramienta de mucho valor.

Finalmente, si bien la manipulación de la memoria puede parecer un campo de estudio que está recién en sus inicios, se está convirtiendo en una realidad con muchos beneficios potenciales (Spiers & Bendor, 2014). Todas sus posibles aplicaciones ameritan que se realice esfuerzos para comprender mejor los sistemas de memoria y trabajar en la búsqueda de nuevos procedimientos de manipulación. Este trabajo pretende ser parte de esta búsqueda.

## CAPÍTULO 1: LOS SISTEMAS DE MEMORIA

“Memoria” es un término utilizado con frecuencia en el lenguaje coloquial para referirse a la capacidad de recodar hechos o situaciones; sin embargo, para quienes se dedican a estudiarla, hace referencia a una variedad de procesos que no suelen ser tomados en cuenta por el público general. La idea de que la memoria consiste en diversas capacidades o procesos no es nueva, encontrándose en escritos de filósofos y psicólogos desde hace más de un siglo (Squire, 2004). Fue recién en la segunda mitad del siglo XX que se comenzó a recopilar información que serviría como evidencia para hacer una clasificación de los tipos de memoria, siendo los estudios de caso de pacientes amnésicos esenciales para esta tarea (Squire & Wixted, 2011).

De acuerdo con Manns y Eichenbaum (2008), la historia de los sistemas de memoria puede ser contextualizada a partir de la pregunta de si una memoria específica puede ser localizada en un lugar del cerebro o si se encuentra distribuida a través de todo este órgano. En los años 1920, Karl Lashley realizó unos experimentos cuyos resultados apuntaban a que las memorias no tenían una localización específica, dado que al dañar diferentes partes del cerebro de roedores la memoria espacial iba disminuyendo gradualmente. Poco tiempo después, el neurocirujano Wilder Penfield reportó que al estimular eléctricamente algunas áreas de cerebros humanos las personas reportaban recordar sucesos. Debido a estos hallazgos, se puede sostener que a principios del siglo pasado había evidencia que respaldaba ambas teorías (Manns & Eichenbaum, 2008).

Un personaje que cambiaría la historia del estudio de la memoria fue Henry Molaison, mejor conocido como el paciente H.M., cuyo caso fue reportado por primera vez en el año 1957

(Scoville & Milner, 1957). Algunos años después de comunicar el caso de este paciente, quien perdió la capacidad de formar nuevas memorias tras la resección de estructuras de lóbulo temporal medial (LTM) en un intento de reducir sus crisis convulsivas, se hizo un descubrimiento que sentaría las bases para una clasificación de los tipos de memoria: Si bien el paciente no podía formar nuevas memorias declarativas como para reconocer nuevas personas, sucesos de su vida, o hechos diversos, sí podía aprender una tarea de coordinación viso-motora conocida como el test de dibujo en espejo (Milner, 1962 en Squire, 2004). Esta tarea consiste en copiar un dibujo mientras que solo se puede observar la mano que dibuja a través de un espejo, tarea que, después de algunos intentos, H.M. no recordaba haber realizado, pero el efecto de la práctica era evidente (Corkin, 2002).

El caso de H.M. suele ser tomado como evidencia del rol que tiene el hipocampo en la formación de memorias, sin embargo, Squire y Wixted (2011) sostienen que, dado que el daño producido en H.M. abarcaba otras estructuras además del hipocampo, no se pudo conocer el papel real de esta estructura en la memoria hasta estudios posteriores realizados por Mishkin (1978, en Squire & Wixted, 2011). Lo que sí es claro fue el aporte de su caso a la clasificación de tipos de memoria, ya que, si bien era un paciente amnésico, mostró tener aprendizaje en otro tipo de tareas.

Posteriormente, el estudio de otros pacientes amnésicos y el trabajo experimental con animales permitió continuar el desarrollo de una clasificación de tipos de memoria más allá del aprendizaje motor mostrado por H.M., y hoy en día, la idea de que existen múltiples sistemas de memoria que funcionan en paralelo es ampliamente aceptada (Squire, 2004). Un ejemplo de clasificación de los diferentes tipos de la memoria lo encontramos en Kolb y Wishaw (2015), donde la memoria se divide en explícita e implícita, incluyendo la primera la memoria semántica y la episódica, y la segunda la memoria de hábitos, “priming”,

condicionamiento (ya sea clásico u operante), y de habilidades. Por otro lado, se propone un tipo de memoria emocional que abarca las memorias de miedo, atracción y evitación.

Si bien la clasificación de tipos de memoria no es universal, quizás la distinción más importante es la de memoria declarativa y no declarativa (o explícita e implícita), que es ampliamente compartida entre los expertos. De acuerdo con Squire y Zola-Morgan (1991), la memoria declarativa es el tipo de memoria al que las personas se refieren cuando hablan de “memoria” en un lenguaje coloquial. Este es un tipo de memoria representacional, de forma que permite tener un modelo del mundo que nos rodea, permitiendo comparar y contrastar lo que es recordado y teniendo representaciones flexibles y accesibles a la conciencia que se pueden catalogar como verdaderas o falsas. Por otro lado, la memoria no declarativa no puede ser verdadera o falsa, ya que es inconsciente y no se expresa mediante palabras sino mediante actos.

Dentro de la memoria declarativa podemos clasificar a la memoria semántica, entendida como aquella que almacena hechos y conceptos, es decir, conocimiento general (Thompson-Schill, 2003). Para Kolb y Wishaw (2015), la memoria semántica abarca todo conocimiento acerca del mundo que no es autobiográfico. Una memoria de este tipo, por ejemplo, sería la de que las computadoras son aparatos con ciertas características (pantalla, teclado) y que nos permiten conectarnos a internet, o que Erik Kandel es un investigador que ganó un premio Nobel por sus trabajos en el campo de la neurobiología de la memoria. Por otro lado, la memoria episódica (también categorizada dentro de la memoria declarativa o explícita), es aquella que nos permite recordar eventos o experiencias personales propias (Thompson-Schill, 2003). Un ejemplo de memoria episódica sería que en la mañana revisó las noticias del día, o que la noche anterior cenó algo en específico.



Esta división entre memoria episódica y semántica fue propuesta por Tulving (1972), y si bien son tipos de memoria diferentes, son aparentemente interdependientes (Greenberg & Verfaellie, 2010), dado que cada una de estas puede afectar a la otra, ya sea al momento de codificación o evocación de las memorias. De acuerdo con Tulving, la memoria semántica provee lo necesario para poder usar el lenguaje, mientras que la memoria episódica requiere de la consideración de las variables espaciales y temporales de los eventos ocurridos (Greenberg & Verfaellie, 2010). Si bien la memoria autobiográfica sería equivalente a la memoria episódica en esta clasificación, algunos sostienen que son tipos distintos de memoria (ver Fivush, 2011). Por otro lado, es posible que los recuerdos autobiográficos con el tiempo se vuelvan memorias semánticas, de forma que las experiencias sean recordadas simplemente como “hechos” que le ocurrieron a uno, pero no como “experiencias” (Benfenati, 2007).

Un dato interesante relacionado con la memoria declarativa es que parece que esta capacidad, o al menos las estructuras relacionadas a su función (sistema de memoria hipocampal) también son necesarias para poder imaginar el futuro (Eichenbaum & Fortin, 2009). Esto se intuía desde estudios de caso de pacientes amnésicos, quienes no solo tenían problemas para recordar hechos y eventos, sino que también presentaban dificultades para imaginar situaciones en el futuro. Además, existen evidencias a partir de estudios de neuroimagen que apuntan a que hay una red que se superpone en tareas que requieren de recordar y las de imaginar el futuro (Eichenbaum & Fortin, 2009).

En cuanto a los subtipos de memoria no declarativa o implícita, tenemos a la memoria procedimental, que permite el aprendizaje de habilidades motoras (como montar bicicleta o lanzar dardos), así como el priming, y condicionamientos clásico y operante, en los que no profundizaremos. Mientras el sistema de memoria declarativa depende del hipocampo, los sistemas de la memoria implícita requieren de otras estructuras como el estriado, cerebelo,

amígdala, neocórtex y vías mediadoras de reflejos (Benfenati, 2007), y mientras la memoria declarativa adquiere el aprendizaje de una forma inmediata y sin mucho esfuerzo, generar una memoria implícita por lo general toma más tiempo y mayor esfuerzo (como aprender a montar bicicleta, por ejemplo).

Por otro lado, las memorias también se pueden clasificar en función de su duración: en memoria a corto plazo o a largo plazo. Mientras la primera -también denominada “memoria de trabajo”- se refiere al almacenamiento por un periodo corto de tiempo, como solo unos segundos, la memoria a largo plazo puede durar mucho más tiempo, desde minutos hasta años. Mientras que la memoria a corto plazo depende de redes existentes y cambios a un nivel funcional, la memoria a largo plazo requiere de cambios estructurales mediados por expresión génica (Bisaz, Travaglia & Alberini, 2014).

Si bien se puede definir a la memoria como un sistema que permite el almacenamiento y evocación de información, de acuerdo con Richards y Frankland (2017), el objetivo final de la memoria no es la transmisión de información en el tiempo, sino guiar la toma de decisiones inteligente. Es por esto que, aunque la investigación en el campo de la memoria ha acostumbrado a centrarse en el recuerdo, el olvido es visto ahora como una estrategia mnésica antes que como un problema o un déficit, siendo el olvido necesario para ganar flexibilidad, por ejemplo (Richards & Frankland, 2017). Esta perspectiva sobre la memoria hace que tenga más sentido el campo de investigación en manipulación de la memoria -sobre todo en lo que refiere a la eliminación de memorias- el cual será tratado más adelante.

De acuerdo con Benfenati (2007), el olvido puede ser tan importante como la consolidación; y menciona además que es claro que la memoria no solo es una habilidad para guardar información, sino que es la esencia de nuestra individualidad y nuestra conciencia. Bisaz et al. (2014), por otro lado, sostienen que la formación de memorias a largo plazo es una

función necesaria para la supervivencia, y que la memoria forma nuestra identidad, dado que nosotros somos quienes somos por nuestras memorias, las cuales guían nuestra toma de decisiones.

Los sistemas de memoria descritos anteriormente tienen circuitos y estructuras neuronales subyacentes que permiten su funcionamiento. A continuación, abordaremos la neurobiología de la memoria centrándonos en la memoria declarativa y procedimental, dado que son los tipos de memoria de mayor relevancia para el campo de manipulación de la memoria.

## CAPÍTULO 2: MEANISMOS DE CONSOLIDACIÓN DE LA MEMORIA

Una característica de la formación de memorias que ha sido observada en diferentes especies animales y sistemas de memoria es que al principio las memorias son muy frágiles y pueden ser eliminadas por diferentes tipos de interferencia, y con el tiempo se van volviendo más estables y fuertes -además de irse integrando en las redes de recuerdos previos- proceso al que se denomina consolidación (Bisaz, Travaglia & Alberini, 2014, Diekelman & Bon, 2010). La consolidación de la memoria es un proceso dinámico, y que es determinante sobre qué recuerdos serán conservados después de su codificación y cuáles no, así como cuánto tiempo durará este proceso (Nadel, Hupbach, Gomez & Newman-Smith, 2012). El proceso de consolidación incluye diferentes fases temporales y funcionales, como la codificación, consolidación, evocación y reconsolidación (Bisaz et al., 2014). Se puede decir que es el proceso mediante el cual una memoria de corto plazo se convierte en memoria a largo plazo.

El proceso de consolidación se puede abordar, al menos, desde dos niveles: La consolidación sináptica y la consolidación sistémica (Dudai, Kami & Born, 2015). La consolidación sináptica hace referencia a una cascada de procesos a nivel celular y molecular en las neuronas, el cual es completado a lo largo de minutos y horas. Por otro lado, la consolidación de sistemas consiste en la reorganización de grandes redes neuronales y toma más tiempo (Winocur & Moscovitch, 2011), durando entre días y años, dependiendo del sistema de memoria y de la tarea (Dudai et al., 2015). La consolidación de sistemas suele ser descrita como un proceso mediante el cual las memorias dependientes de la función del hipocampo ya no necesitan de este para ser evocadas, dado que se van estableciendo en regiones distribuidas de la corteza cerebral (Squire, Genzel, Wixted & Morris, 2015). Este tipo de

consolidación es el más relevante por su relación estrecha con problemas de la memoria (Winocur & Moscovitch, 2011). De cualquier forma, la distinción entre ambos tipos o niveles de consolidación no es muy clara, dado que la consolidación de sistemas requiere de la consolidación sináptica o celular para darse (Genzel et al., 2017).

## 2.1 Consolidación de sistemas

La consolidación de sistemas (también llamada consolidación sistémica) normalmente hace referencia a los procesos de consolidación de la memoria declarativa, sin embargo, también se ha propuesto que podría darse un proceso similar en los sistemas de memoria implícita (Dudai et al., 2015). De acuerdo con Dudai et al. (2015), dado que la consolidación sistémica es un mecanismo conservado a través de la evolución de diferentes especies, extendiéndose a aves e insectos y en estructuras que no son homólogas al hipocampo humano, no sería extraño que exista un proceso similar fuera de los circuitos hipocampo-corticales.

Desde la publicación del caso de pérdida de memoria de H.M. tras la resección de estructuras del lóbulo temporal medial (Scoville & Milner, 1957) y otros similares, en los que tras una lesión en el hipocampo no podían evocar memorias del pasado cercano pero sí memorias remotas, se empezó a considerar al hipocampo como una estructura central para la memoria (Squire et al., 2015), idea que se reforzó por estudios de estimulación eléctrica cerebral en pacientes humanos y diferentes estudios en animales (Tonegawa, Pignatelli, Roy & Ryan, 2015; Winocur & Moscovitch, 2011). Actualmente, se piensa que esta estructura es esencial para la adquisición, almacenamiento inicial y evocación de la memoria, pero existe un debate acerca del rol que cumple en la representación de los recuerdos cuando estos se van volviendo más antiguos (Sekeris, Moscovitch & Winocur, 2017).

La memoria episódica requiere del hipocampo en etapas iniciales de su formación, pero eventualmente forma una representación independiente en la corteza que hace que la anterior representación en el hipocampo ya no sea necesaria (Sekeret et al., 2017). Los mecanismos de memoria en la corteza y el hipocampo han sido bastante estudiados, pero aún no se comprende bien la interacción entre los sistemas localizados en estas estructuras. Si bien las memorias son guardadas inicialmente en redes hipocampo-corticales, dependerá de los procesos que ocurran posteriormente qué área del cerebro es requerida para el almacenamiento a largo plazo (Genzel et al., 2017). Uno de los procesos más relevantes para la consolidación de la memoria es el sueño, que será explicado más adelante (Diekelmann & Born, 2010).

Se han formulado diversas teorías que pretenden explicar el proceso de consolidación de la memoria. A continuación, se abordarán tres teorías que resaltan por su difusión y respaldo en evidencia empírica.

#### 1. Teoría estándar de la consolidación de la memoria (Standard consolidation theory)

De acuerdo con esta teoría, el hipocampo tiene un papel en la memoria que es limitado en el tiempo, siendo la estructura donde se almacena la memoria durante un periodo mientras que, con el pasar del tiempo, esta se va reorganizando en nuevas redes en la corteza. De esta forma, a medida que las representaciones corticales se fortalecen, cada vez es menos necesaria la intervención del hipocampo (Sekeret et al., 2017).

Esta teoría ha sido sujeta a observaciones desde hace ya algún tiempo ante evidencia que contradice o no concuerda en parte con lo que se podría predecir a partir de la teoría. Por ejemplo, los estudios de caso de algunos pacientes con daño hipocampal desde la niñez quienes, a pesar de tener amnesia fueron capaces de rendir adecuadamente en sus escuelas

han sugerido que el hipocampo no es absolutamente necesario para el aprendizaje, siendo posible que la corteza cerebral aprenda sin intervención de este, aunque este aprendizaje sería mucho más lento (Metter & Murre, 2004). Si bien esta objeción no es tan complicada de resolver por quienes apoyan la teoría estándar de la consolidación, los hallazgos de procesos de reconsolidación (que se abordan más adelante) sí ponen a la teoría en una situación más complicada, dado que esto implica que memorias ya consolidadas en la corteza vuelvan a ser dependientes del hipocampo y re-consolidadas cuando son evocadas (Metter & Murre, 2004).

Squire et al. (2015) mencionan que la memoria no puede ser literalmente transmitida del hipocampo a la corteza -lo cual sí se creía anteriormente (ver Nadel, Winocur, Ryan & Moscovitch, 2007)- dado que la información es codificada tanto en esta estructura como en lugares de la corteza cerebral en el momento del aprendizaje. Lo que sucedería es que cambios graduales en las redes corticales formarían memorias duraderas mediante el incremento de la complejidad, distribución y conectividad entre diversas regiones de la corteza cerebral. En este proceso, el hipocampo serviría como director en el proceso de aprendizaje de la corteza, que sería mucho más lento en comparación al de las redes hipocámpales (Squire et al., 2015).

Según Nadel et al. (2007), otros problemas con la teoría estándar son que no existe un mecanismo propuesto por el cual se transfiera la memoria del hipocampo a áreas extra-hipocámpales (aunque hoy en día el avance en el estudio de los “Sharp wave ripples” podría refutar esta afirmación, ver Born & Wilhelm, 2012). Por otro lado, sostienen que, dado que para esta teoría la memoria semántica y episódica son equivalentes, no pueden explicar el hecho observado de que las memorias episódicas tienden a volverse semánticas con el tiempo. Ante estos problemas con la teoría estándar de la consolidación, surgió la teoría de la huella de memoria múltiple.

## 2. Teoría de la huella de memoria múltiple (Multiple trace theory)

En contraste con la teoría estándar, de acuerdo con la teoría de la huella de memoria múltiple (THM), las memorias se almacenan tanto en circuitos hipocampales como corticales, y ocurren procesos diferentes con memorias semánticas y episódicas (Nadel et al., 2007). Esta teoría propone que el rol del hipocampo sería, además del papel en la consolidación, más relacionado con la evocación de la memoria episódica, incluso remota, por lo que debería mostrar activación ante tareas de este tipo, siendo esta una premisa central de la teoría (Winocur & Moscovitch, 2011). Por otro lado, memoria episódica sería codificada en circuitos hipocampales que servirían como indexadores de circuitos corticales, formando redes hipocampo-corticales donde se representaría la memoria (Dudai et al., 2015). De acuerdo con Nadel et al. (2007), esta teoría hace una división clara en los procesos para la memoria episódica y semántica, siendo las primeras (episódicas) siempre dependientes del hipocampo, mientras que las memorias semánticas no requerirían de este para su evocación. Dado que de acuerdo con esta teoría el hipocampo formaría parte de las redes de memorias, no habría una contradicción con los hallazgos que sugieren que las memorias pasan por un proceso de reconsolidación (Dudai et al., 2015), lo que sí ocurre con la teoría estándar. Además, de acuerdo con Nadel et al. (2007), hay tres hechos que fortalecen la THM frente a la teoría estándar, que son: 1. Que las memorias episódicas remotas suelen tener pocos detalles al ser reportadas por sujetos amnésicos, lo que no ocurre con sujeto sanos. Esto podría indicar que esas memorias episódicas se convirtieron en semánticas y al no poder evocarse el componente episódico en sujetos amnésicos esas memorias no pueden ser reportadas con detalles. 2. Que se ha encontrado activación del hipocampo en tareas que requieren de la evocación de memorias episódicas remotas, lo cual aparentemente no se debe



a un proceso de recodificación. 3. Que las memorias episódica y semántica tienen destinos distintos a lo largo del tiempo.

Todo esto hace que la THM se vea más sólida y coherente con la evidencia que se tiene hasta el momento. Sin embargo, hay otra teoría que expande a la THM, llamada teoría de transformación de la huella.

### 3. Teoría de transformación de la huella (Trace transformation theory)

Según esta teoría, que se puede ver como una actualización de la THM (Dudai et al., 2015), la representación cortical de la memoria que se genera con el pasar del tiempo se da a partir de la extracción de las características más esenciales o esquemáticas de la memoria (Seekres et al., 2017), enfatizando la abstracción y transformación de las memorias episódicas dependientes del hipocampo en representaciones semánticas en la corteza (Dudai et al., 2015). De esta manera, una premisa central en esta teoría es que los cambios en las representaciones neurales de la memoria episódica se acompañan de cambios en la naturaleza de la memoria, la cual, se vuelve semántica en el proceso, lo cual no implica que esta nueva representación reemplace a la anterior, pudiendo coexistir ambas (Winocur & Moscovitch, 2011).

De cualquier manera, la investigación en el campo de la memoria tiende a guiarse más a partir de descubrimientos empíricos recientes -generalmente no suscritos a ninguna de las teorías descritas anteriormente-, por lo que, si bien estas teorías son buenos esquemas acerca de cómo funciona la memoria, no conllevan a un debate que pretenda defenderlas.

## 2.2 Estudios sobre la neurobiología de la consolidación sistémica

En las últimas décadas se ha realizado una gran cantidad de estudios que nos han permitido comprender mejor cómo es que nuestro cerebro puede almacenar información y utilizarla para guiar nuestras decisiones. A continuación, se mencionarán algunos descubrimientos importantes que merecen ser tomados en cuenta. Algunos de estos son acordes a algunas de las teorías planteadas sobre la consolidación, mientras que otros aportan a la comprensión de la memoria desde otras perspectivas.

Hoy en día, se conoce que la consolidación de la memoria es modulada por diversos factores. Por ejemplo, se sabe que las emociones son un regulador importante de la memoria. Se ha demostrado que el grado de activación de la amígdala (cuya activación responde a estímulos emocionales, ya sean placenteros o no) correlaciona fuertemente con la evocación de las memorias de estos estímulos (McGaugh, 2004). La amígdala basolateral tiene un papel importante en esta modulación (LaLumiere, McGaugh & McIntyre, 2017), haciendo que las memorias con carga emocional sean bien recordadas posteriormente (McGaugh, 2004).

Por otro lado, las hormonas relacionadas con respuestas fisiológicas de estrés modulan también a la consolidación de la memoria mediante interacciones neuromoduladoras en la amígdala basolateral (McGaugh, 2004). Si bien la evidencia que respalda las afirmaciones anteriores proviene sobre todo de estudios con animales, es fácilmente aplicable a los humanos dado que nuestros sistemas emocionales y de memoria funcionan de forma similar (LaLumiere et al., 2017). Estos estudios sobre la relación entre la memoria y las emociones han aportado datos interesantes que relacionan a estos dos sistemas, ambos diseñados por mecanismos de selección natural con la finalidad de contribuir a la realización de conductas que promuevan la adaptación al medio.

Así como las emociones pueden hacer que ciertas memorias se consoliden mejor que otras, hay investigaciones que se han enfocado en analizar los factores que permiten a la memoria consolidarse con mayor fuerza. Un dato interesante es el propuesto por Antony, Ferreira, Norman y Wimber (2007), quienes sostienen que la evocación es una ruta rápida para consolidar las memorias, lo cual es consistente con hecho conocido desde ya un siglo de que evocar la información repetidas veces es más efectivo que estudiar esa misma información en ausencia de su evocación. De acuerdo con estos autores, si bien esta es una forma de hacer que las memorias duren mucho tiempo, aún no se conoce bien cómo funciona este proceso, y proponen que el mecanismo podría ser similar al que ocurre durante el sueño y periodos de consolidación “offline”, asunto que se revisará más adelante.

Un concepto bastante utilizado en los últimos años es el de “engrama”, propuesto por Richard Semon, quien sostenía que el aprendizaje produce cambios físicos en el cerebro que mantienen la información y son reactivados para evocarla, y puede entenderse como “la hipotética base material de la información aprendida” (Tonegawa et al., 2015). De acuerdo con esto, podemos entender al engrama como un conjunto de células interconectadas que almacenan información, por lo que pueden ser manipulados mediante algunas técnicas, como por ejemplo con optogenética (ver Liu, Ramirez & Tonegawa, 2014).

De acuerdo con Tonegawa et al. (2015), para que se progrese en el campo de investigación de la memoria es necesario identificar engramas y las células que los componen para diferentes experiencias, por lo que es importante seguir avanzando en la tecnología que permite identificar (y manipular) estas estructuras físicas que almacenan las memorias. Muestra de que estas tecnologías aportan al debate entre las teorías de la consolidación es que, por ejemplo, estudios de activación mediante optogenética de engramas sugieren que el hipocampo sería la estructura necesaria para la evocación por defecto de la memoria, aunque ante la ausencia de este la corteza podría sustituirla en esta tarea (Sekeres et al., 2017).

Además de los estudios que utilizan técnicas de optogenética, en los últimos años se han logrado avances importantes mediante estudios que hacen uso de registros unicelulares. Un campo en el que han resaltado estas técnicas en la última década es en el estudio del sistema de posicionamiento del cerebro, el cual aparentemente se relaciona mucho con los sistemas de memoria (Buzsaki & Moser, 2013), empezando porque comparten una estructura que es fundamental para ambos sistemas: el hipocampo.

El primer descubrimiento relacionado con el sistema de posicionamiento del cerebro fue realizado por O'Keefe en el año 1971 (Kandel, 2014). Lo que el equipo de O'Keefe descubrió fue un tipo de célula piramidal en el hipocampo de roedores que respondía a la posición del animal en un lugar específico del espacio, a lo que se denominó “place field”, y a estas células se les denominó “place cells”, o células de lugar (Poucet, Lenck-Santini, Paz-Vilagrán & Save, 2003). Desde su descubrimiento, el funcionamiento de estas células permitió hacer estudios acerca de navegación y memoria; y conocer mejor las funciones del hipocampo, estructura cerebral implicada tanto en el procesamiento espacial como en la memoria declarativa. Sin embargo, pasaron muchos años para el descubrimiento de otros tipos de células que son esenciales para este sistema y que permiten la actividad precisa de las células de lugar, así como algunos de los circuitos neurales implicados.

Algunos de los aportes más importantes a este campo fueron realizados en el Kavli Institute for Systems Neuroscience en la Norwegian University for Science and Technology, en un laboratorio dirigido por May-Britt y Edvard Moser. En el año 2005 se descubrieron las “grid cells” en la corteza entorhinal medial, que son células que se activan en función del desplazamiento del animal por el espacio, formando patrones exagonales. A estos descubrimientos siguieron los de las “border cells” (células que se activan ante la presencia de límites en el espacio) y las “speed cells” (que se activan en razón de la velocidad del movimiento del animal), entre otras, las cuales permitieron explicar gran parte de la

complejidad de los sistemas de navegación del cerebro (Rowland, Roudi & Moser, 2016).

Otros laboratorios contribuyeron a la comprensión de estos sistemas con el descubrimiento de las “head direction cells” (Ranck, 1986), por ejemplo, así como a la interpretación y organización de la información sobre estos sistemas a partir de los descubrimientos realizados (Burak, 2014; Wei, Prentice & Balasubramanian, 2013).

Además de ser una capacidad relevante en sí misma, el posicionamiento en el espacio parece estar muy relacionada con los sistemas de memoria, tema que se está trabajando en la actualidad (Buzsaki & Moser, 2013). Un dato interesante en esta línea es que se ha logrado demostrar la existencia de “grid cells” (células en red) en humanos, y que estas células sufren cambios funcionales en personas con Alzheimer (que se caracteriza por la desorientación espacial y problemas de memoria) de origen genético muchos años antes de la aparición de los síntomas de la enfermedad, por lo que podría aprovecharse el análisis de estas células para establecer un diagnóstico temprano para esta enfermedad (Kunz et al., 2015). Estos hallazgos han sido replicados con éxito en modelos animales (Fu et al., 2017).

Otra línea de investigación muy importante en la actualidad, sobre todo para el campo de manipulación de la memoria, es la que centra sus esfuerzos en la comprensión del fenómeno de la reconsolidación de la memoria, sobre el cual ya se ha profundizado razonablemente en los últimos años. La reconsolidación es un proceso mediante el cual las memorias ya consolidadas, vuelven a un estado de labilidad cuando son evocadas, permitiendo que estas memorias cambien en distintas formas, como reforzándose, volviéndose más débiles, o incluso borrándose (Nadel et al., 2012). Esto contrasta con la tradición mantenida desde hacía mucho tiempo de que la consolidación de la memoria era un proceso que convertía una memoria frágil en una más estable, sin opción a que ocurra el proceso inverso. De acuerdo con Bisaz et al. (2014), fue a partir de estudios realizados en la década de los 60 y explorados nuevamente en los últimos 15 años que se ha podido determinar que memorias ya

consolidadas pueden volver a un estado de labilidad y re-estabilización que puede ser alterado de diversas formas. Se profundizará más sobre este tema en la sección de manipulación de memorias mediante alteración de proceso de reconsolidación.

Como se puede concluir a partir de los párrafos anteriores, la consolidación de sistemas es un proceso muy complejo que interactúa con circuitos cerebrales adicionales a los de la formación de memorias. Sin embargo, la consolidación sistémica no podría existir sin la consolidación sináptica, a la cual se le dedica un apartado a continuación.

### 2.3 Consolidación sináptica

La consolidación sináptica, en contraste con la sistémica, suele tomar menos tiempo y se da a nivel sináptico y celular. Si bien los diferentes tipos de memoria dependen de diferentes procesos y estructuras cerebrales, los mecanismos celulares y moleculares para los aprendizajes simples y complejos son similares a lo largo del reino animal, desde moluscos hasta los seres humanos, y entre los diferentes tipos de memoria (Benfenati, 2007). Dado que este es un tema bastante extenso, a continuación, solo se tratarán algunos asuntos fundamentales sin profundizar mucho en ellos.

La formación de memorias ya sea en el hipocampo o en otras áreas, requiere de cambios en las conexiones sinápticas, es decir, en los lugares de comunicación entre neuronas. Estos cambios se dan en la fuerza de las sinapsis, por lo que, algunas sinapsis se tienen que fortalecer y otras debilitarse para que se pueda formar una memoria (Ziegler, Zenke, Kastner & Gerstner, 2015). Estos procesos son realizados mediante diversos mecanismos celulares y sinápticos que interactúan con el ADN a un nivel epigenético. Esto es así porque los cambios funcionales de las células deben ser seguidos por transcripción de genes y síntesis de proteínas que produzcan cambios fenotípicos estables en las redes neuronales, y es por esto

por lo que los inhibidores de síntesis de proteínas y de ARN mensajero interfieren con la formación de memorias (Benfenati, 2007).

Los mecanismos de consolidación sináptica son gobernados por diferentes versiones de la plasticidad sináptica Hebbiana (Tonegawa et al., 2015). Lo que Hebb propuso es que “cuando el axón de una célula A excita a una célula B y de forma repetida y persistente toma lugar en hacerla activarse, un proceso de cambio metabólico en alguna de estas dos células tiene lugar de forma que la eficiencia de la célula A para activar a la célula B aumenta” (Hebb, 1949, en Brown & Milner, 2003). Esta propuesta se difundió con la frase “las que disparan juntas se quedan juntas”, y posteriormente fue mejor demostrada mediante la descripción del fenómeno de potenciación a largo plazo (long term potentiation, LTP) por Bliss y Lomo (1973).

El fenómeno de la potenciación a largo plazo se define como un incremento persistente en la eficacia sináptica que es inducido por una ráfaga de actividad en las neuronas presinápticas, y ha sido ampliamente estudiado por su importancia para el almacenamiento de la información en diferentes regiones cerebrales (Byrne, 2008). Diferentes estudios han logrado que en la actualidad se considere a este fenómeno como un sustrato importante para la memoria, y si bien antes se creía que ocurría solamente en el hipocampo y que era de tipo “Hebbiano”, al día de hoy se ha descrito en diferentes áreas del cerebro como la amígdala, cerebelo, entre otras, y diversos tipos que no necesariamente siguen el postulado de Hebb, existiendo incluso una potenciación a largo plazo anti-hebbiana, la cual se da, por ejemplo, en la sinapsis de las fibras Mossy con la región CA3 del hipocampo (Byrne, 2008; Lamsa, Heeroma, Somogyi, Rusakov & Kullman, 2007).

Por otro lado, se han descrito subtipos de potenciación a largo plazo dependiendo del tiempo de fortalecimiento de las sinapsis, denominados potenciación temprana y tardía (Clopath,

Ziegler, Vasilaki, Busing & Gerstner, 2008). Mientras el primero no requiere de síntesis de proteínas o transcripción genética, la potenciación a largo plazo sí lo hace. Si bien no existe un mecanismo universal de potenciación a largo plazo, el más icónico es el que utiliza receptores NMDA (N-metil D-aspartato), los cuales ponen en marcha mecanismos de fortalecimiento sináptico cuando una neurona presináptica estimula a una postsináptica que resulta activada en este proceso (potenciación Hebbiana), sirviendo para inducir potenciación temprana y tardía (Byrne, 2008).



### CAPÍTULO 3: SUEÑO Y MEMORIA

Un hecho en el que los expertos parecen estar de acuerdo es que el sueño es un estado fundamental para un correcto funcionamiento de la memoria -lo cual es una idea propuesta desde los estudios experimentales de Ebbinghaus hace más de un siglo (Born & Wilhelm, 2012)-, así como lo es para otras funciones cognitivas (Chalmers, 2017; Born, Rasch & Gais, 2004). Sin embargo, todavía no son muy claros los mecanismos del sueño que contribuyen a la consolidación de la memoria, ya sea sináptica o sistémica.

El sueño de los mamíferos se puede dividir en dos tipos: sueño rem (del inglés, *rapid eye movements*), y sueño no-rem, que a su vez se divide en diferentes niveles de profundidad, siendo el más profundo el sueño de ondas lentas. Estos se van alternando a lo largo de los periodos de sueño, y tienen una contribución importante en los procesos de consolidación, ya sea sistémica, más relacionada con el sueño no-rem (sobre todo en su fase de ondas lentas), o sináptica, la cual se relaciona más con el sueño rem (Diekelman & Born, 2010).

Born y Wilhelm (2012) proponen, a partir del modelo estándar de la consolidación de la memoria (que asume que la memoria es almacenada temporalmente en el hipocampo y luego es transferida gradualmente a la corteza), que el sueño es un proceso activo de consolidación mediante el cual las “nuevas” memorias son redistribuidas en otras redes neuronales para su almacenamiento a largo plazo. Diversos estudios han demostrado el efecto del sueño en la consolidación, ya sea cuando se trata de una noche completa de sueño o tan solo unas horas, como una siesta, y que este beneficio, si bien ocurre en todos los sistemas de memoria, es mayor para memorias explícitas y las más relevantes para guiar la conducta (Diekelman & Born, 2010). El sueño REM, si bien su papel en la memoria ha sido bastante debatido (Siegel,

2001), tiene un efecto especialmente importante en la consolidación de memorias emocionales y memoria no declarativa mientras que el sueño de ondas lentas lo es para la memoria declarativa, que es dependiente del hipocampo (Born & Wilhelm, 2012; Diekelman & Born, 2010; Sara, 2017).

Una implicancia del modelo estándar es que para que las memorias almacenadas temporalmente se conviertan en memorias de largo plazo tienen que ser reactivadas repetidamente en periodos “off line” (es decir, cuando el individuo no está realizando actividad conductual), posteriores al aprendizaje (Born & Wilhelm, 2012; Sara, 2017), lo cual fue propuesto hace más de 40 años por David Marr (Breton & Robertson, 2013), un personaje importante en la investigación sobre la memoria. La reactivación (*replay*) de memorias es una buena solución al dilema de la estabilidad vs plasticidad (Mermillod, Bugaiska & Bonin, 2013; Siegel, 2001), que consiste en que el cerebro tiene que ser capaz de consolidar nuevas memorias (es decir, fortalecer y crear conexiones), sin borrar las memorias previas. La reactivación de memorias almacenadas temporalmente y la actividad electrofisiológica que la acompaña han sido propuestos como un interesante mecanismo de integración gradual de estas memorias lábiles a redes neo-corticales más estables, que se cree que es esencial para la consolidación (Breton & Robertson, 2013; Born, Rasch & Gais, 2004).

Esta reactivación ha sido demostrada en múltiples ocasiones y es mucho más común en el sueño no-REM que en el sueño REM, y también ocurre en la vigilia cuando un recuerdo es evocado, pudiendo en este último caso haber interferencias que impidan la reconsolidación de esta memoria (Born & Wilhelm, 2012). Por otro lado, de acuerdo con Sara (2017), la reactivación de las memorias no es aleatoria, y son más comunes en presencia de estímulos relacionados con la experiencia codificada (lo cual, como se explicará más adelante, es utilizado para procedimientos de manipulación de la memoria). Además, los recuerdos asociados a reforzadores son reactivados con mayor facilidad.

Aún no es claro si la reactivación de memorias durante el sueño induce la potenciación a largo plazo o solo mantiene la potenciación iniciada anteriormente durante la vigilia, sin embargo, esta potenciación a largo plazo puede ser inducida en sueño REM, lo que es difícil que ocurra durante el sueño de ondas lentas (Diekelman & Born, 2010). Lo que sí es un hecho es que existen diferentes patrones electrofisiológicos que permiten la integración de estas memorias, como las ondas lentas observadas en la corteza, los “spindles” talamocorticales, y los “sharp wave ripples” del hipocampo (Born & Wilhelm, 2012; Born, Rasch & Gais, 2004) -en los cuales no profundizaremos-, y que la reactivación es necesaria para el mantenimiento de la potenciación a largo plazo (Chambers, 2017).

Una hipótesis que integra bastante bien lo conocido hasta el momento sobre sueño y memoria es la “hipótesis de la secuencia”. De acuerdo con esta hipótesis, tanto la fase REM como la no-REM del sueño tienen un papel fundamental en la consolidación de la memoria durante el sueño. Mientras que durante la fase no-REM se procesa la información que no es relevante como para ser almacenada y se discrimina de la que sí lo es, en la fase REM las memorias “sobrevivientes” serían integradas a memorias preexistentes (Giuditta, 2014; Sara, 2017). Esta hipótesis tiene apoyo de estudios realizados con electroencefalografía, conductuales, y bioquímicos (ver Giuditta, 2014 para una revisión).

En suma, el sueño es un estado fundamental para los procesos de consolidación de la memoria, ya sea consolidación sináptica o sistémica, por lo que no puede ser pasado por alto para comprender a los sistemas de memoria en general.

## CAPÍTULO 4: TENDENCIAS Y AVANCES ACTUALES EN MANIPULACIÓN DE LA MEMORIA

Los métodos de manipulación de la memoria actuales incluyen técnicas de optogenética, estimulación transcranial, estimulación cerebral profunda (“deep brain stimulation”, DBS), reactivación de recuerdos por señales durante el sueño (“cued reactivation during sleep”) e intervenciones farmacológicas (Spiers & Bendor, 2014). En las secciones siguientes se revisará la aplicación de estas técnicas al mejoramiento de procesos de memoria, y en las diferentes alternativas para borrar, modificar o implantar memorias.

### 4.1 Mejoramiento de la memoria

Podemos pensar en diferentes mecanismos de mejoramiento de los procesos de la memoria, los cuales, en teoría, pueden actuar sobre los mecanismos de codificación, consolidación y evocación (reconsolidación). Hasta donde conocemos, la mayoría de estos intentos se han orientado a mejorar la consolidación, por lo que es común que estos se lleven a cabo durante el sueño, como se describirá más adelante. Además, el mejoramiento de la memoria se puede realizar desde distintos tipos de abordaje, como por ejemplo haciendo uso de fármacos, estimulación cerebral, ya sea intracerebral o transcraneal (que puede ser eléctrica o magnética), procedimientos para mejorar el sueño (y, por lo tanto, también la memoria), así como por protocolos para reactivar recuerdos durante el sueño, entre otros.

En cuanto al uso de agentes farmacológicos, existen diferentes mecanismos mediante los cuales pueden afectar a la memoria. Algunos de estos pueden darse a un nivel de expresión

genética, otros mediante cambios en la excitabilidad celular, promoviendo la expresión de proteínas asociadas a los procesos mnésicos, modulando la neurotransmisión, entre otros (Alberini & Chen, 2012). De esta forma, los agonistas del receptor 5HT<sub>1a</sub> de serotonina, un neurotransmisor implicado en diversos procesos cognitivos, han demostrado ser efectivos para mejorar la memoria (Pittalà et al., 2015), y así como estos fármacos, hay neurotransmisores, hormonas, y neuropéptidos que pueden tener efectos similares (Alberini & Chen, 2012).

Una sustancia que aparentemente es efectiva para estos fines es el factor de crecimiento de la insulina tipo 2 (IGF-2), el cual interactúa con los mecanismos moleculares intracelulares para la formación de memorias (Alberini & Chen, 2012; Graff & Tsai, 2011). Este factor de crecimiento es necesario para la regulación de la proliferación celular en general, así como su crecimiento, migración, diferenciación y supervivencia, e interactúa con diferentes receptores para lograr sus efectos (Bergman, Halje, Nordin & Engstrom, 2013). De la misma forma, se han encontrado resultados prometedores con la administración de magnesio (Slutsky et al., 2010), así como compuestos cannabinoides y glucocorticoides (de Bitencourt, Pamplona & Takahashi, 2013), aunque sus mecanismos de acción aun no son bien conocidos y algunos de estos estudios han sido llevado a cabo solo en modelos animales.

Hay una variedad de sustancias que pueden mejorar los procesos de memoria de forma indirecta, mejorando otras funciones cognitivas como la atención, como es el caso del metilfenidato. Por otro lado, hay otras sustancias que podrían tener un efecto directo sobre mecanismos de codificación, consolidación o evocación de la memoria que siguen siendo investigados, como agonistas dopaminérgicos y noradrenérgicos o inhibidores de su recaptación (Floresco & Jentsch, 2011). Otro grupo de fármacos que tienen un papel en mejorar la memoria son los que se prescriben para condiciones como la enfermedad de Alzheimer, como los inhibidores de acetilcolinesterasa (Colovic et al., 2013) o antagonistas

de receptores NDMA (Lockrow, Boger, Bimonte-Nelson & Granholm, 2011; Algin et al., 2017).

Algunos investigadores han logrado mejorar el rendimiento en tareas de memoria mediante la aplicación de fármacos junto a intervenciones comportamentales. Haubrich et al. (2017), por ejemplo, lograron extinguir -en modelos animales- una memoria emocional mediante la combinación de la administración de un fármaco y una intervención para mejoramiento por reconsolidación (la extinción de un recuerdo o conducta en realidad consiste en un nuevo aprendizaje para inhibir dicho recuerdo o conducta, y no en eliminarla). De manera similar, Rodriguez et al. (2013) consiguieron mejorar el proceso de consolidación para memoria declarativa en sujetos humanos mediante la administración de clonazepam durante la fase de reconsolidación de la memoria en cuestión. Como se explicó anteriormente, la reconsolidación es un fenómeno que se da cuando los recuerdos son evocados, entrando nuevamente en un estado de inestabilidad o labilidad del que pueden consolidarse nuevamente fortaleciéndose, o en caso de que se perturbe el proceso, eliminarse, por lo que también se ha aprovechado para eliminar recuerdos (lo que se tratará en la siguiente sección).

Una alternativa para el mejoramiento del funcionamiento que ha sido explorado en la última década es mediante la estimulación eléctrica intracerebral. Hamani et al. (2008), reportaron un mejoramiento en la capacidad de evocar memorias mediante la estimulación de áreas hipotalámicas en un paciente que estaba recibiendo ese tratamiento para el control de sobrepeso, lo cual refieren se podría explicar por la modulación del sistema límbico ejercida por el hipotálamo. Por otro lado, Laxton et al. (2010) reportaron buenos resultados en cuanto a rendimiento en tareas de memoria en pacientes con enfermedad de Alzheimer después de un procedimiento de estimulación intracerebral crónica.

Así como en los estudios descritos, se ha intentado mejorar los procesos de la memoria mediante estimulación eléctrica intracerebral en sujetos que no sufren enfermedades relacionadas a la pérdida de memoria. En términos generales, se ha demostrado que la estimulación en algunas áreas es efectiva, como en la corteza entorhinal (Suthana et al., 2012) o el lóbulo temporal medial, que incluye a la corteza entorhinal, pero también que en otras áreas no existe ningún efecto, como ocurre en la corteza prefrontal o parahipocampal (Kucewics et al., 2018), o que incluso se puede llegar a producir un déficit de memoria, como es el caso de la estimulación directa en el hipocampo (Suthana et al., 2012; Suthana & Fried, 2014). Otros lugares fuera de lóbulo temporal medial donde la estimulación ha sido beneficiosa para la memoria han sido áreas que mantienen conexiones con el hipocampo como el hipotálamo, el núcleo anterior del tálamo, el área septal, o incluso el nervio vago, aunque no se conoce bien el mecanismo de acción de estas intervenciones, que podría ser mediado por mecanismos atencionales o perceptuales, por ejemplo (Suthana & Fried, 2014). Es importante tomar en cuenta que los estudios de estimulación intracerebral para mejorar la memoria han sido casi todos llevados a cabo en pacientes que sufren de epilepsia (dado que estos ya tienen los electrodos implantados en el cerebro), y que las tareas para evaluar el rendimiento de la memoria varían entre los diferentes estudios, lo cual podría sesgar los resultados (Suthana & Fried, 2014). Por otro lado, hasta el momento no se han detectado efectos adversos ocasionados por estos procedimientos (Suthana et al., 2012).

Unos proyectos relacionados a la estimulación intracerebral muy interesantes son los realizados por Deadwyler et al. (2013) y Hampson et al. (2013), en los que a través del desarrollo de un modelo computacional lograron que un animal “donante” facilite el aprendizaje de otro “receptor” mediante la transmisión de patrones de actividad del hipocampo. Esto se dirige hacia su utilización en sujetos humanos.

Además de los procedimientos invasivos descritos anteriormente para estimular áreas cerebrales directamente con corriente eléctrica, existen otras alternativas como la estimulación eléctrica transcraneal, ya sea por corriente directa o alterna, y la estimulación magnética transcraneal. La estimulación magnética fue demostrada por primera vez en el año 1985, y funciona creando un campo magnético que traspasa el cráneo e influencia eléctricamente a las células que alcanza, llegando a generar potenciales de acción en estas neuronas (Klein et al., 2015). Este procedimiento ha sido utilizado para investigación y para el tratamiento de diferentes enfermedades neurológicas y psiquiátricas como el dolor crónico, trastornos depresivos, polineuropatías, entre otras (ver Klein et al., 2015).

En cuanto al uso de esta técnica para mejorar los procesos de la memoria, se ha demostrado que su aplicación en algunas áreas cerebrales ha sido beneficiosa para el rendimiento en algunas tareas de memoria, pero esto depende del protocolo a utilizar, ya que se pueden aplicar pulsos individuales, repetidos, emparejados, terapias crónicas, entre otros (San Agustín & Pons, 2017). Un área de especial interés es la corteza prefrontal, la cual parece ser importante para la codificación y evocación de la memoria (Manenti, Cotelli, Robertson & Miniussi, 2012).

Además de la estimulación magnética transcraneal, la estimulación transcraneal con corriente eléctrica directa ha sido comúnmente utilizada para mejorar la cognición (Bartés-Faz & Vidal-Piñeiro 2016), siendo algunas de sus ventajas que no es invasivo, no es doloroso, y es una técnica sencilla que ha demostrado ser efectiva para mejorar la cognición en diferentes procesos, sin embargo, aún no se conoce bien cómo es que produce sus efectos (Bennabi et al., 2014). Un metaanálisis (Simonsmeier, Grabner, Hein, Krenz & Schneider, 2018) reciente demostró que esta técnica es efectiva sobre todo para mejorar la fase de codificación de la memoria. De la misma forma, esta técnica ha sido utilizada en sujetos con problemas de



memoria (como deterioro cognitivo leve) con éxito (Hampstead, Sathian, Bikson & Stringer, 2017).

La estimulación eléctrica transcraneal es, al igual que la estimulación magnética, prometedora para mejorar la cognición en sujetos sanos y con patologías psiquiátricas y neurológicas, pero aún no se ha profundizado lo suficiente en su efecto sobre los procesos específicos de la memoria, aunque sí se ha desarrollado bastante el campo en lo que respecta a la memoria de trabajo (Bennabi et al., 2014). Asimismo, falta estandarizar los procedimientos y trabajar en la comprensión de sus mecanismos de acción.

Un abordaje distinto a los anteriores es mediante diferentes intervenciones realizadas durante el sueño, que, como se explicó anteriormente, es un estado esencial para la consolidación de la memoria. Una alternativa que se ha explorado consiste simplemente en mejorar la calidad del sueño, lo que afecta positivamente a la consolidación de la memoria. Un estudio resaltante en esta línea es el de Papalambros et al. (2017), quienes utilizaron estimulación acústica en patrones específicos relacionados con las ondas electroencefalográficas observadas durante el sueño para incrementar la actividad de las ondas lentas en adultos mayores, observando una mejoría en tareas de memoria en el grupo de ancianos que fue sometido a esta estimulación en contraste con el grupo control.

De una forma similar, Landenbauer et al., (2017, en Kim, Pardilla-delgado & Alger 2017) lograron mejorar la consolidación de la memoria mediante la sincronización de diferentes ondas cerebrales (husos del sueño y ondas lentas), las cuales intervienen en los procesos de consolidación. Intervenciones como esta pueden ser beneficiosas para personas que sufren de patologías como la enfermedad de Alzheimer, la cual se caracteriza por problemas de sueño y de memoria (Pardilla-delgado & Alger 2017). Otro estudio con resultados prometedores para potenciar la memoria mediante el mejoramiento del sueño es el de Marshall, Helgadóttir,

Molle y Born (2006), quienes a través de la aplicación de estimulación transcraneal para inducir sueño de ondas lentas lograron mejorar la retención de memorias declarativas. Esto demostró que las oscilaciones lentas endógenas observadas durante el sueño tienen un papel importante en la consolidación de la memoria.

Además del mejoramiento del sueño y su esperado efecto sobre la consolidación de la memoria, se ha explorado profundamente en los últimos años un procedimiento que permite mejorar la consolidación de memorias de forma selectiva denominado “reactivación de memorias guiada” (“cued memory reactivation” o “targeted memory reactivation”). Durante el sueño, los patrones de activación neuronal codificados durante la vigilia son reactivados de forma espontánea para que sean fortalecidos o consolidados (Oudiette & Paller, 2013), lo cual se apoya en la evidencia de que cuando se inactiva al hipocampo durante estos periodos de reactivación las memorias no son consolidadas adecuadamente (Bendor & Wilson, 2012). Dado que se ha demostrado la importancia de esta reactivación para el proceso de consolidación, diversas investigaciones se han orientado a comprender cómo es que ocurre esta reactivación y cómo se puede manipular para mejorar la consolidación de ciertas memorias de forma selectiva (Chambers, 2017).

Las células de lugar (o “place cells”, revisadas anteriormente) han tenido un rol importante en la comprensión de los mecanismos de reactivación, ya que ha sido a través de estas que se han descubierto los diferentes patrones de activación que pueden ocurrir en estudios con modelos animales (normalmente de forma comprimida, es decir, de una manera más rápida que como ocurrió la experiencia), dándose por ejemplo reactivaciones en el orden original o en reversa, o variaciones en la frecuencia de reactivación en las diferentes fases del sueño (Belchior, Pavao, Furtunato, Eichenbaum & Tort, 2018). Durante el sueño no-REM, este fenómeno es orquestado por las “sharp wave ripples”, que son ondas que se registran en el hipocampo y son relevantes para la consolidación de memoria (O’Neil, Playdell-Bouvery, Dupret &

Csicsvari, 2010). Un aspecto a tomar en cuenta es que esta reactivación de patrones también ocurre en la vigilia, pero de forma distinta y solo en determinados momentos, particularmente cuando los animales están en periodos de inmovilidad, donde estos patrones parecen servir para otros propósitos como la planeación de la conducta o evocación de memorias (Carr, Jadhav & Frank, 2011).

La reactivación guiada de memorias consiste en controlar la reactivación de las memorias mediante la presentación de estímulos relacionados con cada recuerdo, lo cual es posible porque el cerebro tiene la capacidad de procesar ciertos estímulos mientras duerme y sin llegar a ser despertado, como estímulos auditivos y olfatorios (Oudiette & Paller, 2013). Esta intervención se suele realizar en la fase no-REM del sueño, dado que no ha demostrado ser efectiva en sueño REM (Chambers, 2017), aunque en este último también se da la reactivación espontánea, pero a una velocidad similar a la de la experiencia y no en una manera comprimida (Bendor & Wilson, 2012).

En un interesante estudio, Rasch, Buchel, Gais & Born (2007), usaron un estímulo olfatorio para reactivar memorias en sujetos humanos que fueron expuestos al mismo olor mientras aprendían tareas que requerían de memoria declarativa o procedimental, y demostraron que la reactivación producida por el estímulo olfatorio mejoró la consolidación durante el sueño de ondas lentas (no-REM) para memorias declarativas, pero no para las procedimentales. Por otro lado, el procedimiento no fue efectivo cuando se realizó durante sueño REM o vigilia, y se reportó un aumento de actividad significativo en el hipocampo en durante la reactivación durante sueño de ondas lentas. Un estudio similar (Ashton, Cairney, & Gaskel, 2018) reportó que la reactivación guiada no tuvo ningún efecto en una tarea de memoria emocional (reconocimiento de imágenes con carga afectiva a las que fueron expuestos anteriormente), lo que se puede explicar porque la memoria emocional podría ser más robusta y duradera, lo

cual resalta, según los autores, la importancia de escoger bien los paradigmas a utilizar en este tipo de investigaciones.

Se han desarrollado estudios similares en modelos animales con resultados positivos, como el realizado por Bendor y Wilson (2012), donde utilizaron estímulos auditivos, de la misma forma en que Rudoy, Voss, Westerberg y Paller (2009) lo hicieron con éxito en sujetos humanos. De forma similar, Antony, Gobel, O'hare, Reber y Paller (2012), reportaron una mejora en la memoria procedimental (la tarea consistía en aprender a tocar dos melodías en un piano) tras la reactivación de esta con estímulos auditivos (las melodías a tocar). El efecto de esta estimulación en los procesos de memoria fue demostrado mediante registros electroencefalográficos (ver Antony, Gobel, O'hare, Reber & Paller, 2012).

Recientemente, Shimizu et al. (2018) aplicaron un procedimiento de reactivación guiada mediante un sistema que permitía aplicar los estímulos en momentos determinados de las ondas lentas del sueño no-REM que iban siendo registradas con un electroencefalograma. Estos autores demostraron un beneficio importante después del procedimiento en una tarea de navegación espacial que fue aprendida anteriormente, lo cual se acompañó de cambios en las ondas electroencefalográficas y resultó prometedor para mejorar la memoria para actividades de la vida cotidiana.

La reactivación guiada de memorias es, entonces, una buena alternativa para optimizar los procesos de consolidación de la memoria, lo cual sería conveniente dado que las personas estamos expuestas a muchos sucesos e información cada día, surgiendo dificultades para recordar (Oudiette & Paller, 2013). Sin embargo, no hay que olvidar otras alternativas que, son más sencillas y han demostrado buenos resultados, como las intervenciones a través de la música que han sido beneficiosas para mejorar la memoria en pacientes con enfermedad de Parkinson y Alzheimer, de los cuales hay diversas investigaciones (Naismith, Mowszowski,

Diamond & Lewis, 2013; Moreira, Justi & Moreira, 2018; Simons-Stern et al., 2012), o los tratamientos clásicos para mejorar la calidad del sueño, que afectan indirectamente a la memoria, entre otros.

#### 4.2 Borrar memorias

La formación y evocación de las memorias es esencial para un comportamiento normal que permita adaptarse al medio y para tomar decisiones a diario, así como para la formación de la personalidad; pero la memoria también es un componente central de patologías cognitivas, enfermedades relacionadas a la ansiedad y al estado de ánimo, y en las adicciones (Alberini & LeDoux, 2013). De aquí se desprende que manipular diferentes recuerdos de forma selectiva (como eliminarlos o cambiarlos) podría ser útil en el tratamiento de estos desórdenes, sobre todo cuando se trata de manipular el contenido de las memorias -en contraste con manipular la capacidad de esta, que es lo que se haría en los intentos para mejorar la consolidación- (Glannon, 2017).

El campo de investigación que se orienta a desarrollar mecanismos de eliminación de memorias está en una fase inicial, aunque en los últimos años ha habido un desarrollo importante en las técnicas que permiten eliminar recuerdos (Lavazza, 2015). Dado que la memoria es un componente central de nuestra identidad y para nuestra toma de decisiones, hay diversos temas éticos trabajados con relación a su manipulación, sobre todo respecto a la eliminación de memorias, cuya revisión se recomienda (ver Henry, Fishman & Younger, 2007; Lavazza, 2015; Elsey & Kindt, 2016).

Los mecanismos en desarrollo para poder eliminar recuerdos se orientan a ser de utilidad en el tratamiento de trastornos de ansiedad, sobre todo para el trastorno de estrés postraumático, que es reconocido por algunos como el único trastorno neuropsiquiátrico de causa conocida -

dado que implica una experiencia traumática de origen-, aunque su tratamiento sigue siendo un reto (Giustino, Fitzgerald & Maren, 2016), así como las fobias y los trastornos de pánico, los cuáles se pueden ver como desórdenes del contenido de la memoria, donde el problema no se encuentra en la formación de recuerdos, sino en eliminarlos cuando no son adaptativos (Glannon, 2017).

De forma similar, se puede usar la eliminación de recuerdos para el tratamiento de adicciones, que pueden ser vistas como un trastorno de la memoria debido a que las recaídas suelen ser ocasionadas por asociaciones de diferentes contextos o situaciones con el consumo que precipitan deseos incontrolables de consumo, ocurriendo incluso mucho tiempo después del abandono del consumo (Dennis & Perroti, 2015; Lee, Gardner, Butler & Everitt, 2009). En este sentido, Goodman & Packard (2016) sostienen que el cambio en el modo de uso de drogas con fines recreativos al uso para consumo compulsivo es mediado por mecanismos asociados a la memoria en el hipocampo y estriado dorsomedial, y que la evidencia que fundamenta esta perspectiva de las adicciones procede de estudios de memoria en el contexto de investigación en drogas como la cocaína, alcohol y anfetaminas. La modificación o eliminación de memorias se plantea como una alternativa terapéutica para estos desórdenes.

Para modificar o eliminar memorias, hasta donde sabemos, se han desarrollado dos abordajes con relación al tiempo ocurrido desde la formación de la memoria: El primero se centra en impedir la consolidación de una memoria apenas se vive la experiencia, y el segundo se realiza mediante el bloqueo de la reconsolidación de memorias, tiempo después de haber sido ya consolidadas. En cuanto al primero, existen diversos compuestos que han sido utilizados con éxito para impedir una consolidación normal de la memoria y que han sido eficaces para impedir que un evento traumático afecte negativamente el bienestar de las personas causando perjuicios psicológicos que pueden llevar a un desorden como el trastorno de estrés postraumático (Lavazza, 2015).

La sustancia que ha sido más utilizada en estas investigaciones es el propranolol, que bloquea los receptores adrenérgicos B1 y B2 evitando la neurotransmisión noradrenérgica, y es administrada al poco tiempo (unas horas) de experimentar un evento traumático (Thomas, Saumier, Pitman, Tremblay & Brunet, 2017). Esta intervención no afecta la memoria autobiográfica/declarativa del evento, pero sí reduce efectivamente la memoria emocional negativa relacionada con el suceso traumático (Lavazza, 2015). De acuerdo con Thomas et al. (2017), estos efectos de la administración de propranolol inmediatamente después de un aprendizaje han sido bien demostrado en sujetos animales, pero no con humanos, lo que se podría explicar por la vía de administración del propranolol en sujetos humanos, que, al ser por vía oral, su efecto es retrasado (en animales se suelen utilizar vías parenterales). Estos autores realizaron algunos experimentos concluyendo que, en el caso de la administración por vía oral, la intervención debe realizarse antes de que ocurra la experiencia negativa. Esta conclusión también aplica a la eliminación de memorias mediante la disrupción de la reconsolidación de la memoria, lo que se desarrolla a continuación.

Dado que en muchos casos es difícil poder predecir cuándo va a ocurrir un evento traumático para poder administrar un inhibidor de la consolidación, los estudios en los últimos años se han enfocado en una alternativa que puede ser utilizada mucho después de que la memoria sea consolidada para borrarla o modificarla. Esta alternativa permite eliminar memorias, o al menos la valencia emocional de ciertas memorias, mediante la disrupción de la reconsolidación de la memoria.

Por “reconsolidación”, nos referimos a un estado de labilidad o fragilidad de las memorias que ocurre cuando estas son evocadas, y que tienen que ser re-estabilizadas para persistir, de lo contrario, son eliminadas (Kindt, 2018). La reconsolidación de la memoria ha sido redescubierta hace pocos años, y contrasta con la perspectiva tradicional de la memoria que sostenía que la formación de memorias seguía un proceso lineal, en el que una vez que las

memorias eran consolidadas ya no eran susceptibles a ser modificadas (Alberini & LeDoux, 2013). Dado que en el proceso de reconsolidación las memorias vuelven a ser frágiles, se puede intervenir en el proceso de re-estabilización para evitar que las memorias vuelvan a ser consolidadas, eliminándose en el proceso (Schwabe, Nader & Pruessner, 2014).

De acuerdo con Alberini y LeDoux (2013), la reconsolidación es un fenómeno que se ha observado en diferentes sistemas de memoria y en diferentes tipos de organismos, desde invertebrados hasta seres humanos, y es un proceso que puede ser manipulado para debilitar, eliminar o mejorar las memorias. Además, sostienen que la ventaja de la reconsolidación, o su utilidad en condiciones naturales, consiste en que permite responder de una manera flexible a contextos en cambio constante.

El procedimiento para eliminar una memoria por reconsolidación consiste básicamente en evocar un recuerdo (lo cual desestabilizará el recuerdo, ya que entrará en fase de reconsolidación) y administrar un inhibidor de la reconsolidación para que ese recuerdo, ahora frágil, no pueda ser consolidado nuevamente. Las memorias pueden ser eliminadas mediante el bloqueo de la reconsolidación producido por agentes farmacológicos o con intervenciones comportamentales (Agren et al., 2012). Dado que la consolidación o reconsolidación de la memoria requiere de la síntesis de proteínas, al administrar inhibidores de síntesis de proteínas cuando una memoria entra en fase de reconsolidación, esta puede ser eliminada (Alberini & LeDoux, 2013; Roesler, 2017). Un fármaco que funciona de esta manera y ha sido utilizado para inhibir la reconsolidación es la anisomicina (Rudy, Biedenkapp, Moineau & Bolding, 2006; Sorg, Todd, Slaker & Churchill, 2015).

Otra alternativa para la disrupción de la reconsolidación ha sido mediante el uso de propanolol, que, como se explicó anteriormente, es un inhibidor de la transmisión noradrenérgica, que es importante para la consolidación o reconsolidación de la memoria



(Wideman, Jardine & Winters, 2018; Wouda et al., 2010). Esta sustancia ha recibido considerable atención por su potencial terapéutico en el tratamiento del trastorno por estrés postraumático, aunque no siempre ha demostrado ser efectivo (Giustino, Fitzgerald & Maren, 2016). Otra sustancia que ha sido utilizada con los mismos propósitos es la rapamicina, que actúa inhibiendo la mTOR (*mamalian target of rapamicyn*) y muestra efectos similares en la reconsolidación (Alberini & LeDoux, 2013; Lin et al., 2014).

Existen otras alternativas para interferir con la reconsolidación, por ejemplo, mediante el bloqueo de la neurotransmisión glutamatérgica, la cual es necesaria para el proceso de re-estabilización de las memorias (Dennis & Perroti, 2015). Cabe resaltar que los sistemas de neurotransmisión colinérgico y las hormonas glucocorticoides también parecen modular el proceso de reconsolidación (Amiri et al., 2015). Drexler y Wolf (2017) demostraron que los antagonistas de glucocorticoides son capaces de interferir con la reconsolidación de memorias emocionales, lo cual se explica por los receptores de glucocorticoides encontrados en la amígdala e hipocampo. Se ha demostrado también que se pueden usar vías de autofagia para facilitar la eliminación de memorias, las cuales desestabilizan a las memorias degradando receptores AMPA (Shehata, Abdoy, Choko, Matsuo, Nishizono & Inokuchi, 2018). Finalmente, al igual que para la consolidación, el sueño es un elemento importante en la reconsolidación de la memoria, aunque esto recién se está empezando a investigar (Brawn, Nusbaum & Margoliash, 2018).

Si bien la aplicación de estas técnicas con fines terapéuticos no ha sido completamente exitosa, algunos intentos con buenos resultados nos permiten seguir siendo optimistas. A continuación, revisaremos algunas de las aplicaciones clínicas de este tipo de intervenciones (ver Beckers & Kindt, 2017 para una revisión más completa).

Para Kindt (2018), las memorias de miedo son fuertes, y resistentes a ser olvidadas, por lo que pueden llevar a patologías que se podrían beneficiar de la disrupción de la reconsolidación de estas memorias. Para este autor, la reconsolidación ofrece una ventana de tiempo en la que se pueden intervenir a estas memorias, constituyendo un tratamiento revolucionario para los trastornos emocionales. El problema es que, si bien este abordaje funciona adecuadamente en experimentos de laboratorio, los parámetros a utilizar no pueden ser bien controlados en la práctica clínica.

Como se mencionó anteriormente, las intervenciones de eliminación de recuerdos pueden ser especialmente útiles para el tratamiento del trastorno por estrés postraumático, por lo que hay diversos estudios que abordan el tema de la eliminación de memorias de miedo o recuerdos traumáticos. Schiller et al. (2010) ofrecen evidencia de que memorias de miedo pueden ser modificadas por memorias neutrales durante la reconsolidación, permitiendo reescribir estos recuerdos, y sugieren que estos procedimientos pueden usarse con seguridad en personas humanas para trastornos de ansiedad en general. En la misma línea, Agren et al. (2012) demostraron que es posible la atenuación por reconsolidación de una memoria de miedo en la amígdala humana, y Kindt, Soeter y Vervliet (2009) lograron reducir la respuesta fisiológica a los recuerdos traumáticos en sujetos humanos mediante técnicas similares.

Giustino et al. (2016) sugieren que el bloqueo de la reconsolidación con propanolol es efectivo como un agente reductor del miedo, por lo que puede prevenir al trastorno de estrés postraumático. Esto sería en parte porque la norepinefrina es un neurotransmisor que ha sido identificado como un componente fundamental de la sintomatología de este trastorno.

Taherian et al. (2014), sugieren que la efectividad de la intervención con propanolol no es limitada por la antigüedad de la memoria, conclusión a la que llegan mediante experimentos con modelos animales. Sin embargo, aún es ambiguo cómo es que este tipo de intervenciones con este fármaco ejercen sus efectos, si es modulando la reconsolidación o la extinción, y

proponen que sus efectos podrían darse mejorando el aprendizaje de la extinción debido a que reduciría la señalización noradrenérgica que es elevada bajo condiciones de estrés (Giustino et al., 2016).

Lo que sí queda claro es que la intervención es efectiva para reducir recuerdos negativos en sujetos sin patología (Lonergan, Olivera-Figueroa, Pitman & Brunet, 2013). Sin embargo, es posible que esto no se deba a la eliminación o debilitación de los recuerdos, sino a la modificación de la valencia emocional asociada al recuerdo negativo, lo cual sería efectivo también en el tratamiento de los trastornos mencionados anteriormente (Villain et al., 2016).

Por otro lado, como se mencionó anteriormente, la disrupción de la reconsolidación se ha propuesto como una alternativa terapéutica prometedora para las adicciones, lo que funcionaría eliminando las asociaciones de consumo con contextos específicos que pueden producir recaídas (Dennis & Perroti, 2015; Lee et al., 2009; Wouda et al., 2010). Si bien esta propuesta no ha sido investigada a profundidad, hay varios fármacos que han demostrado ser efectivos en modelos animales, como la D-cycloserina (Lee et al., 2009) y la rapamicina, que resultó efectiva en ratas en experimentos sobre la dependencia a morfina, alcohol y cocaína (Lin et al., 2014). De la misma forma, el propranolol parece ser efectivo para eliminar memorias asociadas al consumo de alcohol (Wouda et al., 2010). Si bien este tema resulta prometedor, aún no se han realizado estudios suficientes, por lo que se sugiere seguir investigando en esta línea.

Además de las técnicas que se valen de los procesos de reconsolidación de la memoria, hay otras propuestas que buscan desarrollar protocolos para eliminar memorias. Por ejemplo, Han et al. (2009) eliminaron una memoria de forma selectiva mediante la ablación de las neuronas que la conformaban, logrando la eliminación de una memoria de miedo de forma robusta y permanente. Esto se logró identificando a las neuronas de la amígdala lateral de roedores que

eran activadas por la expresión de miedo (marcadas por el incremento de cAMP), las cuales fueron eliminadas mediante una estrategia que se valía del uso de una toxina de difteria. De acuerdo con los autores, este procedimiento pudo eliminar la memoria, mientras que la ablación de una cantidad similar aleatoria de neuronas en la misma región de la amígdala no tuvo el mismo resultado. El problema de este enfoque está en la pérdida de células. Sin embargo, una propuesta de Glannon (2017) podría resultar en mayor efectividad.

Este autor sostiene que uno de los retos para la eliminación de memorias mediante agentes farmacológicos está en la selectividad de la intervención, y sostiene que una buena alternativa podría realizarse mediante estimulación eléctrica profunda. Este tipo de estimulación ya ha sido utilizada con éxito para otros propósitos, como en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson (Mehana & Lai, 2013) o de la depresión (Mosley, Marsh & Carter, 2015), sin embargo, en este caso se requiere que la localización de la estimulación sea más discreta y precisa (Glannon, 2017). Esta localización podría realizarse mediante otros métodos de neuroimagen. De cualquier forma, Glannon (2017) sostiene que esta alternativa continúa siendo puramente especulativa. Si bien aún no se ha puesto a prueba, podría significar un gran avance en el desarrollo de este campo de investigación.

#### 4.3 Creación (implante) de memorias

El implante de recuerdos o creación de falsas memorias ha sido el área menos explorada dentro del campo de manipulación de la memoria. Sin embargo, hay intentos importantes que han tenido buenos resultados.

Garner et al. (2012), crearon una memoria de miedo en ratones mediante la generación de una huella de memoria “sintética”. Para esto, se utilizaron ratones transgénicos en los que un receptor hM3Dq era expresado dependiendo de la actividad del trans-gen de tetraciclina

regulado por un promotor de c-FOS, el cual se expresa en relación directa con la actividad neuronal. El receptor hM3Dq es asociado a proteínas G y responde de manera selectiva a la clozapina-N-óxido (CNO), induciendo la despolarización de neuronas piramidales. De esta manera, los ratones expresan estos receptores en las neuronas que están lo suficientemente activas como para inducir el promotor de c-FOS, las cuales podrán ser posteriormente activadas de forma selectiva por la CNO. Dado que la expresión de los receptores hM3Dq se requiere solo en contextos específicos, su expresión se puede bloquear con doxiciclina (Dox). A esta técnica se le llama “DREADDS”, por sus siglas en inglés, y se traduce como “receptores de diseño activados específicamente por drogas de diseño” (ver Roth, 2016 para una buena introducción).

Lo que hicieron estos autores fue exponer a los animales a un contexto A para “marcar” las neuronas activadas en ese contexto. Posteriormente, se les administró Dox para evitar la marcación de nuevas neuronas y fueron sometidos a un condicionamiento aversivo en un contexto B. 24 horas después, se administró CNO para activar las neuronas que representaban el contexto A cuando los animales estaban en el contexto B, donde tuvieron el condicionamiento aversivo. Lo que sucedió fue que los animales formaron una representación híbrida, la cual incorporaba partes de la estimulación artificial producida por la CNO (del contexto A) y la estimulación natural de la información sensorial provista por el contexto B, de forma que los animales aumentaron la conducta de freezing (que manifiesta miedo por el condicionamiento aversivo) cuando estaban en el contexto B y eran estimulados con CNO. Esto sugiere que la actividad producida por la estimulación artificial fue incorporada a la representación del contexto B, lo que habría creado una memoria artificial.

Otros intentos más elegantes y selectivos son los desarrollados por el grupo dirigido por Susumu Tonegawa en el Massachusetts Institute of Technology, en donde aplican técnicas de optogenética a la manipulación de memorias. Estas técnicas permiten la activación o

inhibición de neuronas mediante la inserción de canales de membrana que son sensibles a diferentes ondas de luz (dado que tienen rodopsina, una proteína sensible a la luz), lo cual se logra modificando el ADN de estas células mediante un virus, entre otras opciones (Adam, Hajdu, Nagy & Viczian, 2015). Esto permite que, al dirigir un haz de luz a las neuronas previamente modificadas para expresar estos canales, estas células se activen (para esto se requiere una cirugía para implantar los LED que proporcionarán la luz).

En el año 2013, este grupo utilizó una metodología similar a la de Garner et al. (2012) para marcar ciertas células del hipocampo activas en un contexto (utilizaron ratones transgénicos que permitían usar transactivador de tetraciclina y doxiciclina para inhibir la transcripción), pero en lugar de que estas células expresen receptores de fármacos, incorporaron canales sensibles a la luz que permitían la posterior activación selectiva de estas células (Ramirez et al., 2013). Los animales fueron expuestos a un contexto A mientras estaban en abstinencia de Dox (de forma que se pudieran expresar los genes requeridos para insertar los canales sensibles a la luz), y al día siguiente fueron expuestos a un condicionamiento aversivo en un contexto B mientras que las células marcadas en el contexto A eran estimuladas (se puede observar el parecido con el experimento de Gardner et al., 2012). Esto resultó en que al evaluar el comportamiento de los animales nuevamente en el contexto A, estos tenían conductas de miedo (freezing) que se hubieran esperado para el contexto B, lo que significa que las células marcadas en el contexto A fueron capaces de producir un condicionamiento en el que se asociaron a las conductas de miedo adquiridas en el contexto B. De acuerdo con los autores del estudio, estos datos demuestran que es posible generar una memoria de miedo artificialmente. Además, sostienen que Garner et al. (2012) no pudieron obtener los mismos resultados por la naturaleza más difusa y menos precisa temporalmente de su intervención mediante fármacos y receptores sintéticos (ver Liu, Ramirez & Tonegawa, 2014 para una revisión contextualizada de estos experimentos).

Este mismo grupo demostró, posteriormente, que la manipulación de engramas marcados en diferentes contextos podrían tener una relevancia terapéutica. En un grupo de ratones, por ejemplo, demostraron que, al activar la huella de memoria marcada durante una experiencia positiva, podían reducir la sintomatología depresiva en ratones expuestos a estrés (Ramirez et al., 2015).

Un enfoque distinto a los anteriores fue el de crear memorias durante el sueño, lo que se logró mediante una interfaz entre células de lugar cuya actividad era registrada por electrodos de profundidad, y un electrodo de estimulación localizado en el haz prosencefálico medial de una muestra de ratones, con el objetivo funcionar como un reforzador (estimulación de placer). El estudio fue llevado a cabo por De Lavilleon, Lacroix, Rondi-Reig y Benchenane (2015), siendo este último el director del grupo. Lo que hicieron fue que un grupo de ratones conozca un campo abierto, en donde fueron registradas las células de lugar que se activaban en cada espacio del campo, para lo cual fue necesaria una cirugía para implantar electrodos en el hipocampo, al igual que en el área a estimular. Posteriormente se escogió aleatoriamente un “place field” correspondiente a una célula de lugar, y se montó un sistema para que, durante el sueño, cada vez que la célula de lugar escogida se activara, se estimulara automáticamente el haz prosencefálico medial, produciendo una sensación de placer, o al menos funcionando como reforzador durante el sueño. El resultado de esta intervención fue que, al despertar, los ratones preferían el área que había sido escogida para ser reforzada durante el sueño. Esto demostró que se pueden crear memorias (de preferencia de un lugar, en este caso) durante el sueño.

Además de los experimentos descritos hasta el momento, hubo un intento muy interesante que se llevó a cabo con sujetos humanos que pretendía generar una memoria durante el sueño (Arzi et al., 2012). Para esto, usaron las respuestas olfatorias que ocurren naturalmente en las personas, las cuales son más fuertes cuando se les presenta un estímulo olfatorio agradable y

menos fuertes cuando el estímulo es poco placentero. Lo que hicieron fue asociar distintos olores con diferentes tonos mientras las personas dormían, y posteriormente midieron las respuestas olfatorias que ocurrían tras la exposición a los estímulos auditivos durante la misma noche de sueño y al despertarse. Lo que encontraron fue que el condicionamiento durante el sueño había sido exitoso, demostrando que los seres humanos pueden aprender mientras duermen. Cabe resaltar que este estudio se limitó a explorar este procedimiento con aprendizaje por condicionamiento, el cual es más sencillo de realizar que tareas verbales o de memoria explícita. Sin embargo, el aprendizaje por condicionamiento también genera una memoria, por lo que, técnicamente, se creó una memoria durante el sueño en humanos.

Si bien hay pocos estudios en neurociencias que han procurado implantar memorias, hay que resaltar que desde el campo de la psicología hay una línea de investigación consolidada que ha logrado resultados sorprendentes. Estos estudios han sido encabezados por la investigadora Elizabeth Loftus, y han demostrado que mediante diferentes protocolos comportamentales se puede lograr que una persona tenga un recuerdo de una experiencia que jamás ocurrió, como que se perdieron en un mall cuando eran niños, o que se ahogaron y fueron rescatados por un salvavidas, haber presenciado una posesión demoniaca, entre otros (Loftus, 1999; Loftus, 2017). Estos estudios permitieron caer en cuenta de que la memoria es un sistema frágil que puede fallar, por lo que llevaron a que se reconsidere el valor de las testimonios basadas en la memoria en casos penales, o el fenómeno de la represión dentro de las terapias psicológicas (Loftus, 1996).



## CONCLUSIONES

La manipulación de memorias abarca una variedad de procesos que han demostrado tener beneficios potenciales importantes para enfermedades neurológicas y psiquiátricas, además de contribuir a la generación de conocimiento sobre el funcionamiento del cerebro. Esto apunta a que se debe profundizar en el campo y promover las investigaciones relacionadas al mejoramiento de la memoria, así como a procedimientos de modificación, eliminación e implante de memorias. A pesar de fomentar un especial interés en el público general, el área menos explorada hasta el momento ha sido el de la creación sintética de memorias (implante de memorias), aunque se espera que progrese significativamente en las próximas décadas. En esta revisión, se recopila información acerca del estado del arte de este campo, brindando una introducción al estudio de la memoria y su manipulación desde las neurociencias.

## CAPÍTULO 5: PROPUESTA DE INVESTIGACIÓN

### CREACIÓN DE UNA MEMORIA DE PREFERENCIA DURANTE EL SUEÑO MEDIANTE LA REACTIVACIÓN DE UNA MEMORIA DE CONTEXTO MEDIANTE ESTÍMULOS AUDITIVOS Y ESTIMULACIÓN EN EL HAZ PROSENCEFÁLICO MEDIAL

#### RESUMEN

La manipulación de la memoria es un campo emergente en las neurociencias. En la última década se han logrado avances importantes en procedimientos de mejoramiento de la memoria, de “implante” de recuerdos y de borrar recuerdos o modificarlos artificialmente. En lo que refiere a la creación de memorias en ausencia de experiencia, los procedimientos utilizados complejos y costosos. Presento una propuesta para la creación de una memoria de preferencia durante el sueño, basada en el estudio de De Lavilléon, Lacroix, Rondi-Reig, y Benchenane (2015). Esta propuesta busca lograr los mismos resultados mediante el uso de técnicas menos invasivas y más sencillas. Se pretende obtener estos resultados aprovechando estímulos ambientales que reemplazarán grandes cantidades de electrodos implantados en el cerebro y sistemas complejos de interfaces cerebro-cerebro.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La manipulación de memorias es un campo de reciente aparición, que hasta el momento ha permitido el desarrollo de procedimientos experimentales para mejorar o impedir la consolidación de la memoria, borrar memorias o implantarlas (creación de falsas memorias (Spiers & Bendor, 2014). Estas técnicas tienen múltiples posibles beneficios para enfermedades como la de Alzheimer, trastorno por estrés post-traumático, trastornos de ansiedad, fobias, adicciones, entre otras (Dennis & Perrotti, 2015; Elsey & Kindt, 2016; Kindt, Soeter & Vervliet, 2009; Sandkuhler & Lee, 2013).

Dentro del campo de manipulación de la memoria, la creación de falsas memorias ha sido un tema investigado por medio de diferentes técnicas, como optogenética (Liu, Ramirez & Tonegawa, 2014; Ramirez et al., 2013), receptores de diseño exclusivamente activados por una droga de diseño “DREADDs” (Gardner et al., 2012), o la creación de memorias durante el sueño por medio de interfaces que requieren del registro de una gran cantidad de células y de la estimulación profunda coordinada de otras áreas (Lavilleon, Lacroix, Rondi-Reig & Benchenane, 2015). Todos estos procedimientos son en la actualidad invasivos y costosos. Ante este panorama, surge la necesidad de encontrar métodos más sencillos y menos invasivos que permitan facilitar el desarrollo de esta línea de investigación, que además de contribuir al conocimiento de los sistemas de memoria en el cerebro (ciencia básica), tiene el potencial para resultar en tecnologías que faciliten el tratamiento de algunas enfermedades que involucran un deterioro en la formación de memorias, así como en tecnologías para optimizar aprendizaje.

Una alternativa a la espera de ser probada es la aplicación de procedimientos de reactivación de memorias mediante estímulos durante el sueño para la creación de memorias. Estas técnicas han demostrado ser efectivas para mejorar el proceso de consolidación de la

memoria durante el sueño tanto en estudios con sujetos humanos (Antony et al., 2012; Rasch, 2007; Rudoy et al., 2009; Seibold et al., 2017), como en animales (Bendor & Wilson, 2012); y se lograron mediante el uso de estímulos olfatorios (Rasch, 2007, Seibold et al., 2017) y auditivos (Antony et al., 2012; Bendor & Wilson, 2012; Rudoy, 2009; ver Schouten et al., 2016 para una revisión).

Si bien estos estudios demuestran que los estímulos tienen un efecto en el cerebro dormido, solo han sido orientados a mejorar la consolidación de la memoria. Hasta el momento no se ha tenido en cuenta la opción de utilizar estas técnicas para crear nuevas asociaciones durante el sueño, que es un estado del cual se podría tomar ventaja debido a que las memorias pueden ser fácilmente modificadas durante este (Spiers & Bendor, 2014). Por este motivo es que proponemos indagar si es posible utilizar la reactivación de memorias con estímulos auditivos durante el sueño para crear nuevas falsas memorias mediante la asociación de una memoria reactivada (por un sonido previamente asociado a un lugar en un laberinto) y estimulación cerebral profunda para inducir una sensación placentera mientras los animales duermen, de forma que luego se pueda comprobar su efectividad en una tarea de preferencia de lugar durante la vigilia. De resultar como se espera, esta alternativa podría constituirse como un procedimiento para investigaciones futuras en el campo de creación de falsas memorias o implante de memorias durante el sueño.

## PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

Por lo expresado anteriormente, es que este proyecto pretende responder a la siguiente pregunta:

¿Es posible crear una memoria de preferencia durante el sueño mediante el acople de la reactivación de una memoria de contexto por medio de estímulos auditivos y estimulación en el haz prosencefálico medial de ratas?

## OBJETIVOS

### Objetivo general

Determinar si es posible crear una falsa memoria de preferencia de lugar durante el sueño en ratas mediante el acople de la reactivación de una memoria de contexto mediante estímulos auditivos y estimulación en el haz prosencefálico medial.

### Objetivos específicos

- Elaborar un protocolo de estimulación cerebral profunda para ser utilizado como refuerzo durante el sueño no-rem de ratas.
- Elaborar un protocolo para asociar un sonido específico con un lugar en un campo abierto.
- Determinar si es posible asociar un estímulo de refuerzo mediante estimulación cerebral profunda a una memoria de lugar reactivada, de forma que posteriormente se evidencie un cambio comportamental en vigilia.

## DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

### METODOLOGÍA

#### Diseño experimental

Se trata de un diseño pre-experimental intra-sujeto, donde se toman diferentes medidas a lo largo del tiempo en cada sujeto experimental, de forma que se permita una comparación pre/post. El grupo experimental será constituido por 5 animales ( $n=5$ ), el cual se determinó en base a un estudio similar que logró los resultados que busca obtener este proyecto (Lavilleon et al, 2015). Adicionalmente, se utilizará 3 animales como controles ilustrativos que serán divididos en 2 “grupos control”, los cuales se describen más adelante.

#### Animales

Se utilizará 8 ratas macho de la cepa Wistar, criadas en el Laboratorio de Neurociencia y Comportamiento de la Universidad de los Andes y provenientes del Instituto Nacional de Salud de Colombia. Los animales tendrán 300 gramos de peso al comenzar el experimento y serán alojados en cajas individuales, donde tendrán acceso a comida (*Zeigler*) y agua *ad libitum*. Las salas de alojamiento de los animales tendrán un ciclo de luz/oscuridad de 12 hs con luz encendida desde las 2pm, ocurriendo el encendido y apagado de luces de forma gradual durante una hora, temperatura controlada a  $23 \pm 2$  grados centígrados y humedad al 57%. Todos los procedimientos que se realizarán con los animales serán aprobados por el comité de ética animal (CICUAL) de la Universidad de los Andes.

## Procedimientos

### Manipulación de los animales

Todos los animales serán manipulados durante 3 días antes de empezar el experimento, de forma que estén familiarizados con los experimentadores y se evite estrés innecesario. El procedimiento de habituación consistirá en retirar a los animales de sus cajas de alojamiento, situarlos en uno de los brazos del experimentador (brazo en contacto con el cuerpo en ángulo recto) y permitir la exploración del animal. Seguidamente se pasa la mano por su espalda, desde la cabeza hasta el inicio de la cola, siempre en la misma dirección por un tiempo de 5 minutos diarios. Pasado este tiempo, los animales serán devueltos a sus respectivas cajas de alojamiento.

### Cirugía de implante de electrodos

Los animales serán anestesiados con pentobarbital sódico (75mg/kg, intraperitoneal), que se inyectará después de 25 minutos de haber administrado atropina (0.4 mg/kg, subcutánea). Se esperará a que los animales pierdan reflejo corneal y medulares para iniciar la cirugía. Se implantará un electrodo de profundidad en el haz prosencefálico medial en las coordenadas AP: -3.8, ML:1,7 y DV: -8.8 con referencia a bregma, el cual será de acero inoxidable y aislado por una fina capa de cianoacrilato. Adicionalmente, se implantará un electrodo que servirá como ánodo para la estimulación intracerebral (AP: +1.0 ML: +1.8) y dos electrodos para registro electroencefalográfico sobre los lóbulos frontal y parietal izquierdos (AP: +1.0 ML: -2.0; y AP: -6.0 ML: -2.0). El electrodo de referencia y tierra para el registro encefalográfico será colocado sobre el cerebelo, en el hemisferio contralateral a los electrodos de registro (AP: -12.5, ML: +2.0). Los electrodos corticales de registro o ánodo de estimulación consisten en tornillos de acero inoxidable, los cuales son colocados sobre la

duramadre y anclados al cráneo. Al finalizar la cirugía se administrará meloxicam (1 mg/kg, subcutáneo), al igual que en los días posteriores a la cirugía en caso los animales mostraran signos de dolor o incomodidad. Se esperará 4 días desde la cirugía para continuar con el experimento, de forma que los animales puedan recuperarse adecuadamente.

#### Tarea de *nose-poke* para establecer parámetros de estimulación de placer

El objetivo de este procedimiento es establecer parámetros de estimulación eléctrica intracerebral que produzcan una respuesta óptima con la menor intensidad de corriente posible. Después de conectar el estimulador eléctrico (*Grass S88X, Astro-Med, Inc. USA*) a los animales, se les colocará en un ambiente especialmente diseñado para la tarea de *nose-poke*, el cual consta de una caja de 20cm x 25cm de base y 25cm de altura, con 3 agujeros (2cm de diámetro, a 3.5cm del suelo) localizados en diferentes paredes de la caja. Uno de estos agujeros (agujero de estimulación) cuenta con un sensor infrarrojo y un circuito adaptado a un Arduino nano (*Arduino, Italia*) que permite cuantificar el porcentaje de tiempo que los animales introducen su nariz en el agujero en un intervalo de tiempo determinado, y los otros dos sirven como controles, de forma que se pueda observar qué porcentaje del tiempo en el agujero de estimulación se debe a la exploración natural de los animales y no al refuerzo obtenido por estimulación intracerebral. Sobre el agujero de estimulación hay un distintivo que consiste en un punto blanco, que permitirá diferenciarlo fácilmente de los otros agujeros. Una vez en la caja, se procederá a estimular eléctricamente a los animales cada vez que introduzcan su nariz en el agujero de estimulación, con cual se realizará con los parámetros siguientes: Estimulación catódica de 0.1s, con pulsos rectangulares de 0.1ms a 120Hz, comenzando en una intensidad de 50uA. En caso de no observar una respuesta (aumento de los intentos de introducción de la nariz de los animales en el agujero de



estimulación o tiempo dentro del agujero), se irá aumentando la intensidad de la corriente de estimulación de 20 en 20uA. Mientras los animales permanezcan con la nariz introducida en el agujero, la estimulación se realizará cada 1s. La sesión se dará por terminada cuando los animales mantengan introducida su nariz en el agujero de estimulación el 80% del tiempo en un intervalo de 40 segundos, lo cual será indicado por un LED activado por el circuito basado en Arduino. A fin de no producir estrés en los animales, la sesión de establecimiento de parámetros de estimulación no durará más de 40 minutos, después de los cuales los animales serán devueltos a sus cajas de alojamiento. En caso de no haberse establecido los parámetros en este tiempo, se realizará otra sesión después de un intervalo de al menos 4 horas. Si se observara alguna conducta anómala en los animales, la sesión será suspendida inmediatamente y los animales retirados del experimento.

#### Registro electroencefalográfico en sueño

Se realizará el registro electroencefalográfico durante el periodo de sueño de los animales (periodo de luz encendida). Se utilizará un filtro notch de 60Hz, y se amplificará la señal 100x (W16, Multichannel Systems). Los electrodos situados sobre los lóbulos frontal y temporal registrarán la actividad en estas áreas, usando como referencia y tierra al electrodo situado sobre el cerebelo. La señal será adquirida y almacenada mediante el software MC Rack (*Multichannel Systems*) de forma que quede a disposición de la comunidad científica en caso fuera requerida.

#### Efectos de la estimulación cerebral profunda del haz prosencefálico medial en el sueño

Dado que el objetivo del proyecto es generar una memoria durante el sueño, se requiere demostrar que la estimulación no despierta a los animales. Una vez que el registro

electroencefalográfico muestre que los animales estén en sueño de ondas lentas, se estimulará el haz prosencefálico medial con los parámetros previamente establecidos en la tarea de *nose-poke*. Esta estimulación en sueño se repetirá 100 veces. Para establecer que los animales están en sueño de ondas lentas, se requerirá la observación de ondas delta (0.5 – 4 Hz) en los canales de registro frontal y parietal, el cual debe corresponder a inmovilidad en el animal. Una vez finalizado este procedimiento, los animales continuarán durmiendo conectados por una hora, a manera de habituación para procedimientos en sueño posteriores.

#### Registro basal de preferencia de lugar y asociación estímulo auditivo-contexto

Constará de dos sesiones, las cuales se realizarán el mismo día con un intervalo de 3 horas aproximadamente y en el campo de preferencia de lugar. Este campo consta de una caja rectangular de 90cm de largo por 22cm de profundidad y 30cm de altura, la cual está dividida en 3 espacios, de 40 cm los de los lados, y un espacio central de 10cm. Cuenta con una tapa que impide el escape de los animales, y los espacios de los extremos (en adelante llamados “contextos”) tienen líneas verticales o puntos en color negro, dependiendo del contexto, de forma que sea más fácil para los animales diferenciar los contextos. En la sesión 1, los animales serán colocados en el centro del campo de preferencia de lugar y se les permitirá explorar libremente por 15 minutos (medida basal de preferencia), posteriormente, serán confinados a los contextos mediante el cierre de una puerta tipo guillotina. Estos confinamientos tendrán una duración de 5 minutos cada uno, y se realizarán 2 en cada contexto de forma intercalada, por lo que la sesión completa tendrá una duración de 35 minutos. Durante el confinamiento, cuando los animales se encuentren en el contexto de menor preferencia, se reproducirá el estímulo auditivo (5-20kHz, 40dB, 0.8s) cada 4 segundos, con la finalidad de que se forme una asociación entre el contexto y el sonido que permita

activar la memoria del contexto asociado durante el sueño (la evaluación de preferencia basal se realizará durante la misma, a fin de poder saber cuál fue el contexto de menor preferencia apenas terminen los 15 minutos de exploración). La segunda sesión contará únicamente de confinamientos, realizándose 3 sesiones en cada contexto de forma intercalada. Al igual que en los confinamientos de la sesión 1, el estímulo auditivo será reproducido bajo los mismos parámetros en el contexto escogido para la asociación (contexto de menor preferencia basal).

#### Asociación memoria de contexto reactivada-placer

Este procedimiento se realizará en la caja de alojamiento de cada animal, durante el periodo de sueño. Los animales serán conectados a un sistema de adquisición y amplificación de señales con los parámetros ya establecidos (descrito previamente), de forma que se observen las señales de los canales correspondientes a electroencefalografía de lóbulos frontal y parietal. Cuando los animales se encuentren en sueño de ondas lentas, se procederá a estimular el haz prosencefálico medial (con los parámetros establecidos para cada animal) de forma simultánea con la reproducción del estímulo auditivo previamente asociado al “contexto asociado a sonido”. Dado que el estímulo auditivo tiene una duración de 0.3s más que la estimulación, se intentará que este estímulo sea reproducido instantes (0.3s aproximadamente) antes que se active el estimulador, de forma que se deje una ventana de tiempo que podría ser necesaria para el procesamiento sensorial del estímulo auditivo y ambos estímulos finalicen simultáneamente. Este procedimiento se realizará a los 5 segundos de que los animales hayan entrado en sueño de ondas lentas, y se repetirá cada 10 segundos mientras los animales permanezcan en este estado de sueño. Se repetirá el proceso hasta estimular 100 veces. El tiempo que tomará realizar el procedimiento completo será cuantificado para cada animal, aunque se espera que no demore más de 3 horas. Es

importante realizar esta actividad en las primeras horas de sueño de los animales, dado que es donde se observa mayor cantidad de sueño de ondas lentas.

#### Evaluación de preferencia de lugar post asociación en sueño

Se colocará a los animales en el centro del campo de preferencia de lugar y se les permitirá explorar libremente por 15 minutos mientras que se registra su comportamiento en video con una cámara situada en el techo de la sala experimental donde se realizará la evaluación. Una vez terminado este tiempo, los animales continuarán otros 15 minutos en el campo, pero el sonido asociado previamente será reproducido en el contexto respectivo.

#### Perfusión transcárdica

Una vez terminados los experimentos, se anestesiara a los animales con una dosis intraperitoneal de pentobarbital sódico (100 mg/kg) y se perfundirán por vía intracárdica. Se usará solución salina (NaCl al 0.9%) y formol (3.7%) para limpiar a sangre y fijar los tejidos. Los cerebros serán retirados para su posterior corte y análisis histológico para determinar la posición final de los electrodos de estimulación.

Cuadro de operacionalización de variables

Variable	Indicador
Preferencia de lugar basal.	Porcentaje de tiempo transcurrido en cada contexto del campo de preferencia de lugar antes de iniciar el procedimiento de asociación estímulo auditivo-contexto.
Memoria de preferencia de lugar generada durante el sueño mediante reactivación de la memoria de contexto.	Porcentaje de tiempo transcurrido en cada contexto del campo de preferencia de lugar después de asociación memoria reactivada-placer en sueño.
Memoria de preferencia de lugar generada durante el sueño mediante reactivación de la memoria de contexto + evaluación de posible asociación sonido-placer en sueño.	Porcentaje de tiempo transcurrido en cada contexto del campo de preferencia de lugar después de asociación memoria reactivada-placer en sueño, en presencia de estímulo auditivo (reproducido únicamente cuando el animal se encuentra en el contexto de asociación).

### “Controles” ilustrativos

Estimulación en vigilia (n=1): En este caso, los procedimientos serán realizados al igual que en el grupo experimental, con la excepción de que, en vez de recibir estimulación en sueño, el animal será estimulado en vigilia en el contexto de menor preferencia en la línea base. Esta estimulación se realizará en intervalos de 9 segundos, por un tiempo total de 15 minutos. Esto permitirá tener un dato ilustrativo sobre los efectos de la estimulación eléctrica de placer en la preferencia de lugar en vigilia. Esta estimulación se realizará el día anterior a la evaluación, una vez terminadas las sesiones de asociación sonido-contexto.

Estimulación en sueño sin estímulo auditivo (n=2): En este caso, los procedimientos serán iguales a los del grupo experimental, con la diferencia de que los parlantes serán desconectados durante la fase de asociación memoria de contexto reactivada-placer en sueño (nótese que no habrá reactivación de memoria en esta fase).

Cronograma por sujeto experimental

Día	Actividad
1, 2 y 3	Manipulación
4	Cirugía de implante de electrodos
5, 6 y 7	Recuperación
8	Fijar parámetros de estimulación intracerebral de placer ( <i>nose-poke</i> ). Registro de señales electroencefalográficas
9	Periodo de oscuridad: Sesiones de evaluación de preferencia de lugar basal y asociación estímulo auditivo-contexto.  Periodo de luz encendida: Asociación memoria de contexto reactivada-placer
10	Evaluación de preferencia de lugar post asociación memoria de contexto reactivada-placer en sueño.  Perfusión transcárdica.

### Análisis estadístico de datos

Se comparará los resultados obtenidos en la prueba de preferencia de lugar de los animales del grupo experimental antes y después de los procedimientos de asociación estímulo auditivo-contexto, y memoria de contexto reactivada-placer, de manera que se podrá observar si se logra un cambio en la preferencia de lugar inducida por estos procedimientos.

Adicionalmente, se comparará los resultados basales con los obtenidos después de los procedimientos, pero en presencia del estímulo auditivo asociado, a manera de conocer si además de la asociación memoria de contexto reactivada-placer esperada, ocurre una asociación entre el estímulo auditivo y la sensación placentera que propicie la búsqueda del sonido en el campo de preferencia de lugar. En ambos casos se utilizará una prueba no paramétrica (Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon), ya que el tamaño de la muestra no es suficiente para cumplir con los criterios requeridos para realizar pruebas paramétricas.

Adicionalmente, se medirá el tamaño del efecto.



## CAPÍTULO 6: METODOLOGÍA PROPUESTA

### 1. Fabricación de los electrodos

El protocolo experimental requiere de 2 electrodos de registro, uno frontal y uno parietal, así como un electrodo de referencia que permita el registro. Adicionalmente, para la estimulación profunda son requeridos el cátodo (electrodo de profundidad) y un electrodo que actúe como ánodo, que se localiza en el cráneo y en contacto con la duramadre, al igual que los electrodos de registro.

Para facilitar el procedimiento quirúrgico y para garantizar el funcionamiento de los electrodos, se diseñó el montaje de estos como se describe a continuación:

Como electrodos de registro, referencia y ánodo, se definieron tornillos de anteojos comunes, dado que tienen una buena conductividad y permiten fijar el casco de acrílico con firmeza, por lo que cumplen una doble función. Este tipo de tornillos han sido utilizados previamente en el laboratorio, obteniendo buenos resultados. Los tornillos son soldados por la parte inferior de la cabeza del tornillo a cables de bovina (un cable por tornillo) que son a su vez soldados a pines de un conector Berg macho de 3x2, que guarda una distribución que se describirá posteriormente (ver Registro Fotográfico en el ANEXO 2).

Si bien puede ser complicado soldar los tornillos por su pequeño tamaño, la parte más compleja de la preparación de los electrodos consiste en aislar un *insect pin*, para que sirva como electrodo de profundidad. El protocolo estandarizado en el Laboratorio consiste en sumergir el electrodo en barniz, con ayuda de una torre de dispositivo de cirugía estereotáxica, retirar el electrodo lentamente (esto toma alrededor de 5 minutos, lo cual evita imperfecciones en el aislamiento), y calentarlo en un horno a 60° por 50 minutos. El proceso debe repetirse alrededor de 8 veces para garantizar que el electrodo quede bien aislado.

Dado que fabricar los electrodos de profundidad con el método establecido toma mucho tiempo, se decidió invertir tiempo en encontrar una alternativa más rápida y menos laboriosa, que a largo plazo resultaría en un ahorro considerable de tiempo. Después de probar otros materiales aislantes como epóxido y distintos tipos de pegamento, de diferentes formas y en una variedad de circunstancias (temperatura, velocidad de aplicación, etc.), se observó que el cianoacrilato (comercializado como pegante, “super bonder”, “triz”, entre otras marcas) es un buen aislante cuando está seco. El problema se encuentra en que, para que se solidifique, tiene que estar en contacto con un material que produzca la reacción química para el secado, y el *insect pin*, de acero inoxidable, no es un material que induzca la reacción.

Después de muchos ensayos, se determinó que se puede utilizar agua como solución para inducir la reacción del pegante, de forma que para aislar el electrodo se procede de la siguiente manera: Se aplica una gota de cianoacrilato sobre el *insect pin* distribuyéndola a lo largo de toda la superficie del objeto que se desea aislar. Posteriormente, sin hacer uso de la torre para cirugía estereotáxica, se introduce el *insect pin* en agua por alrededor de 10 segundos, hasta que tome un color blanquecino. Finalmente, se retira el objeto del agua con cuidado de no dañar la uniformidad del material aislante con el pegante que queda flotando en el agua por el lugar por donde se introdujo el electrodo. De la forma descrita, se pueden aislar electrodos en menos de un minuto, lo que contrasta drásticamente con las muchas horas del otro método.

Se probó la capacidad aislante del cianoacrilato mediante electrólisis en agua, posteriormente cerrando un circuito de 5V a través el electrodo en clara de huevo, y finalmente en una rata. El animal fue implantado con un electrodo de este tipo en el haz prosencefálico medial y mostró conductas de autoestimulación (proceso que se describe más adelante), demostrando la efectividad del protocolo de aislamiento del electrodo.

Una vez que se tienen los tornillos soldados y el electrodo de profundidad aislado y soldado a un pin, se distribuyen en un conector Berg. Este montaje facilita el procedimiento quirúrgico y permite el implante de un casco pequeño, reduciendo el potencial invasivo del procedimiento.

## 2. Procedimiento quirúrgico

Se diseñó el procedimiento quirúrgico más adecuado para el implante de los electrodos, de forma que los conectores se mantengan sostenidos con firmeza en el cráneo, el electrodo de profundidad sea implantado con la mayor precisión posible, y producir el menor daño en el animal y disminuir el riesgo de infecciones.

Las coordenadas de los electrodos de registro (AP: +1, ML:-2; AP:-6, ML:-2) y referencia (AP: -12.5, ML:+2) fueron determinadas a partir de la experiencia de investigadores del Laboratorio de Neurociencia y Comportamiento de la Universidad de los Andes, quienes trabajan este tipo de registros desde hace ya algunos años y han obtenido señales limpias en estas coordenadas.

Los electrodos de registro son ubicados sobre los lóbulos que se busca monitorear, y el electrodo de referencia se ubica sobre el cerebelo, en el hemisferio contralateral a los electrodos de registro, lo cual permite registrar señales más limpias. La localización del ánodo del electrodo de estimulación carece de importancia en cuanto a su función para la estimulación, por lo que se podría haber colocado en cualquier parte del cráneo. Sin embargo, se definieron las coordenadas AP:+1, ML:+2 para que el electrodo cumpla una función de sostén del casco de acrílico, al triangular efectivamente la fuerza que podría ejercerse sobre el casco con los otros electrodos. La determinación de la coordenada del electrodo de estimulación se describe en el apartado siguiente.

También fue necesario determinar las sustancias que se usarían como anestesia y las dosis. Se eligió pentobarbital sódico debido a su bajo costo, a que no requiere de equipos para su utilización (como es el caso de la anestesia inhalada), y a su relativa seguridad para producir una sedación profunda sin tener un riesgo alto muerte de los animales. Para los animales de 300-350 gramos a utilizarse en este proyecto, se determinó que la dosis ideal de pentobarbital es de 80mg/kg, la cual debe administrarse por vía intraperitoneal. Esta dosis deberá ser modificada en caso de tener animales con peso mayor, dada la mayor cantidad de tejido graso y la liposolubilidad del fármaco.

Para asegurar la supervivencia de los animales, se propuso utilizar atropina para impedir bradicardia excesiva y paro respiratorio. Se analizó el efecto de diferentes dosis y vías de administración (intraperitoneal o subcutánea) en cirugías terminales a partir de la información reportada en guías de preanestesia veterinaria, las cuales muestran mucha variabilidad entre ellas. Se determinó que la mejor dosis de atropina es de 0.4mg/kg, al ser administrada por vía subcutánea. Esta vía de administración evita el efecto de primer paso hepático, el cual puede modificar la biodisponibilidad de la sustancia de forma poco predecible en estos animales. La atropina se administra 20 minutos antes de la anestesia, asegurándose de esta forma su efecto, que se observa como taquicardia ligera en los animales.

En caso de que los animales no pierdan reflejos a los 15 minutos de la administración de la anestesia, se deberá poner una dosis de refuerzo del 15% de la dosis inicial, aproximadamente.

### 3. Determinación de la coordenada del haz prosencefálico medial

Si bien existe un atlas de coordenadas para cirugía estereotáxica (Paxinos & Watson, 2006), las coordenadas pueden variar ligeramente entre las diferentes cepas y diferentes laboratorios

(por factores como el peso de los animales por la alimentación brindada, por ejemplo). Por este motivo es que se realizaron cirugías terminales seguidas de perfusiones transcárdicas, a lo que siguió el corte y visualización de los cerebros para determinar si los electrodos implantados se localizaban en la estructura deseada.

Originalmente la coordenada a la que se deseaba llegar, de acuerdo al atlas era: AP: -4.3, ML: 1.7, DV: 8.2, la cual se modificó a: AP: - 3.5, ML: 1.5, DV: 8.8, para asegurar la localización del electrodo en la estructura deseada. Para esta tarea de corrección de coordenadas se utilizaron 3 ratas, cuyos cerebros fueron perfundidos con solución salina (NaCl al 0.9%) y formol al 3.7%, para posteriormente ser cortados en un vibrátomo (*Precisionary Instruments LLC*) y observados en el estereoscopio.

Las coordenadas se fueron corrigiendo sucesivamente al observar que los electrodos estaban quedando por encima del lugar requerido y en una posición anterior a la determinada.

#### 4. Determinación de las características de la estimulación eléctrica intracerebral

Para determinar las características de la estimulación eléctrica a utilizar, se construyó una caja de 20cm x 25cm y 25cm de altura, que tiene 3 agujeros en paredes diferentes. Se utilizaron 2 animales para determinar las características de la estimulación, los cuales fueron estimulados cada vez que introducían su nariz en uno de los agujeros, seleccionado por el experimentador. Una marcada respuesta de búsqueda de la estimulación denotaría que esta funciona para inducir una sensación placentera.

Las características iniciales, tomadas de Hernandez et al. (2006), consistieron en un tren a 20Hz de pulsos monofásicos de 0.1mS, con una intensidad de 200uA y duración de 0.5s, y el protocolo a seguir consistía en aumentar la frecuencia de los pulsos de 20 en 20 hz y la intensidad de la corriente (de 20 en 20 uA) hasta observar una respuesta clara de búsqueda de

estimulación en los animales. Se determinó que la estimulación a 120hz era idónea, y que 200uA producían una clara respuesta.

Sin embargo, se observó que la estimulación a 200uA despertaba a los animales cuando eran estimulados en sueño, por lo que se tuvo que reducir a intensidad a 100uA, la cual no despierta a los animales. Posteriormente, se determinó que una estimulación de esta intensidad produce una respuesta clara también. Se debe resaltar que estos parámetros podrían variar entre diferentes animales, dependiendo de la posición final del electrodo de estimulación. Es posible que se tenga que descartar alguno de los animales experimentales por no poder lograr un parámetro de estimulación que produzca una conducta de búsqueda de la estimulación significativa sin despertarlo al aplicarse durante el sueño.

La repuesta de búsqueda de la estimulación, mencionada anteriormente, se manifiesta mediante las múltiples introducciones de la nariz de los animales al agujero determinado para la estimulación, la cual se complementaba con otras conductas como rascar el piso de la caja, morder los bordes del agujero, y aumento de la conducta motriz. Estas conductas se generaron con mayor intensidad cuando fue aplicada una mayor intensidad de corriente (hasta 200 o 300 uA, o 600uA en otro sujeto del que se presume que el electrodo no quedó localizado donde debería).

Los parámetros finales son: Tren de 0.1s de duración de pulsos monofásicos de 100uS de duración a 120Hz, con una intensidad de 100uA.

## 5. Prueba de preferencia de lugar

Las medidas del campo de preferencia de lugar fueron tomadas de Lima et al. (2017). Se construyó una caja de 90cm de largo x 22cm de ancho y 30cm de altura, la cual está dividida en 3 compartimientos: dos de 40cm x 22cm a los lados, y uno central de 10cm x 22 cm. El

compartimiento central es el punto de partida para la evaluación de preferencia de lugar, y no tiene detalles distintivos. Por el contrario, los compartimientos laterales (“contextos”) cuentan con rayas verticales (2 cm de ancho, dispuestas regularmente) o puntos (1 cm de diámetro, dispuestas con 2 cm de distancia) para distinguirse entre sí. Adicionalmente, uno de los contextos cuenta con piso de *foamy*, para facilitar la discriminación. Los compartimientos están separados por paredes que cuentan con compuertas tipo guillotina, lo que permite el confinamiento de los animales para tareas de condicionamiento.

Se utilizó una primera rata para poner a prueba el campo de preferencia de lugar. Se determinó que, después de un periodo largo de exploración, aumenta considerablemente la probabilidad de escape de los animales, por lo que se construyó una tapa transparente que permita el registro en video del comportamiento. Esta tapa cuenta con agujeros para garantizar la ventilación de la caja.

Para descartar una preferencia natural hacia alguno de los contextos, se utilizaron dos ratas, a las cuales se les permitió explorar libremente por 15 minutos, e inmediatamente se repitió el proceso, pero en presencia de un estímulo auditivo que sería utilizado en el experimento. Este estímulo auditivo (60dB, 5-20kHz, 0.8s) fue reproducido cada 5 segundos, mientras los animales se encontraban en uno de los compartimientos laterales previamente escogidos por el experimentador. Las evaluaciones en el campo de preferencia de lugar se llevaron a cabo teniendo en cuenta una iluminación de baja intensidad (para no producir estrés) y homogénea (dado que las ratas prefieren lugares menos iluminados, lo cual podría haber sesgado los resultados). El objetivo de la exploración en presencia del estímulo auditivo fue descartar una aversión o atracción innata hacia el estímulo, de forma que no se sesguen los resultados por alguno de estos motivos.

A partir de los resultados obtenidos (ver tabla 1 y Figuras 1, 2 y 3), se pudo determinar que aparentemente no hay una preferencia natural hacia alguno de los contextos, y que el estímulo auditivo parece no generar aversión o atracción para los animales. Un dato interesante fue que la rata 2 dejó de explorar después de los primeros 10-15 minutos, permaneciendo en el centro del campo. Debido a esto, nunca estuvo expuesta al sonido durante la etapa de evaluación.

A partir de los resultados de la rata 1 se puede inferir que el sonido no produce ningún efecto positivo o negativo, manteniéndose como un estímulo neutral. Además, la conducta de preferencia equivalente hacia ambos contextos permanece igual en la evaluación de repetición (Figura 3). Esto es acorde con que no se observa un cambio en la conducta de los animales tras ser expuestos al sonido.

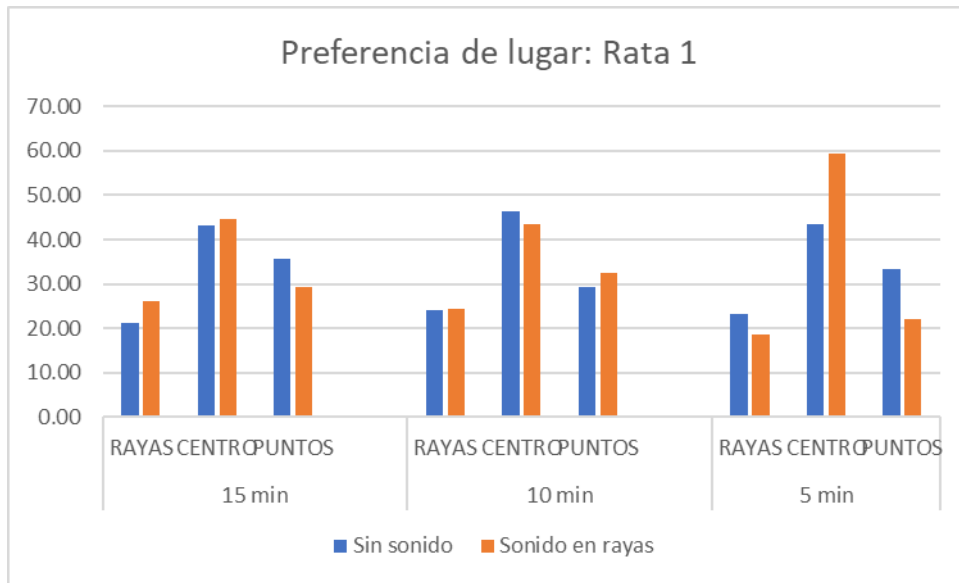
Para determinar el tiempo de evaluación idóneo, se analizaron los datos a los 5, 10 y 15 minutos, sin obtener mayores diferencias. Sin embargo, hay una clara tendencia a permanecer en el centro del campo después de haber explorado los dos contextos, lo cual se explica por la naturaleza de las ratas de buscar seguridad en un lugar más estrecho y con menor iluminación.



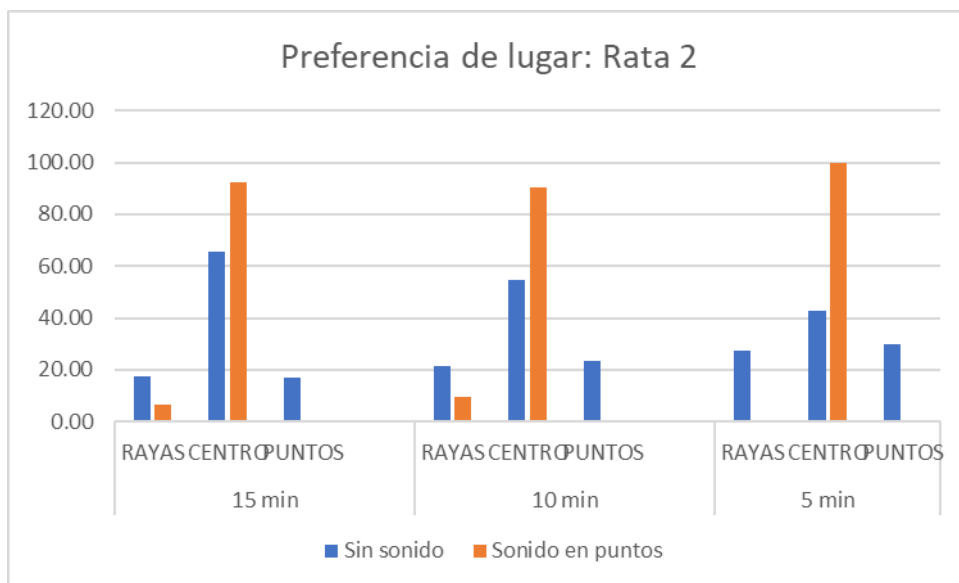
Tabla 1

*Resultados de exploración del laberinto de preferencia de lugar con y sin sonido*

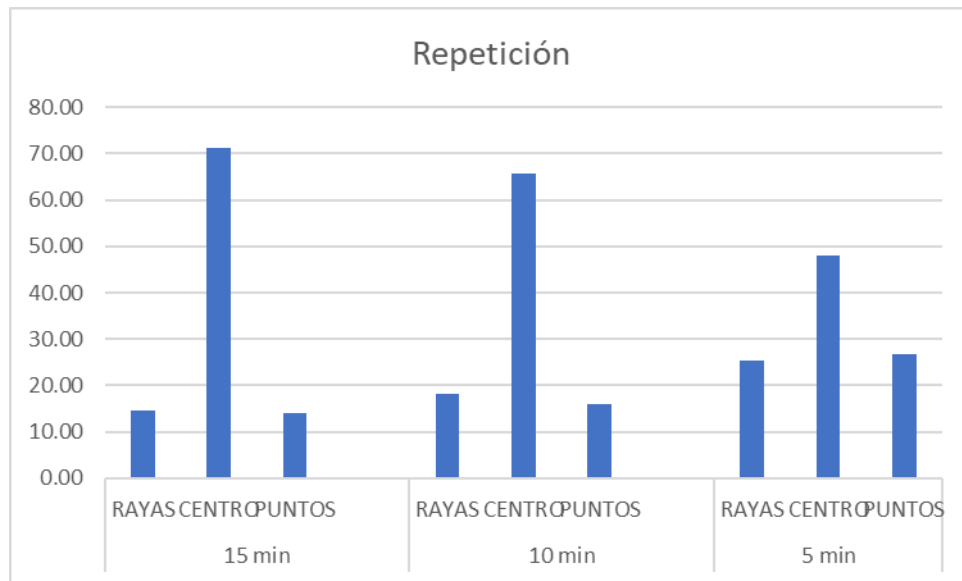
		RATA 1		RATA 2		REPETICIÓN
		Sin	Sonido en	Sin	Sonido en puntos	RATA 1
		sonido	rayas	sonido		Sin sonido
15 min	RAYAS	21.11	26.00	17.56	6.44	14.67
	CENTRO	43.11	44.67	65.33	92.44	71.33
	PUNTOS	35.56	29.33	17.11	0.00	14.00
10 min	RAYAS	24.00	24.33	21.67	9.67	18.33
	CENTRO	46.33	43.33	54.67	90.33	65.67
	PUNTOS	29.33	32.33	23.67	0.00	16.00
5 min	RAYAS	23.33	18.67	27.33	0.00	25.33
	CENTRO	43.33	59.33	42.67	100.00	48.00
	PUNTOS	33.33	22.00	30.00	0.00	26.67



*Figura 1.* Preferencia de lugar de la rata 1 con y sin sonido. No se evidencia preferencia por ningún contexto o algún efecto del sonido sobre la preferencia.



*Figura 2.* Preferencia de lugar de la rata 2 con y sin sonido. Este sujeto dejó de explorar pasados los primeros minutos, por lo que no estuvo expuesto al sonido.



*Figura 3.* Repetición de la evaluación de la rata 1. Se observa que la preferencia de lugar no es sesgada hacia ninguno de los contextos después de la exposición al sonido y exposición repetida al campo. Se observa, sin embargo, una tendencia a pasar más tiempo en el centro del campo (cese de exploración).

## 6. Registro de actividad electroencefalográfica y detección de sueño no-rem

Se utilizó dos ratas para demostrar que el procedimiento de implante de electrodos fue efectivo para el registro de actividad electroencefalográfica. Adicionalmente, se estimuló a los animales durante el sueño para determinar un estímulo que no despertara a los animales. Finalmente, se puso a prueba el estímulo auditivo a utilizar en el experimento, con el objetivo de demostrar que no interfiere con el sueño.

El registro se realizó utilizando solamente dos canales, con el equipo descrito anteriormente en la metodología. Las entradas de referencia y ground fueron unidas con soldadura en el conector acoplado a los animales, y se usaron los primeros dos canales disponibles. La adquisición de las señales se llevó a cabo mediante el software MC RACK (*Multichannel Systems*).

Se comprobó que el montaje de los electrodos y el protocolo quirúrgico son efectivos para adquirir señales limpias (ver Registro fotográfico en el ANEXO 2). Adicionalmente, se demostró que el estímulo auditivo a utilizar en el experimento no despierta a los animales. Esto se realizó mediante inspección visual de las señales on-line por dos expertos.

Se observó que los animales podían ser despertados por la estimulación eléctrica intracerebral dependiendo de la intensidad, ocurriendo cambios notables en el registro desde los 120uA, motivo por el cual se modificó la intensidad de la estimulación, como se describe en el apartado correspondiente a determinación de parámetros de estimulación.

Una dificultad para los procesos descritos en los párrafos anteriores fue determinar la fase del sueño en la que se encontraban los animales, lo cual es importante porque para el experimento, los animales solo deberán ser estimulados durante el sueño no-REM.

## 7. Elaboración de Protocolos Experimentales

Se elaboraron protocolos experimentales, con la finalidad de facilitar el procedimiento de aprobación del proyecto por el Comité de Ética Animal y para establecer protocolos que puedan ser utilizados en el futuro por otros investigadores. Estos documentos se elaboraron a partir de protocolos anteriores relacionados a procedimientos de evaluación comportamental, por lo que en algunas secciones pueden tener un gran parecido, y hacen referencia a otros protocolos o procedimientos ya estandarizados en el laboratorio. Estos protocolos fueron revisados por la dirección del laboratorio y por el personal técnico, para posteriormente ser aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL). Ver ANEXO 1.

## Conclusión

En este apartado se describen actividades que permitieron mejorar el diseño técnico y metodológico de la propuesta de investigación planteada en el capítulo 5. El resultado de estas actividades es un diseño del experimento basado en la experiencia con las diferentes técnicas a utilizar (cirugía, electroencefalografía, evaluación comportamental, etc.), al igual que la capacitación del autor de la propuesta para desarrollar todas estas técnicas. Además, permitió establecer los protocolos a seguir y hacer observaciones que contribuirán a un mejor desarrollo del proyecto e interpretación de sus resultados.

## REFERENCIAS

- Ádám, É., Hajdu, A., Nagy, F., & Viczián, A. (2015). Optogenetics: past, present and future. *Acta Biologica Szegediensis*, 59(1), 105-119.
- Agren, T., Engman, J., Frick, A., Björkstrand, J., Larsson, E. M., Furmark, T., & Fredrikson, M. (2012). Disruption of reconsolidation erases a fear memory trace in the human amygdala. *Science*, 337(6101), 1550-1552.
- Alberini, C. M., & Chen, D. Y. (2012). Memory enhancement: consolidation, reconsolidation and insulin-like growth factor 2. *Trends in neurosciences*, 35(5), 274-283.
- Alberini, C. M., & LeDoux, J. E. (2013). Memory reconsolidation. *Current Biology*, 23(17), 746-750.
- Amiri, S., Jafarian, Z., Vafaei, A. A., Motaghed-Larijani, Z., Samaei, S. A., & Rashidy-Pour, A. (2015). Glucocorticoids interact with cholinergic system in impairing memory reconsolidation of an inhibitory avoidance task in mice. *Basic and clinical neuroscience*, 6(3), 155.
- Antony, J. W., Ferreira, C. S., Norman, K. A., & Wimber, M. (2017). Retrieval as a fast route to memory consolidation. *Trends in cognitive sciences*, 21(8), 573-576.
- Antony, J. W., Gobel, E. W., O'hare, J. K., Reber, P. J., & Paller, K. A. (2012). Cued memory reactivation during sleep influences skill learning. *Nature neuroscience*, 15(8), 1114.
- Arzi, A., Shedlesky, L., Ben-Shaul, M., Nasser, K., Oksenberg, A., Hairston, I. S., & Sobel, N. (2012). Humans can learn new information during sleep. *Nature neuroscience*, 15(10), 1460 - 1465.

- Ashton, J. E., Cairney, S. A., & Gaskell, M. G. (2018). No effect of targeted memory reactivation during slow- wave sleep on emotional recognition memory. *Journal of sleep research*, 27(1), 129-137.
- Bartrés-Faz, D., & Vidal-Piñeiro, D. (2016). Noninvasive brain stimulation for the study of memory enhancement in aging. *European Psychologist*, 21, 41-54.
- Beckers, T., & Kindt, M. (2017). Memory reconsolidation interference as an emerging treatment for emotional disorders: strengths, limitations, challenges, and opportunities. *Annual Review of Clinical Psychology*, 13.
- Belchior, H. A., Pavao, R., Furtunato, A. M., Eichenbaum, H., & Tort, A. B. (2018). Reactivation of time cell sequences in the hippocampus. *bioRxiv*, 389874.
- Bennabi, D., Pedron, S., Haffen, E., Monnin, J., Peterschmitt, Y., & Van Waes, V. (2014). Transcranial direct current stimulation for memory enhancement: from clinical research to animal models. *Frontiers in systems neuroscience*, 8, 159.
- Bendor, D., & Wilson, M. A. (2012). Biasing the content of hippocampal replay during sleep. *Nature neuroscience*, 15(10), 1439.
- Benfenati, F. (2007). Synaptic plasticity and the neurobiology of learning and memory. *Acta Bio Medica Atenei Parmensis*, 78(1Suppl), 58-66.
- Bernstein, D.M., Laney, C. & Loftus, E. F. (2005). False memories about food can lead to food avoidance. *Social Cognition*, 23 (1), 11-34.
- Bergman, D., Halje, M., Nordin, M., & Engström, W. (2013). Insulin-like growth factor 2 in development and disease: a mini-review. *Gerontology*, 59(3), 240-249.

- Bisaz, R., Travaglia, A., & Alberini, C. M. (2014). The neurobiological bases of memory formation: from physiological conditions to psychopathology. *Psychopathology*, 47(6), 347-356.
- Bliss, T. V., & Lømo, T. (1973). Long- lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of physiology*, 232(2), 331-356.
- Born, J., & Wilhelm, I. (2012). System consolidation of memory during sleep. *Psychological research*, 76(2), 192-203.
- Born, J., Rasch, B., & Gais, S. (2006). Sleep to remember. *The Neuroscientist*, 12(5), 410-424.
- Brawn, T. P., Nusbaum, H. C., & Margoliash, D. (2018). Sleep-dependent reconsolidation after memory destabilization in starlings. *Nature communications*, 9(1), 3093.
- Breton, J., & Robertson, E. M. (2013). Memory Processing: The critical role of neuronal replay during sleep. *Current Biology*, 23(18), R836-R838.
- Brown, R. E., & Milner, P. M. (2003). The legacy of Donald O. Hebb: more than the Hebb synapse. *Nature Reviews Neuroscience*, 4(12), 1013.
- Burak, Y. (2014). Spatial coding and attractor dynamics of grid cells in the entorhinal cortex. *Current opinion in neurobiology*, 25, 169-175.
- Buzsáki, G., & Moser, E. I. (2013). Memory, navigation and theta rhythm in the hippocampal-entorhinal system. *Nature neuroscience*, 16(2), 130.



- Byrne, J.H. (2008), Learning and memory, basic mechanisms. En L. Squire, D. Berg, F. E. Bloom, S. Du Lac, A. Ghosh, & N.C. Spitzer, (Eds.). *Fundamental neuroscience*. Academic Press.
- Carr, M. F., Jadhav, S. P., & Frank, L. M. (2011). Hippocampal replay in the awake state: a potential substrate for memory consolidation and retrieval. *Nature neuroscience*, 14(2), 147.
- Chambers, A. M. (2017). The role of sleep in cognitive processing: focusing on memory consolidation. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Cognitive Science*, 8(3), e1433.
- Clifasefi, S.L., Bernstein, D.M., Mantonakis, A., & Loftus, E.F. (2013). “Queasy does it”: False alcohol beliefs and memories may lead to diminished alcohol preferences. *Acta Psychologica*, 143(1), 14-19.
- Clopath, C., Ziegler, L., Vasilaki, E., Büsing, L., & Gerstner, W. (2008). Tag-trigger-consolidation: a model of early and late long-term-potential and depression. *PLoS computational biology*, 4(12), e1000248.
- Colovic, M. B., Krstic, D. Z., Lazarevic-Pasti, T. D., Bondzic, A. M., & Vasic, V. M. (2013). Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. *Current neuropharmacology*, 11(3), 315-335.
- Corkin, S. (2002). What's new with the amnesic patient HM? *Nature reviews neuroscience*, 3(2), 153.
- De Bitencourt, R. M., Pamplona, F. A., & Takahashi, R. N. (2013). A current overview of cannabinoids and glucocorticoids in facilitating extinction of aversive memories: potential extinction enhancers. *Neuropharmacology*, 64, 389-395.

- De Lavilléon, G., Lacroix, M. M., Rondi-Reig, L., & Benchenane, K. (2015). Explicit memory creation during sleep demonstrates a causal role of place cells in navigation. *Nature neuroscience*, 18(4), 493.
- Deadwyler, S.A., Berger, T.W., Sweatt, A., Song, D., Chan, R.H.M., Opris, I., Gerhardt, G.A., Marmarelis, V.Z. & Hampson, R.E. (2013). Donor/recipient enhancement of memory in rat hippocampus. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 7, 1-11.
- Dennis, T. S., & Perrotti, L. I. (2015). Erasing drug memories through the disruption of memory reconsolidation: A review of glutamatergic mechanisms. *Journal of Applied Biobehavioral Research*, 20(3), 101-129.
- Diekelmann, S., & Born, J. (2010). The memory function of sleep. *Nature Reviews Neuroscience*, 11(2), 114.
- Donovan, E. (2010). Propanolol use in the prevention and treatment of posttraumatic stress disorder in military veterans: Forgetting therapy revisited. *Perspectives in Biology and Medicine*, 53(1), 61-74.
- Drexler, S. M., & Wolf, O. T. (2017). The role of glucocorticoids in emotional memory reconsolidation. *Neurobiology of learning and memory*, 142, 126-134.
- Dudai, Y., Karni, A., & Born, J. (2015). The consolidation and transformation of memory. *Neuron*, 88(1), 20-32.
- Eichenbaum, H., & Fortin, N. J. (2009). The neurobiology of memory based predictions. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1521), 1183.

- Else, J., & Kindt, M. (2016). Manipulating human memory through reconsolidation: Ethical implications of a new therapeutic approach. *AJOB Neuroscience*, 7(4), 225-236.
- Fivush, R. (2011). The development of autobiographical memory. *Annual review of psychology*, 62, 559-582.
- Floresco, S. B., & Jentsch, J. D. (2011). Pharmacological enhancement of memory and executive functioning in laboratory animals. *Neuropsychopharmacology*, 36(1), 227.
- Fu, H., Rodriguez, G. A., Herman, M., Emrani, S., Nahmani, E., Barrett, G., ... & Duff, K. E. (2017). Tau pathology induces excitatory neuron loss, grid cell dysfunction, and spatial memory deficits reminiscent of early Alzheimer's disease. *Neuron*, 93(3), 533-541.
- Garner, A. R., Rowland, D. C., Hwang, S. Y., Baumgaertel, K., Roth, B. L., Kentros, C., & Mayford, M. (2012). Generation of a synthetic memory trace. *Science*, 335(6075), 1513-1516.
- Genzel, L., Rossato, J. I., Jacobse, J., Grieves, R. M., Spooner, P. A., Battaglia, F. P., ... & Morris, R. G. (2017). The yin and yang of memory consolidation: Hippocampal and neocortical. *PLoS biology*, 15(1), e2000531.
- Giuditta, A. (2014). Sleep memory processing: the sequential hypothesis. *Frontiers in systems neuroscience*, 8, 219.
- Giustino, T. F., Fitzgerald, P. J., & Maren, S. (2016). Revisiting propranolol and PTSD: memory erasure or extinction enhancement?. *Neurobiology of learning and memory*, 130, 26-33.

- Glannon, W. (2017). Brain implants to erase memories. *Frontiers in neuroscience*, 11, 1-4.
- Goodman, J. & Packard, M.G. (2016). Memory systems and the addicted brain. *Frontiers in Psychiatry*, 7 (24), 1-9.
- Gräff, J., & Tsai, L. H. (2011). Cognitive enhancement: a molecular memory booster. *Nature*, 469(7331), 474.
- Goodman, J., & Packard, M. G. (2016). Memory systems and the addicted brain. *Frontiers in psychiatry*, 7, 24.
- Greenberg, D. L., & Verfaellie, M. (2010). Interdependence of episodic and semantic memory: evidence from neuropsychology. *Journal of the International Neuropsychological society*, 16(5), 748-753.
- Hamani, C., McAndrews, M. P., Cohn, M., Oh, M., Zumsteg, D., Shapiro, C. M., ... & Lozano, A. M. (2008). Memory enhancement induced by hypothalamic/fornix deep brain stimulation. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, 63(1), 119-123.
- Hampson, R. E., Song, D., Opris, I., Santos, L. M., Shin, D. C., Gerhardt, G. A., ... & Deadwyler, S. A. (2013). Facilitation of memory encoding in primate hippocampus by a neuroprosthesis that promotes task-specific neural firing. *Journal of neural engineering*, 10(6), 066013.
- Hampstead, B. M., Sathian, K., Bikson, M., & Stringer, A. Y. (2017). Combined mnemonic strategy training and high-definition transcranial direct current stimulation for memory deficits in mild cognitive impairment. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*, 3(3), 459-470.

- Han, J. H., Kushner, S. A., Yiu, A. P., Hsiang, H. L. L., Buch, T., Waisman, A., ... & Josselyn, S. A. (2009). Selective erasure of a fear memory. *Science*, 323(5920), 1492-1496.
- Haubrich, J., Machado, A., Boos, F. Z., Crestani, A. P., Sierra, R. O., de Oliveira Alvares, L., & Quillfeldt, J. A. (2017). Enhancement of extinction memory by pharmacological and behavioral interventions targeted to its reactivation. *Scientific Reports*, 7(1), 10960.
- Henry, M., Fishman, J. R., & Youngner, S. J. (2007). Propranolol and the prevention of post-traumatic stress disorder: Is it wrong to erase the “sting” of bad memories?. *The American Journal of Bioethics*, 7(9), 12-20.
- Ilhan Algin, D., Dagli Atalay, S., Ozkan, S., Ozbabalik Adapinar, D., & Ak Sivrioiz, I. (2017). Memantine improves semantic memory in patients with amnesic mild cognitive impairment: A single-photon emission computed tomography study. *Journal of International Medical Research*, 45(6), 2053-2064.
- Kandel, E. (2014). A place and a grid in the sun. *Cell*, 159, 1239-1242.
- Kim, S. Y., Pardilla-Delgado, E., & Alger, S. E. (2017). Enhancing Memory Consolidation through Slow Oscillation and Spindle Synchronization. *Journal of Neuroscience*, 37(48), 11517-11519.
- Kindt, M. (2018). The surprising subtleties of changing fear memory: a challenge for translational science. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 373(1742), 20170033.

- Kindt, M., Soeter, M., & Vervliet, B. (2009). Beyond extinction: erasing human fear responses and preventing the return of fear. *Nature neuroscience*, 12(3), 256.
- Klein, M. M., Treister, R., Rajj, T., Pascual-Leone, A., Park, L., Nurmikko, T., ... & Fox, M. (2015). Transcranial magnetic stimulation of the brain: guidelines for pain treatment research. *Pain*, 156(9), 1601.
- Kolb, B., & Whishaw, I. Q. (2015). *Fundamentals of human neuropsychology*. Macmillan.
- Kucewicz, M. T., Berry, B. M., Miller, L. R., Khadjevand, F., Ezzyat, Y., Stein, J. M., ... & Gorniak, R. (2018). Evidence for verbal memory enhancement with electrical brain stimulation in the lateral temporal cortex. *Brain*, 141(4), 971-978.
- Kunz, L., Schröder, T. N., Lee, H., Montag, C., Lachmann, B., Sariyska, R., ... & Fell, J. (2015). Reduced grid-cell-like representations in adults at genetic risk for Alzheimer's disease. *Science*, 350(6259), 430-433.
- LaLumiere, R. T., McGaugh, J. L., & McIntyre, C. K. (2017). Emotional modulation of learning and memory: Pharmacological implications. *Pharmacological reviews*, 69(3), 236-255.
- Lamsa, K. P., Heeroma, J. H., Somogyi, P., Rusakov, D. A., & Kullmann, D. M. (2007). Anti-Hebbian long-term potentiation in the hippocampal feedback inhibitory circuit. *Science*, 315(5816), 1262-1266.
- Lavazza, A. (2015). Erasing traumatic memories: when context and social interests can outweigh personal autonomy. *Philosophy, Ethics, and Humanities in Medicine*, 10(1), 3.

- Laxton, A. W., Tang- Wai, D. F., McAndrews, M. P., Zumsteg, D., Wennberg, R., Keren, R., ... & Lozano, A. M. (2010). A phase I trial of deep brain stimulation of memory circuits in Alzheimer's disease. *Annals of neurology*, 68(4), 521-534.
- Lee, J. L., Gardner, R. J., Butler, V. J., & Everitt, B. J. (2009). D-cycloserine potentiates the reconsolidation of cocaine-associated memories. *Learning & Memory*, 16(1), 82-85.
- Lima, B. F., Ramos, D. C., Barbiero, J. K., Pulido, L., Redgrave, P., Robinson, D. L., ... & Da Cunha, C. (2017). Partial lesion of dopamine neurons of rat substantia nigra impairs conditioned place aversion but spares conditioned place preference. *Neuroscience*, 349, 264-277.
- Lin, J., Liu, L., Wen, Q., Zheng, C., Gao, Y., Peng, S., ... & Li, Y. (2014). Rapamycin prevents drug seeking via disrupting reconsolidation of reward memory in rats. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 17(1), 127-136.
- Lockrow, J., Boger, H., Bimonte-Nelson, H., & Granholm, A. C. (2011). Effects of long-term memantine on memory and neuropathology in Ts65Dn mice, a model for Down syndrome. *Behavioural brain research*, 221(2), 610-622.
- Loftus, E. F. (1996). The myth of repressed memory and the realities of science. *Clinical Psychology: Science and Practice*, 3(4), 356-362. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1468-2850.1996.tb00089.x>
- Loftus, E. F. (1999). Lost in the mall: Misrepresentations and misunderstandings. *Ethics & behavior*, 9(1), 51-60.
- Loftus, E. F. (2017). Eavesdropping on memory. *Annual review of psychology*, 68, 1-18. Doi: 10.1146/annurev-psych-010416-044138

- Lonergan, M. H., Olivera-Figueroa, L. A., Pitman, R. K., & Brunet, A. (2013). Propranolol's effects on the consolidation and reconsolidation of long-term emotional memory in healthy participants: a meta-analysis. *Journal of Psychiatry & Neuroscience*, 38(4), 222-231.
- Manenti, R., Cotelli, M., Robertson, I. H., & Miniussi, C. (2012). Transcranial brain stimulation studies of episodic memory in young adults, elderly adults and individuals with memory dysfunction: a review. *Brain Stimulation*, 5(2), 103-109.
- Manns, J.R. & Eichenbaum, H (2008), Learning and memory: brain systems, en L.R. Squire, F.E. Bloom, N.C. Spitzer, S. Lac, & D. Berg, *Fundamental Neuroscience* 3<sup>rd</sup> Ed. Elsevier.
- Marshall, L., Helgadóttir, H., Mölle, M., & Born, J. (2006). Boosting slow oscillations during sleep potentiates memory. *Nature*, 444(7119), 610.
- McGaugh, J. L. (2004). The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. *Annu. Rev. Neurosci.*, 27, 1-28.
- Meeter, M., & Murre, J. M. (2004). Consolidation of long-term memory: evidence and alternatives. *Psychological Bulletin*, 130(6), 843.
- Mehanna, R., & Lai, E. C. (2013). Deep brain stimulation in Parkinson's disease. *Translational neurodegeneration*, 2(1), 22.
- Mermillod, M., Bugaiska, A., & Bonin, P. (2013). The stability-plasticity dilemma: Investigating the continuum from catastrophic forgetting to age-limited learning effects. *Frontiers in psychology*, 4, 504.



- Moreira, S. V., Justi, F. R. D. R., & Moreira, M. (2018). Can musical intervention improve memory in Alzheimer's patients? Evidence from a systematic review. *Dementia & neuropsychologia*, 12(2), 133-142.
- Mosley, P. E., Marsh, R., & Carter, A. (2015). Deep brain stimulation for depression: Scientific issues and future directions. *Australian & New Zealand Journal of Psychiatry*, 49(11), 967-978.
- Nadel, L., Hupbach, A., Gomez, R., & Newman-Smith, K. (2012). Memory formation, consolidation and transformation. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 36(7), 1640-1645.
- Naismith, S.L., Mowszowski, L., Diamond, K., & Lewis, S.J.G. (2013). Improving memory in Parkinson's disease: A healthy brain ageing cognitive training program. *Movement Disorders*, 28(8), 1097-1103.
- O'Neill, J., Pleydell-Bouverie, B., Dupret, D., & Csicsvari, J. (2010). Play it again: reactivation of waking experience and memory. *Trends in neurosciences*, 33(5), 220-229.
- Oudiette, D., & Paller, K. A. (2013). Upgrading the sleeping brain with targeted memory reactivation. *Trends in cognitive sciences*, 17(3), 142-149.
- Papalambros, N. A., Santostasi, G., Malkani, R. G., Braun, R., Weintraub, S., Paller, K. A., & Zee, P. C. (2017). Acoustic enhancement of sleep slow oscillations and concomitant memory improvement in older adults. *Frontiers in human neuroscience*, 11, 109.
- Paxinos, G., & Watson, C. (2006). The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates: Hard Cover Edition. *Elsevier Science*.

- Pittalà, V., Siracusa, M. A., Salerno, L., Romeo, G., Modica, M. N., Madjid, N., & Ogren, S. O. (2015). Analysis of mechanisms for memory enhancement using novel and potent 5-HT1A receptor ligands. *European Neuropsychopharmacology*, 25(8), 1314-1323.
- Poucet, B., Lenck-Santini, P., Paz-Villagrán, V. & Save, E. (2003). Place cells, neocortex and spatial navigation: a short review. *Journal of physiology*, 97(2003), 537-546.
- Ramirez, S., Liu, X., Lin, P. A., Suh, J., Pignatelli, M., Redondo, R. L., ... & Tonegawa, S. (2013). Creating a false memory in the hippocampus. *Science*, 341(6144), 387-391.
- Ramirez, S., Liu, X., MacDonald, C. J., Moffa, A., Zhou, J., Redondo, R. L., & Tonegawa, S. (2015). Activating positive memory engrams suppresses depression-like behaviour. *Nature*, 522(7556), 335.
- Rasch, B., Büchel, C., Gais, S., & Born, J. (2007). Odor cues during slow-wave sleep prompt declarative memory consolidation. *Science*, 315(5817), 1426-1429.
- Richards, B.A. & Frankland, P. W. (2007). The persistence and transience of memory. *Neuron*, 94, 1071-1084.
- Rodriguez, M. L. C., Campos, J., Forcato, C., Leiguarda, R., Maldonado, H., Molina, V. A., & Pedreira, M. E. (2013). Enhancing a declarative memory in humans: the effect of clonazepam on reconsolidation. *Neuropharmacology*, 64, 432-442.
- Roesler, R. (2017). Molecular mechanisms controlling protein synthesis in memory reconsolidation. *Neurobiology of learning and memory*, 142, 30-40.
- Roth, B. L. (2016). DREADDs for neuroscientists. *Neuron*, 89(4), 683-694.

- Rowland, D.C., Roudi, Y., Moser, E., & Moser, M. (2016). Ten years of grid cells. *Annual Review of Neuroscience*, 39(2016), 19-40.
- Rudoy, J. D., Voss, J. L., Westerberg, C. E., & Paller, K. A. (2009). Strengthening individual memories by reactivating them during sleep. *Science*, 326(5956), 1079-1079.
- Rudy, J. W., Biedenkapp, J. C., Moineau, J., & Bolding, K. (2006). Anisomycin and the reconsolidation hypothesis. *Learning & Memory*, 13(1), 1-3.
- San Agustín, A., & Pons, J. L. (2017) Transcranial Magnetic Stimulation as a tool for Memory Enhancement Research. Summer School on Neurorehabilitation (SSNR2017), September 17-22, 2017, Baiona, Spain.
- Sandkühler, J., & Lee, J. (2013). How to erase memory traces of pain and fear. *Trends in neurosciences*, 36(6), 343-352.
- Sara, S. J. (2017). Sleep to remember. *Journal of Neuroscience*, 37(3), 457-463.
- Schiller, D., Monfils, M., Raio, C., Johnson, D.C., LeDux, J.E. & Phelps, E.A. (2009). Preventing the return of fear in humans using reconsolidation update mechanisms. *Nature*, 463, 49-53.
- Schouten, D. I., Pereira, S. I., Tops, M., & Louzada, F. M. (2017). State of the art on targeted memory reactivation: sleep your way to enhanced cognition. *Sleep Medicine Reviews*, 32, 123-131.
- Schwabe, L., Nader, K., & Pruessner, J. C. (2014). Reconsolidation of human memory: Brain mechanisms and clinical relevance. *Biological psychiatry*, 76(4), 274-280.

- Scoville, W. B., & Milner, B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 20(1), 11.
- Seibold, M., Rasch, B., Born, J., & Diekelmann, S. (2018). Reactivation of interference during sleep does not impair ongoing memory consolidation. *Memory*, 26(3), 377-384.
- Sekeres, M. J., Moscovitch, M., & Winocur, G. (2017). Mechanisms of memory consolidation and transformation. In *Cognitive Neuroscience of Memory Consolidation* (pp. 17-44). Springer, Cham.
- Shimizu, R. E., Connolly, P. M., Cellini, N., Armstrong, D. M., Hernandez, L. T., Estrada, R., ... & Simons, S. B. (2018). Closed-Loop Targeted Memory Reactivation during Sleep Improves Spatial Navigation. *Frontiers in human neuroscience*, 12, 28.
- Siegel, J. M. (2001). The REM sleep-memory consolidation hypothesis. *Science*, 294(5544), 1058-1063.
- Simmons-Stern, N. R., Deason, R. G., Brandler, B. J., Frustace, B. S., O'connor, M. K., Ally, B. A., & Budson, A. E. (2012). Music-based memory enhancement in Alzheimer's Disease: Promise and limitations. *Neuropsychologia*, 50(14), 3295-3303.
- Simonsmeier, B. A., Grabner, R. H., Hein, J., Krenz, U., & Schneider, M. (2018). Electrical brain stimulation (tES) improves learning more than performance: a meta-analysis. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 84, 171-181.
- Sharma, T., & Antonova L. (2003). Cognitive function in schizophrenia. Deficits, functional consequences, and future treatment. *Psychiatric Clinics of North America*, 26, 25-40.

- Shehata, M., Abdou, K., Choko, K., Matsuo, M., Nishizono, H., & Inokuchi, K. (2018). Autophagy enhances memory erasure through synaptic destabilization. *Journal of Neuroscience*, 3505-17.
- Shelton, C. (2004). Progression of memory/attention abilities post-traumatic brain injury. *The Journal of Cognitive Rehabilitation*, 22, 5-11.
- Simmons-Stern, N.R., Deason, R.G., Brandler, B.J., Frustace, B.S., O'Connor, M.K., Ally, B.A., & Budson, A.E. (2012). Music based memory enhancement in Alzheimer's disease: Promise and limitations. *Neuropsychologia*, 50(14), 3295-3303.
- Slutsky, I., Abumaria, N., Wu, L. J., Huang, C., Zhang, L., Li, B., ... & Tonegawa, S. (2010). Enhancement of learning and memory by elevating brain magnesium. *Neuron*, 65(2), 165-177.
- Sorg, B. A., Todd, R. P., Slaker, M., & Churchill, L. (2015). Anisomycin in the medial prefrontal cortex reduces reconsolidation of cocaine-associated memories in the rat self-administration model. *Neuropharmacology*, 92, 25-33.
- Spiers, H. J., & Bendor, D. (2014). Enhance, delete, incept: Manipulating hippocampus-dependent memories. *Brain research bulletin*, 105, 2-7.
- Squire, L. R. (2004). Memory systems of the brain: a brief history and current perspective. *Neurobiology of learning and memory*, 82(3), 171-177.
- Squire, L. R., & Wixted, J. T. (2011). The cognitive neuroscience of human memory since HM. *Annual review of neuroscience*, 34, 259-288.

- Squire, L. R., Genzel, L., Wixted, J. T., & Morris, R. G. (2015). Memory consolidation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 7(8), a021766.
- Suthana, N., Haneef, Z., Stern, J., Mukamel, R., Behnke, E., Knowlton, B., & Fried, I. (2012). Memory enhancement and deep-brain stimulation of the entorhinal area. *New England Journal of Medicine*, 366(6), 502-510.
- Suthana, N., & Fried, I. (2014). Deep brain stimulation for enhancement of learning and memory. *Neuroimage*, 85, 996-1002.
- Taherian, F., Vafaei, A. A., Vaezi, G. H., Eskandarian, S., Kashef, A., & Rashidy-Pour, A. (2014). Propranolol-induced impairment of contextual fear memory reconsolidation in rats: a similar effect on weak and strong recent and remote memories. *Basic and clinical neuroscience*, 5(3), 231.
- Thomas, É., Saumier, D., Pitman, R. K., Tremblay, J., & Brunet, A. (2017). Consolidation and reconsolidation are impaired by oral propranolol administered before but not after memory (re) activation in humans. *Neurobiology of learning and memory*, 142, 118-125.
- Thompson-Schill, S. L. (2003). Neuroimaging studies of semantic memory: inferring “how” from “where”. *Neuropsychologia*, 41(3), 280-292.
- Tonegawa, S., Pignatelli, M., Roy, D. S., & Ryan, T. J. (2015). Memory engram storage and retrieval. *Current opinion in neurobiology*, 35, 101-109.
- Tulving, E. (1972). Episodic and semantic memory. In E. Tulving & W. Donaldson (Eds.), *Organization of memory* (pp. 381 –403). New York: Academic Press.

- Villain, H., Benkahoul, A., Drougard, A., Lafrayette, M., Muzotte, E., Pech, S., ... & Rouillet, P. (2016). Effects of propranolol, a  $\beta$ -noradrenergic antagonist, on memory consolidation and reconsolidation in mice. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 10, 49.
- Wei, X. X., Prentice, J., & Balasubramanian, V. (2013). The sense of place: grid cells in the brain and the transcendental number  $e$ . *arXiv preprint arXiv:1304.0031*.
- Winocur, G., & Moscovitch, M. (2011). Memory transformation and systems consolidation. *Journal of the International Neuropsychological Society*, 17(5), 766-780.
- Wouda, J. A., Diergaarde, L., Riga, D., Van Mourik, Y., Schoffelman, A. N., & De Vries, T. J. (2010). Disruption of long-term alcohol-related memory reconsolidation: role of  $\beta$ -adrenoceptors and NMDA receptors. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 4, 179.
- Ziegler, L., Zenke, F., Kastner, D. B., & Gerstner, W. (2015). Synaptic consolidation: from synapses to behavioral modeling. *Journal of Neuroscience*, 35(3), 1319-1334.

## ANEXO 1: PROTOCOLOS EXPERIMENTALES

### PROTOCOLO OPERATIVO EXPERIMENTAL: ESTIMULACIÓN INTRACEREBRAL

1. OBJETO:
Establecer las instrucciones a seguir para el procedimiento de estimulación intracerebral en ratas Wistar del LABORATORIO DE NEUROCIENCIA Y COMPORTAMIENTO de la Universidad de los Andes.
2. ALCANCE:
La finalidad de este instructivo es proveer los conocimientos básicos e instrucciones claras para el procedimiento de estimulación intracerebral en ratas Wistar, generalmente utilizado para producir sensaciones de placer (refuerzo), lesiones cerebrales, o modular la excitabilidad del tejido nervioso. Este procedimiento se puede realizar con el animal en periodo de sueño o vigilia.
3. RESPONSABLES:
El desarrollo de este procedimiento es responsabilidad de investigadores, docentes y tesisistas con entrenamiento en manejo de animales experimentales, quienes desarrollen trabajo con ratas Wistar del LABORATORIO DE NEUROCIENCIA Y COMPORTAMIENTO de la Universidad de los Andes y conozcan las normas éticas que rigen el trabajo con animales.
4. DEFINICIONES Y CLASIFICACIÓN
4.1 Estimulador: Dispositivo que emite pulsos eléctricos de acuerdo a parámetros de intensidad, tiempo y latencia requeridos.
5. MATERIALES
5.1 Elementos de protección personal: guantes de látex, tapabocas, gorro e indumentaria requerida para el ingreso al bioterio (Protocolo ingreso BIOTERIO L.NC-001)
5.2 Sala de procedimientos
5.3 Animales: preferiblemente entre los 290 y los 350 gramos de peso.
5.4 Cajas de transporte: véase POE Caja de Transporte L.NC-042.
5.5 Estimulador.
5.6 Cables para electrodo.
5.7 Cronómetro.



## 6. CONDICIONES PREVIAS

- 6.1 Asegúrese que su carnet esté habilitado para el ingreso al bioterio
- 6.2 Ingreso al bioterio: Antes de ingresar tenga en cuenta los POES (L.CN-002 lavado de manos, L.CN-001 ingreso al bioterio, L.CN-001-1 formato registro ingreso al bioterio)
- 6.3 Una semana antes de cualquier procedimiento experimental todas las ratas deben ser manipuladas durante 5 minutos diarios teniendo en cuenta (L.NC-014 Manipulación y marcación de animales experimentales), con el fin de que los animales se habitúen a los experimentadores.
- 6.4 Asegurar la reserva y disponibilidad de la sala experimental
- 6.5 Asegurarse de conocer los parámetros de estimulación requeridos, y cómo configurar el estimulador.

## 7. DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

- 7.1 Establecer los parámetros de estimulación intracerebral en el dispositivo estimulador. De preferencia, asegurarse de que el dispositivo esté funcionando correctamente mediante la medición de los pulsos emitidos con un osciloscopio.
- 7.2 Seleccionar el animal previamente marcado. Retirarlo de la caja hogar y ponerlo en una caja de transporte con aserrín de acuerdo al POE Caja de Transporte L.NC-042.
- 7.3 Llevar al animal al cuarto experimental. Ubicarlo en una caja de alojamiento con suficiente encamado.
- 7.4 Conectar el estimulador al aislador de estímulos y éste a los conectores implantados previamente en el animal mediante un cable para electrodos, cuidando que no se dañen los conectores y sin ejercer mucha presión sobre la cabeza.
- 7.5 Activar el estimulador, observando al animal por posibles alteraciones de conducta y controlando el tiempo de estimulación requerido.
- 7.6 Desconectar cuidadosamente el cable de electrodos de los conectores ubicados en la cabeza del animal, y mantenerlo en observación por unos minutos.
- 7.7 Retirar al animal de la caja donde fue estimulado y acomodarlo en una caja de transporte, para ser devuelto a su caja hogar.

## 8. REFERENCIAS

Tan, S. K., Vlamings, R., Lim, L., Sesia, T., Janssen, M. L., Steinbusch, H. W., ... & Temel, Y. (2010). Experimental deep brain stimulation in animal models. *Neurosurgery*, 67(4), 1073-1080.

PROTOCOLO OPERATIVO EXPERIMENTAL: AJUSTE DE PARÁMETROS DE ESTIMULACIÓN  
INTRACEREBRAL MONOPOLAR CATÓDICA EN EL HAZ PROSENCEFÁLICO MEDIAL PARA  
REFUERZO MEDIANTE EL PARADIGMA NOSE-POKE

1. OBJETO:
Describir el procedimiento para ajuste de parámetros de estimulación intracerebral de refuerzo mediante el paradigma <i>nose-poke</i> en ratas Wistar implantadas con electrodos en el haz prosencefálico medial en el LABORATORIO DE NEUROCIENCIA Y COMPORTAMIENTO de la Universidad de los Andes.
2. ALCANCE:
Establecimiento de parámetros de estimulación eléctrica para reforzar conductas en los animales mediante la estimulación intracerebral en el haz prosencefálico medial de ratas Wistar en el LABORATORIO DE NEUROCIENCIA Y COMPORTAMIENTO de la Universidad de los Andes, para ser desarrollado por investigadores o personal capacitado en el manejo de animales experimentales.
3. RESPONSABLES:
El desarrollo de este procedimiento es responsabilidad de los investigadores, docentes, tesisistas y auxiliares de investigación con entrenamiento en manejo de animales experimentales, quienes por su trabajo requieran el uso del procedimiento en el LABORATORIO DE NEUROCIENCIA Y COMPORTAMIENTO de la Universidad de los Andes.
4. DEFINICIONES Y CLASIFICACIÓN:
<ul style="list-style-type: none"><li>a. Estimulación intracerebral: Proceso mediante el cual se aplican pulsos eléctricos directamente en el cerebro de los animales con el objetivo de modular la excitabilidad del tejido nervioso.</li><li>b. Estimulador: Dispositivo electrónico que permite generar pulsos eléctricos de las características requeridas por el experimentador (intensidad, latencia, frecuencia, etc.)</li><li>c. Paradigma <i>nose-poke</i>: Paradigma de condicionamiento operante en el que el animal tiene que introducir su hocico en un agujero, o hacer contacto con su nariz en un área establecida, para recibir un refuerzo.</li><li>d. Refuerzo: Estímulo que aumenta la frecuencia de una conducta.</li><li>e. Caja de <i>nose-poke</i>: Caja de forma y medidas variables que permite realizar el paradigma <i>nose-poke</i>. En este caso, una caja de acrílico rectangular de 25 x 20 x 20 cm que cuenta</li></ul>

con un agujero en el centro de una de las paredes y tiene un sensor que permite registrar los datos obtenidos.

- f. Haz prosencefálico medial: Haz de fibras nerviosas que incluye la vía dopaminérgica mesolímbica, por lo que al ser estimulada eléctricamente produce una fuerte sensación de placer.

#### 5. MATERIALES:

- a. Elementos de protección personal: guantes de látex, tapabocas, gorro e indumentaria requerida para el ingreso al bioterio (Protocolo ingreso BIOTERIO L.NC-001)
- b. Caja de *nose-poke*
- c. Estimulador eléctrico
- d. Cables de electrodo de estimulación
- e. Cronometro y planilla de registro
- f. Alcohol al 10%
- g. Cajas de transporte: Véase POE Caja de Transporte L.NC-042.

#### 6. CONDICIONES PREVIAS:

- a. Asegúrese que su carnet esté habilitado para el ingreso al bioterio
- b. Ingreso al bioterio: Antes de ingresar tenga en cuenta los POES (L.CN-002 lavado de manos, L.CN-001 ingreso al bioterio, L.CN-001-1 formato registro ingreso al bioterio)
- c. Una semana antes de cualquier procedimiento experimental todas las ratas deben ser manipuladas durante 5 minutos diarios teniendo en cuenta (L.NC-014 Manipulación y marcación de animales experimentales), con el fin de que los animales se habitúen a los experimentadores.
- d. Sala de procedimiento: Reserve con anterioridad la sala de procedimiento según el sistema del laboratorio.
- e. Garantice la disponibilidad de materiales de limpieza y desinfección, así como un sistema de identificación de los ensayos y de los animales en prueba.
- f. Las pruebas conductuales deben realizarse entre las 8 am y 2 pm (en ratas mantenidas en ciclo de iluminación invertido).
- g. Conocimiento previo de manejo de dispositivo estimulador. En caso de duda refiérase al POS correspondiente.

7. DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO:
<ul style="list-style-type: none"> <li>a. Traslade el animal correspondiente a la sala experimental haciendo uso de una caja de transporte.</li> <li>b. Limpie cuidadosamente la caja <i>nose-poke</i> con alcohol al 10%, espere de 2 a 5 minutos para que el alcohol se evapore.</li> <li>c. Conecte al estimulador mediante el cable apropiado al <i>stimulus isolator</i> y éste a los conectores en la cabeza del animal, teniendo en cuenta la polaridad requerida (polo negativo conectado al electrodo de profundidad).</li> <li>d. Coloque al animal en la caja de <i>nose-poke</i>.</li> <li>e. Ajuste los parámetros iniciales en el estimulador Tren de estimulación catódica de 0.5 s de duración, de ondas rectangulares de 0.1 ms, 200 uA y a 25 Hz.</li> <li>f. Antes del inicio del modelamiento de la conducta, administre entre tres y cinco trenes de 0,5 segundos de estimulación eléctrica de 300 uA a 85 Hz y observe el comportamiento del animal. En caso de que la estimulación sea efectiva, el animal deberá detener la actividad que esté realizando mientras recibe la estimulación, retomándola en el momento en que esta finalice.</li> <li>g. Moldeamiento de conducta: Retorne el estimulador a los valores iniciales. Si observa un acercamiento del animal al agujero, active el estimulador para guiarlo hacia la conducta que deberá realizar para ser reforzado posteriormente. Cuando el animal introduzca su hocico en el agujero, estimúlelo inmediatamente, y luego en intervalos de 3 segundos mientras mantenga el hocico dentro de este. Recuerde observar en todo momento conductas que denoten malestar o que podrían interferir con el experimento.</li> <li>h. Si percibe que el animal no está siendo reforzado adecuadamente (no se acerca al agujero o no introduce su hocico), modifique los parámetros de estimulación de frecuencia e intensidad. Para esto, primero manipule la intensidad de la corriente, aumentando de 10 en 10 uA, hasta una máxima intensidad de 350 uA. Si observa que el refuerzo es suficiente (el animal permanece un 80% del tiempo con el hocico dentro del agujero en un intervalo de 30 s) detenga el procedimiento y anote los parámetros.</li> <li>i. Si al estimular a 350 uA y 25 Hz no se detecta aún la conducta esperada (80% del tiempo en el agujero en 30 s), modifique la frecuencia de la estimulación, aumentando la frecuencia de 20 en 20 Hz, hasta un máximo de 150 Hz. Si el animal muestra la conducta esperada antes de llegar a la estimulación máxima en cuanto a frecuencia, disminuya la intensidad de la corriente (uA) mientras compensa la disminución de intensidad con el</li> </ul>

aumento de frecuencia (Hz) de los pulsos, hasta observar la conducta esperada. El objetivo de este paso del procedimiento es obtener la conducta esperada con la menor intensidad de corriente (uA) posible.

- j. Una vez obtenidos los parámetros, recuerde anotarlos. Posteriormente, desconecte al animal cuidadosamente y devuélvalo a su caja hogar. Este procedimiento no deberá durar más de 30 minutos. En caso de demorar este tiempo y no haber conseguido aún la conducta esperada, realice otra sesión en no menos de 4 horas.

#### 8. REFERENCIAS

- De Lavilléon, G., Lacroix, M. M., Rondi-Reig, L., & Benchenane, K. (2015). Explicit memory creation during sleep demonstrates a causal role of place cells in navigation. *Nature neuroscience*, 18(4), 493.
- Hernandez, G., Hamdani, S., Rajabi, H., Conover, K., Stewart, J., Arvanitogiannis, A., & Shizgal, P. (2006). Prolonged rewarding stimulation of the rat medial forebrain bundle: neurochemical and behavioral consequences. *Behavioral neuroscience*, 120(4), 888.

PROTOCOLO OPERATIVO EXPERIMENTAL: CONDICIONAMIENTO Y EVALUACIÓN DE LA  
CONDUCTA DE PREFERENCIA DE LUGAR

1. OBJETO:
Establecer las instrucciones de aplicación y evaluación conductual del paradigma de condicionamiento y evaluación de preferencia de lugar para ratas Wistar en el Laboratorio de Neurociencia y Comportamiento de la Universidad de los Andes.
2. ALCANCE:
Diseños experimentales que involucren el condicionamiento y evaluación de la conducta de preferencia de lugar de ratas Wistar.
3. RESPONSABLES:
El desarrollo de este procedimiento es responsabilidad de los investigadores, docentes, tesis y auxiliares de investigación con entrenamiento en manejo de animales experimentales, quienes por su trabajo requieran el uso del procedimiento en el Laboratorio de Neurociencia y Comportamiento de la Universidad de Los Andes.
4. DEFINICIONES Y CLASIFICACIÓN:
<p>4.1 Campo de preferencia de lugar: Estructura de material acrílico rectangular que cuenta con tres espacios diferentes: Un contexto A en un extremo [40 x 22 x 30 cm], contexto B en el otro extremo del mismo tamaño, y un espacio central más pequeño [10 x 22 x 30 cm]. En cada uno de los contextos hay estímulos que ayudan a la diferenciación del espacio (líneas horizontales o verticales y diferentes texturas en el piso). Los dos contextos están conectados a través del espacio central, de manera que el animal puede moverse libremente a lo largo de todo el campo. De ser requerido, se puede evitar la salida de los contextos mediante el cierre de estos con una compuerta de acrílico tipo guillotina.</p> <p>4.2 Paradigma de referencia de lugar: Paradigma experimental en el cual se evalúa la preferencia que muestra un animal por un contexto o lugar asociado con un estímulo placentero o reforzante. Este paradigma es utilizado para medir la potencia adictiva (o reforzante) de diferentes drogas o el aprendizaje por refuerzo de los sujetos experimentales.</p>
5. MATERIALES.

- 5.1 Elementos de protección personal: guantes de látex, tapabocas, gorro e indumentaria requerida para el ingreso al bioterio (Protocolo ingreso BIOTERIO L.NC-001).
- 5.2 Alcohol al 10% y papel para limpiar.
- 5.3 Cajas de transporte.
- 5.4 Campo de preferencia de lugar.
- 5.5 Cronómetro.
- 5.6 Parlantes para reproducir estímulos auditivos.
- 5.7 Fármacos o drogas, en caso de ser administradas.
- 5.8 Sistema de cámaras.

#### 6. CONDICIONES PREVIAS:

- 6.1 Asegúrese que su carnet esté habilitado para el ingreso al bioterio
- 6.2 Ingreso al bioterio: Antes de ingresar tenga en cuenta los POES (L.CN-002 lavado de manos, L.CN-001 ingreso al bioterio, L.CN-001-1 formato registro ingreso al bioterio)
- 6.3 Una semana antes de cualquier procedimiento experimental todas las ratas deben ser manipuladas durante 5 minutos diarios teniendo en cuenta (L.NC-014 Manipulación y marcación de animales experimentales), con el fin de que los animales se habitúen a los experimentadores.
- 6.4 Sala de procedimiento: Reserve con anterioridad la sala de procedimiento según el sistema del laboratorio.
- 6.5 Garantice la disponibilidad de materiales de limpieza y desinfección, así como un sistema de identificación de los ensayos y de los animales en prueba.
- 6.6 Las pruebas conductuales y condicionamiento deben realizarse entre las 8 am y 2 pm, durante el período de actividad de los animales.

#### 7. DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO:

- 7.1 Al iniciar tenga en cuenta el POE CAJA DE TRASNPORTE L.NC-042.
- 7.2 Tenga en cuenta el POE Protocolo limpieza y desinfección salas experimentales e instrumentos utilizados en los experimentos L.NC-043, entre cada animal experimental.

##### **Condicionamiento**

- 7.3 Para realizar el condicionamiento, ubique al animal en el campo de preferencia de lugar, y reproduzca el estímulo escogido o administre la droga por el tiempo y en intervalos requeridos en cada contexto de acuerdo a lo propuesto para su experimento. Si su experimento lo

requiere, puede cerrar las compuertas de los contextos para restringir el movimiento de los animales de un contexto a otro.

#### **Evaluación de preferencia de lugar**

7.4 Para la evaluación de preferencia de lugar, prepare el sistema de cámaras para el registro del comportamiento del animal.

7.5 Limpie y desinfecte el campo de preferencia, con el objetivo de que el olor de animales posicionados en el campo previamente no interfiera con la conducta de los animales.

7.6 Coloque al animal en el centro del campo, asegurándose de que las compuertas estén cerradas. Luego de que el animal se haya tranquilizado, ábralas, de forma que pueda transitar libremente.

7.7 Deje al animal en el campo por el tiempo requerido por su experimento.

7.8 Al finalizar el tiempo de evaluación, coloque al animal en una caja de transporte y devuélvalo a su caja hogar.

#### **Registro de datos**

7.9 El registro del comportamiento de preferencia de los animales debe realizarse con un software de seguimiento del animal, que cuantifique el porcentaje de permanencia en cada contexto y centro. Opcionalmente, se puede evaluar el tiempo de ingreso a cada contexto desde que se deja al animal en el centro del campo de preferencia de lugar,

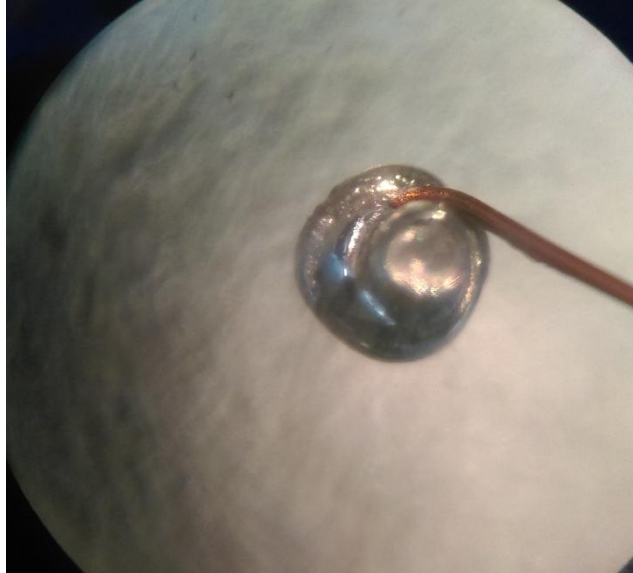
## **8. REFERENCIAS**

Lima, B. F., Ramos, D. C., Barbiero, J. K., Pulido, L., Redgrave, P., Robinson, D. L., ... & Da Cunha, C. (2017). Partial lesion of dopamine neurons of rat substantia nigra impairs conditioned place aversion but spares conditioned place preference. *Neuroscience*, 349, 264-277.

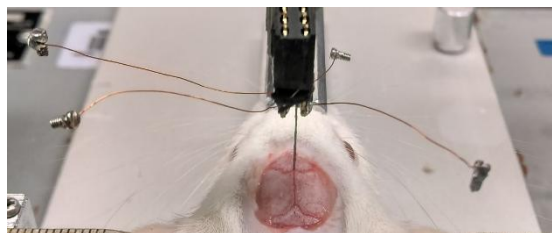
Prus, A. J., James, J. R., & Rosecrans, J. A. (2009). *Conditioned place preference*. En J. Buccafusco. *Methods of behavior analysis in neuroscience*. CRC Press.



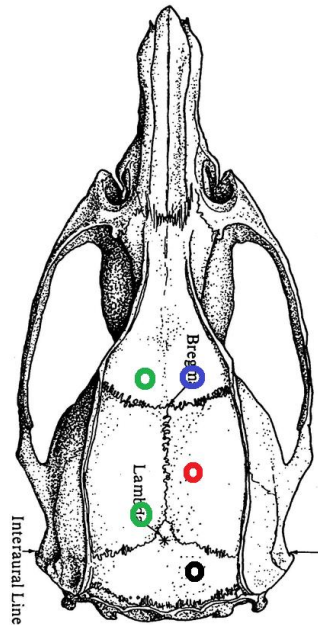
## ANEXO 2: REGISTRO FOTOGRÁFICO



Fotografía 1: Tornillo de anteojos soldado a cable de bovina. (vista en el estereoscopio)



Fotografía 2: Montaje de los electrodos acoplado a conector hembra.



Fotografía 3: Esquema de la distribución de los electrodos en el cráneo. Verde: electrodos frontal y parietal. Azul: Ánodo. Rojo: Electrodo de profundidad. Negro: Electrodo de referencia/ground.



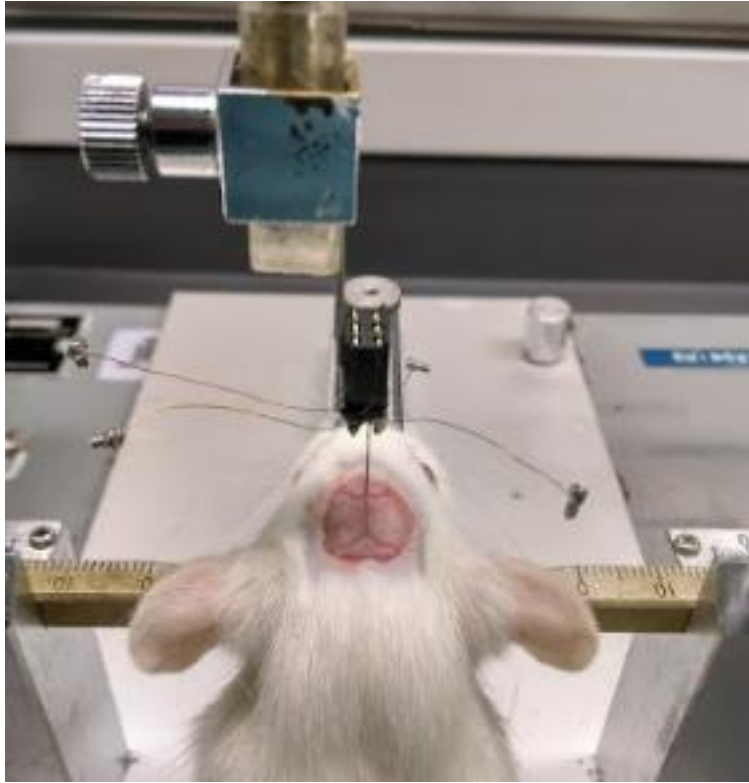
Fotografía 4: Animal montado en dispositivo para cirugía estereotáxica, con el cráneo expuesto.



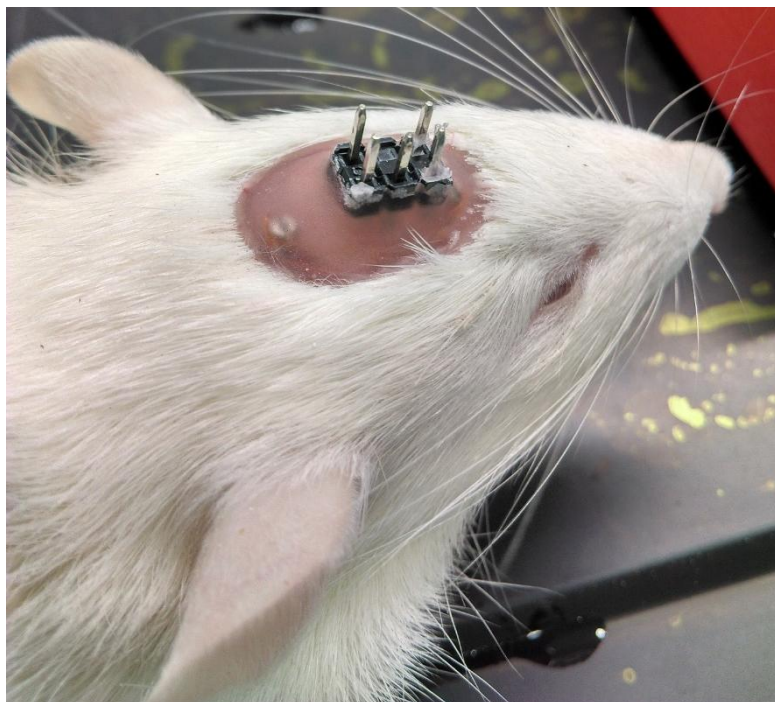
Fotografía 5: Animal montado en dispositivo de cirugía estereotáxica, tras finalizar el implante y fijar los conectores con acrílico dental.



Figura 6: Disposición de los electrodos de registro (tornillos) y de profundidad en el cráneo.



Fotografía 7: Localización de las suturas del cráneo. Electrodo de profundidad localizado sobre bregma. Se puede observar el montaje de los electrodos antes de iniciar el implante.



Fotografía 8: Conectores fijos en el cráneo de la rata. Nótese el casco de acrílico.





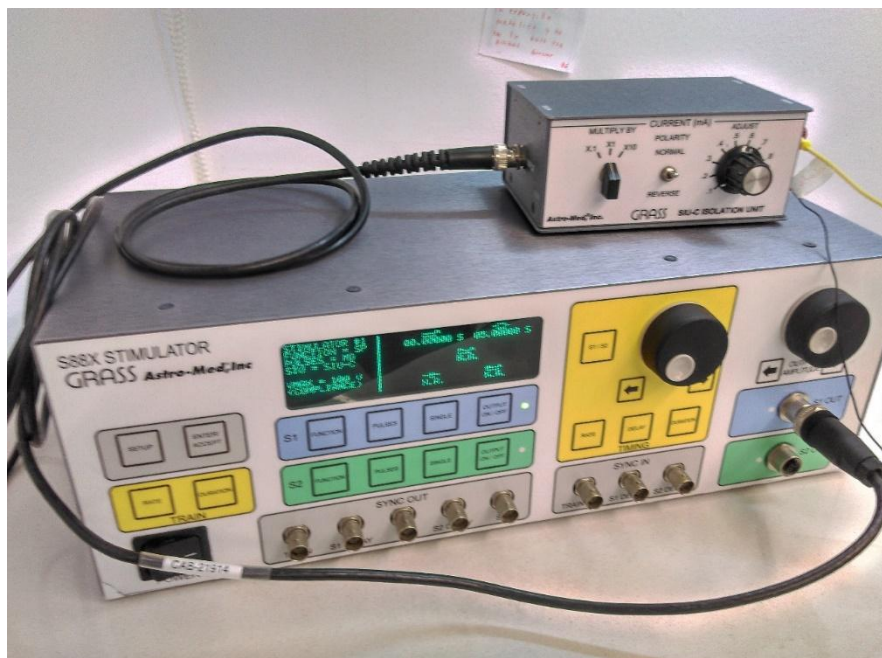
Fotografía 9: Rastro del electrodo de profundidad en el corte de un cerebro de rata.



Fotografía 10: Rastro del electrodo de profundidad en el corte de un cerebro de rata.



Fotografía 11: Rastro del electrodo de profundidad en el corte de un cerebro de rata.



Fotografía 12: Estimulador eléctrico.



Fotografía 13: Rata durante tarea de *nose-poke*.

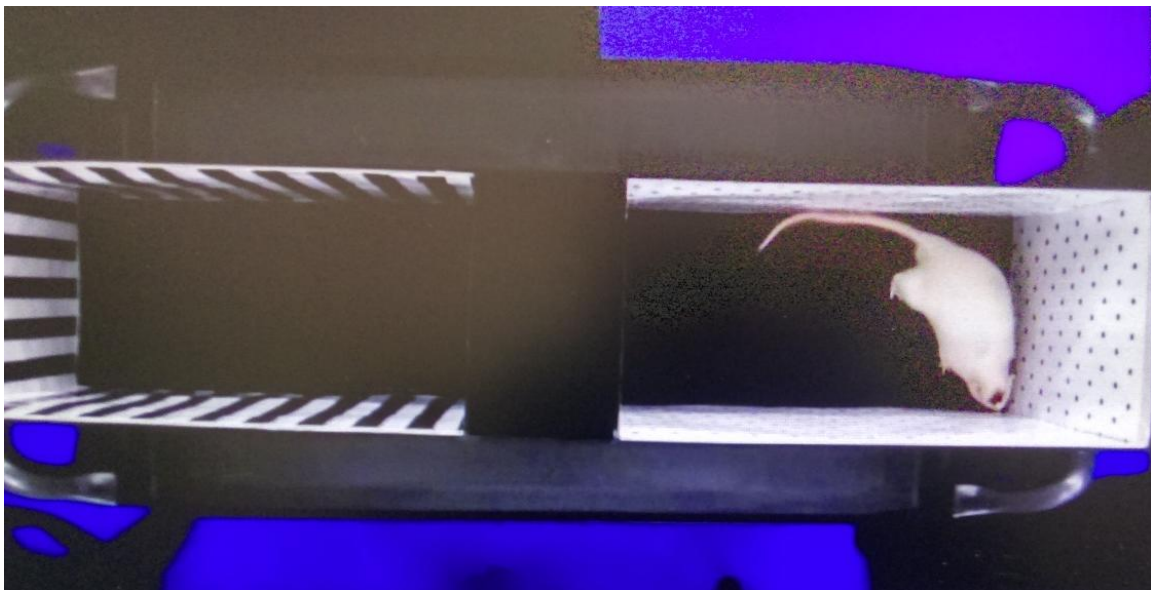


Fotografía 14: Rata durante tarea de *nose-poke*. Muerde los bordes del agujero de estimulación.





Fotografía 15: Rata durante tarea de *nose-poke*.

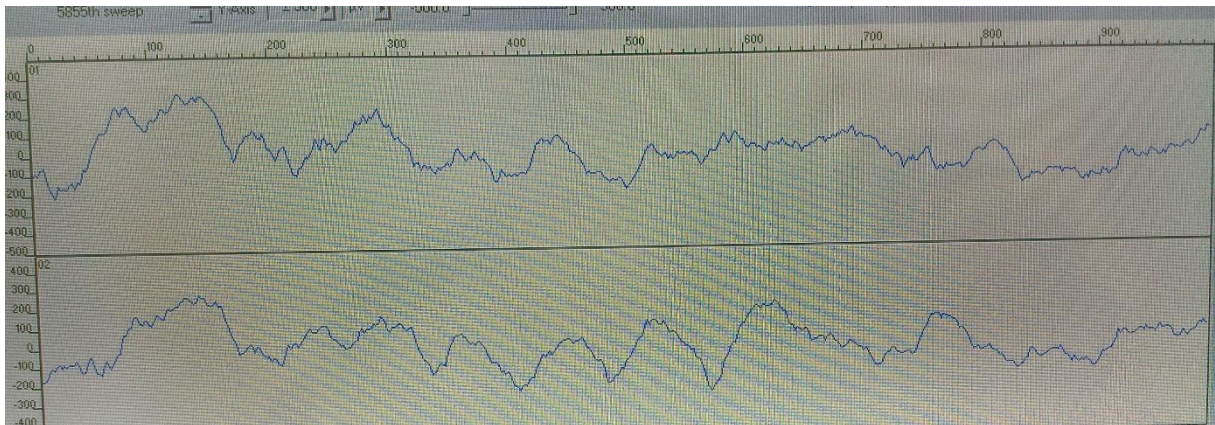


Fotografía 16: Rata en el laberinto de preferencia de lugar.





Fotografía 17: Rata en el laberinto de preferencia de lugar, en el ambiente central.



Fotografía 18: EEG de rata en sueño no-REM. Electrodo sobre lóbulos frontal y parietal.