

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín
Ferreyra INIMEC – CONICET – UNC

DOCTORADO EN NEUROCIENCIAS

El aprendizaje de extinción y la recuperación de
la memoria extinguida en la cría de rata: Un
análisis experimental y contextual

Lic. Damián Alejandro Reville

Directora: Dr. Carlos Arias Grandío

Co-directora: Dra. Gabriela Paglini

Córdoba, Argentina

2017

COMISIÓN ASESORA

Dr. Víctor Molina -

Dr. Adrián Bueno -

Dr. Carlos Arias Grandío -

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y Fecha:

Calificación:

TRIBUNAL

Firma:

Aclaración:

Firma:

Aclaración:

Firma:

Aclaración:

Resumen

Introducción: Normalmente encontramos referencias a la infancia o a las etapas tempranas del desarrollo, como inmadurez. Esta es la forma que predomina también en los abordajes neurocientíficos de distintos aspectos del desarrollo. Específicamente en el estudio de la memoria en la infancia, se describieron una serie de características en las capacidades cognitivas del infante que fueron relacionadas a la inmadurez del hipocampo (Modelo Neuromadurativo). Entre estas características, se destacan la amnesia, o incapacidad para retener y expresar una memoria en el tiempo y la imposibilidad para integrar información contextual a los aprendizajes, que se refleja en la dificultad para utilizar estas claves para desambiguar una memoria. En este modelo, también es común encontrar que la infancia se utilice como estrategia para estudiar el papel del hipocampo en el funcionamiento cognitivo “normal”. En esta línea, Richardson y sus colaboradores, reportaron que las crías de rata no son capaces de recuperar una memoria extinguida (un resultado relacionado a la imposibilidad de utilizar claves contextuales para desambiguar una memoria y al funcionamiento del hipocampo) y concluyeron que el procedimiento de extinción “elimina” la memoria extinguida. La noción de infancia del Modelo Neuromadurativo, incluye tácitamente una referencia de madurez que se encuentra en el funcionamiento adulto. El Modelo Ecológico presenta una aproximación distinta al estudio de la infancia. En términos generales, propone abandonar la noción de inmadurez (y con ésta, la referencia al funcionamiento adulto) y adoptar una mirada ecológica, que parta de una descripción de las características del comportamiento, las necesidades y el contexto en el que se encuentran los infantes en cada momento del desarrollo, para estudiar sus capacidades cognitivas.

Objetivo: Esta diferencia en el punto de partida entre ambos modelos, sugiere que pueden alcanzarse distintas conclusiones acerca de un mismo fenómeno. En esta tesis, nos propusimos analizar las características del aprendizaje de extinción en la infancia de la rata, contrastando las predicciones del Modelo Ecológico con los antecedentes derivados del Modelo Neuromadurativo.

Resultados y conclusión: Replicamos los resultados reportados por el grupo de Richardson, cuando utilizamos parámetros similares a los suyos y coherentes con las premisas del Modelo Neuromadurativo. Cuando ajustamos los parámetros experimentales a las recomendaciones y premisas del Modelo Ecológico, encontramos que las crías de rata predestetadas (DPs17-19) son capaces de recuperar una memoria extinguida en paradigmas de aversión condicionada al sabor y condicionamiento de miedo. Estos resultados nos muestran que las crías de rata son capaces de utilizar el contexto para desambiguar una memoria. Además, nos muestran la medida en que las premisas de los estudios determinan el perfil de los resultados, por lo que no es posible extender las conclusiones más allá de las condiciones experimentales.

ÍNDICE

Índice temático

Resumen.....	4
--------------	---

APITULO 1 - INTRODUCCIÓN

1.1 El Condicionamiento Pavloviano y el estudio de la Memoria como función cognitiva.....	10
---	----

1.2 El “condicionamiento de miedo” como paradigma experimental en el estudio de la neurobiología de la memoria.....	11
---	----

1.3 Neurobiología del aprendizaje de extinción en el “condicionamiento de miedo”.....	13
---	----

1.4 El estudio del condicionamiento contextual y de la extinción pavloviana en la infancia desde el Modelo Neuromadurativo.....	16
---	----

1.5 Pensando y estudiando el desarrollo desde el Modelo Ecológico.....	27
--	----

CAPÍTULO 2 - OBJETIVOS E HIPÓTESIS

2.1 OBJETIVOS.....	31
--------------------	----

Objetivos específicos:.....	32
-----------------------------	----

2.2 HIPÓTESIS.....	33
--------------------	----

CAPÍTULO 3 – SUJETOS Y MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES

3.1 SUJETOS.....	35
------------------	----

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES.....	35
---	----

CAPÍTULO 4 - SERIES EXPERIMENTALES

4.1 PRIMERA SERIE EXPERIMENTAL: FACILITACIÓN DE LA READQUISICIÓN, RSTABLECIMIENTO Y RENOVACIÓN TRAS LA EXTINCIÓN DE UNA RC, EN UN PARADIGMA DE AVERSIÓN CONDICIONADA AL SABOR.....	37
--	----

MATERIALES Y MÉTODOS

Aparatos.....	39
Procedimientos de los Experimentos 1a y 1b.....	39
Procedimientos Experimento 2.....	40
Procedimientos del Experimento.....	41
Análisis de datos.....	41

RESULTADOS

Experimentos 1a y 1b: Readquisición de la respuesta extinguida.....	42
Experimento 2: Renovación de la respuesta extinguida.....	45
Experimento 3: Restauración de la respuesta extinguida.....	46
Sumario de la primera serie experimental.....	47

<i>4.2 SEGUNDA SERIE EXPERIMENTAL: RENOVACIÓN, RESTABLECIMIENTO Y RECUPERACIÓN ESPONTÁNEA EN UN PROCEDIMIENTO DE MIEDO CONDICIONADO</i>	49
---	----

MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES

Aparatos.....	50
Procedimientos del Experimento 4.....	51
Procedimientos del Experimento 5.....	51
Experimentos 5a y 5b.....	51
Experimentos 5c y 5d.....	52
Experimentos 5e y 5f.....	53
Experimento 5g.....	53
Procedimientos del Experimento 6.....	54

Experimento 6a.....	54
Experimento 6b.....	54
Análisis de datos.....	55

RESULTADOS

Experimentos 4a y 4b: Renovación en condicionamiento de miedo.....	56
Experimento 5: Restauración de la respuesta extinguida.....	60
Experimentos 5a y 5b.....	62
Experimento 5c y 5e.....	63
Experimentos 5e y 5f.....	65
Experimento 5g.....	67
Experimento 6: Recuperación espontánea de la respuesta extinguida.....	68
Experimento 6a.....	70
Experimento 6b.....	72
Sumario de la segunda serie experimental.....	71
<i>4.3 TERCERA SERIE EXPERIMENTAL: EFECTOS DE MK-801 SOBRE LA EXTINCIÓN Y SOBRE EL COMPORTAMIENTO DE LAS CRÍAS DE RATA EN UN PARADIGMA DE CONDICIONAMIENTO DE MIEDO.....</i>	<i>77</i>

MATERIALES Y MÉTODOS

Aparatos.....	78
Procedimientos del Experimento 7.....	78
Procedimientos del Experimento 8.....	78
Experimento 8a.....	78

Experimento 8b y 8c.....	79
Experimento 8d y 8e.....	75
Procedimientos del Experimento 9.....	80
Análisis de datos.....	80

RESULTADOS

Experimento 7: Efectos del MK-801 en el condicionamiento de una memoria de miedo.....	81
Experimento 8: Efectos del MK-801 en extinción de una respuesta condicionada de miedo.....	86
Experimento 8a: MK-801 0.1 mg/kg 30 minutos antes de la extinción.....	86
Experimento 8b: MK-801 0.1 mg/kg 30 minutos antes de la extinción, 6 ensayos de condicionamiento.....	88
Experimento 8c: MK-801 0.1 mg/kg 30 minutos antes de la extinción, 2 ensayos de condicionamiento.....	90
Experimento 8d: MK-801 en extinción 0.05 mg/kg 30 minutos antes de la extinción.....	93
Experimento 8e: MK-801 0.1 mg/kg inmediatamente después de la extinción.....	94
Experimento 9: efectos del MK-801 en la Renovación de una RC extinguida.....	96
Sumario de la tercera serie experimental.....	99
CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN.....	101
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	110

Índice de tablas

Tabla 1. Diseños experimentales de la primera serie experimental.....	38
Tabla 2. Diseño experimental, Experimentos 4a y 4b. Renovación en condicionamiento de miedo.....	60
Tabla 3. Diseño experimental, Experimentos 5a-5g. Restauración en condicionamiento de miedo.....	61
Tabla 4. Diseño experimental, Experimentos 6a y 6b. Recuperación espontánea en condicionamiento de miedo.....	69
Tabla 5. Diseño experimental, Experimento 7.....	81
Tabla 6. Diseño experimental, Experimentos 8a-8e. Efecto del MK-801 sobre la extinción.....	85
Tabla 7. Diseño experimental, Experimento 9.....	97

CAPÍTULO 1 - INTRODUCCIÓN

1.1 El Condicionamiento Pavloviano y el estudio de la Memoria como función cognitiva

En un intento por entender el funcionamiento del cerebro, la neurociencia asumió la metáfora del “procesador de información” y estudió al cerebro como el órgano encargado de procesar la estimulación proveniente del ambiente y preparar al organismo para emitir una respuesta determinada. Un cerebro así, cumple la función de una computadora en la coordinación de los movimientos de una máquina. En este esquema, la estimulación del organismo es pensada como información y la actividad neuronal, como comunicación, procesamiento y transmisión de información de una región del cerebro a otra y al resto del organismo, hasta que se expresa en forma de comportamiento. Esta dinámica de procesamiento de información, va generando cambios en la organización y funcionamiento del cerebro, que son entendidos como “memoria”. Las memorias, a su vez, pueden ser más efímeras o duraderas, automáticas o conscientes, rígidas o flexibles, etc. dependiendo de las características de la estimulación, de las áreas del cerebro que participen en el procesamiento de la información y de la experiencia del individuo. Finalmente, ante una estimulación particular, el organismo responde en función de estas memorias.

Una estrategia muy utilizada, principalmente en los últimos 40 años, para imaginar y construir esta función del cerebro, es el estudio de las bases neurobiológicas del aprendizaje asociativo, sugerida por Pavlov en la década de 1920 (Pavlov, 1927). Las ventajas del Condicionamiento Clásico o Pavloviano como herramienta para el estudio anátomo-funcional del cerebro, se derivan de que es un procedimiento simple que permite manipular un número pequeño de variables dentro de un diseño experimental, controlando la intervención no deseada de otras variables. De esta manera, resulta posible realizar predicciones con un cierto grado de confianza y replicabilidad. El Condicionamiento Clásico consiste en la presentación de un estímulo neutro o Estímulo Condicionado (EC), en contigüidad con otro estímulo que tiene una mayor relevancia

biológica (Estímulo Incondicionado o EI). En el estudio de las bases neurobiológicas de la memoria de miedo, por ejemplo, usualmente se trabaja con ratas a partir de un protocolo de “condicionamiento de miedo”, en el que el EC es un tono y el EI, una descarga eléctrica. En este procedimiento, las ratas aprenden rápidamente a responder a esa relación entre el tono y la descarga eléctrica, y expresan una serie de comportamientos y respuestas fisiológicas y hormonales ante presentaciones subsiguientes del EC, que son entendidas como “respuestas de miedo” o indicadores de un estado emocional de miedo (Respuesta Condicionada o RC). La respuesta que normalmente se analiza como indicador de miedo es la respuesta de congelamiento o “freezing” (Maren, 2008).

1.2 El “condicionamiento de miedo” como paradigma experimental en el estudio de la neurobiología de la memoria

Los primeros estudios de condicionamiento de miedo pueden encontrarse en las primeras décadas del siglo XX, de la mano de Vladimir Mikhailovich Bekhterev (1857-1927), un investigador Ruso que, al igual que Pavlov, trabajaba con reflejos condicionados y que ya comenzó a relacionar el hipocampo con la función mnésica (Byford, 2016). No fue hasta que esperó varias décadas hasta que otro investigador, Robert C. Bolles, llevó a cabo una serie de estudios sistemáticos sobre el condicionamiento de miedo que influyó significativamente en la manera en la que es usado hoy este tipo de procedimiento (Warren and Bolles, 1967, Bolles, 1968). Este autor comenzó a focalizar sus estudios en el comportamiento de ratas ante descargas eléctricas, mientras trataba de buscar un índice comportamental independiente del estado emocional de “miedo”, con el fin de poder esclarecer el hipotético rol del miedo sobre el inicio del comportamiento, y sobre el comportamiento de evitación (Warren and Bolles, 1967, Bolles, 1968, Bolles and Riley, 1973, Bolles and Collier, 1976). En esta época Bolles abandonó la idea de encontrar un potencial indicador del miedo en respuestas autonómicas, como la respuesta cardíaca o la conductividad de la piel, y comenzó a focalizarse en el comportamiento del animal. En una

serie de publicaciones que marcaron tendencia para las siguientes décadas, Bolles concluyó que las respuestas que habían sido medidas en los estudios del miedo en los 60 años previos eran respuestas defensivas específicas de la especie (Bolles, 1970), y que eran mejor entendidas como respuestas condicionadas que como operantes (Bolles and Collier, 1976, Sigmundi et al., 1980). Esta idea empezó a trasladarse al campo, y fue extendiéndose hacia el estudio de los trastornos de ansiedad, que empezaron a pensarse en un sentido pavloviano, como condicionamientos de miedo.

Un estudiante de Bolles, Michael Fanselow, fue otro investigador fundamental en el estudio del condicionamiento de miedo desde una perspectiva neurobiológica. Durante la década de los 80 sus estudios se centraron fundamentalmente en el análisis farmacológico del condicionamiento de miedo (Bolles and Fanselow, 1982, Fanselow and Cramer, 1988). Con la llegada de la denominada “década del cerebro” (años 90), Fanselow se constituye como uno de los investigadores más influyentes en el análisis de los circuitos cerebrales involucrados en el condicionamiento de miedo (Fanselow, 1994, Maren et al., 1994, Maren et al., 1996a, Maren et al., 1996b, Maren and Fanselow, 1996, Maren et al., 1997). Desde entonces hasta la actualidad los neurocientíficos han ido refinando las áreas específicas que participan en las respuestas condicionadas aisladas en los estudios de laboratorio, los sistemas neuroquímicos involucrados, y más recientemente, los cambios celulares y moleculares concomitantes con estas respuestas. A partir de una serie de estudios, los investigadores fueron construyendo una hipótesis sobre los mecanismos involucrados en el condicionamiento de miedo, que tiene las siguientes características generales (Kim and Jung, 2006, Krasne et al., 2011, Knapska et al., 2012, Orsini and Maren, 2012): 1) la información del EC y del EI, se reúnen en el núcleo lateral de la amígdala (BLA); 2) La información del EC llega desde una región del tálamo y de la corteza asociativa auditiva; 3) El mecanismo molecular implicado en la formación de la memoria de miedo incluye la activación de los receptores -AMPA y NMDA- de glutamato; 4) Cuando la estimulación provocada por el EC llega desde la regiones auditivas a las neuronas del núcleo lateral de la amígdala, activa sus receptores AMPA y activa un mecanismo de memoria de corto plazo; 5) La llegada de la información del EI

desde el tálamo y la corteza somato-sensitiva a las neuronas del mismo núcleo, activa los receptores NMDA y, con éstos, un circuito que desencadena la síntesis de nuevas proteínas en el núcleo de estas neuronas; 6) Luego, estas proteínas van hacia las sinapsis y estabilizan la conexión con la entrada presináptica, modificando el intercambio entre estas neuronas y dando lugar a un mecanismo de memoria a largo plazo, que representa la asociación EC-EI.

1.3 Neurobiología del aprendizaje de extinción en el “condicionamiento de miedo”

Observando al organismo entero, lo que describimos hasta aquí es la experiencia de haber reaccionado a una agresión (EI) “provocada” por (o contingente con) un estímulo (EC). Esta experiencia genera los cambios anatómicos y funcionales entre las neuronas de la amígdala y sus aferencias, que se entienden como mecanismos de la memoria de este evento. Una vez formada esta memoria, el organismo comienza a interactuar de forma particular con el EC. En las primeras experiencias, mostrará una reacción defensiva (RC), que progresivamente dejará de emitir en la medida que el EI ya no aparezca después del EC (Chang et al., 2009). Este efecto se denomina “extinción” (Pavlov, 1927). En adelante, el organismo responderá al EC de distintas maneras dependiendo, entre otras cosas, del contexto en el que se encuentre (Bouton and King, 1983, Bouton, 1988, 2002, 2004). En estudios de laboratorio, se describió que la respuesta del organismo es coherente con el aprendizaje de extinción cuando los animales son reexpuestos al EC en el contexto de extinción, mientras que en contextos diferentes la respuesta del organismo es coherente con el aprendizaje de condicionamiento (Bouton, 2002, 2004). Volviendo al mecanismo, se propone que, durante la fase inicial de la extinción el EC aumenta la actividad de algunas neuronas del Núcleo Basolateral de la Amígdala (BLA) (expresión de la RC en el organismo), que disminuye a medida que se repite el EC (extinción). Durante la extinción, a su vez, aumenta la actividad de otras neuronas del BLA, lo que representa la formación de la memoria de extinción (podemos imaginar la relación de tipo inhibitoria, EC-no EI)

(Kim and Richardson, 2010b, Orsini and Maren, 2012, Delamater and Westbrook, 2014). Aquí el funcionamiento del mecanismo se vuelve interesante, porque es el mismo EC el que está involucrado en dos memorias distintas y contradictorias (EC-EI y EC-no EI). Dado que no se expresan las dos al mismo tiempo, sino que el organismo sigue interactuando de manera eficiente con el EC, fue necesario proponer la participación de otras áreas del cerebro en este mecanismo.

Para encontrar pistas de las nuevas estructuras vinculadas al mecanismo de extinción de la memoria de miedo, los investigadores recurrieron nuevamente al condicionamiento clásico. Hasta ahora dijimos que, luego de la fase de condicionamiento (presentación EC-EI), la presentación repetida del EC (fase de extinción) extingue la RC. También dijimos que la extinción es un nuevo aprendizaje, que podemos imaginar como la relación inhibitoria EC-no EI, que compite pero no elimina el aprendizaje anterior (EC-EI). Esta conclusión se deriva del hecho de que el organismo vuelve a emitir la RC original después de la extinción. Intentando comprender el efecto de extinción, se describieron muchas condiciones que propician la recuperación de la RC, como el paso de tiempo sin nuevos entrenamientos de extinción (recuperación espontánea), el encuentro con el EC en un contexto diferente de aquel en que se aprendió la extinción (renovación ABA, AAB o ABC) o una nueva experiencia con el EI o un estímulo similar (restauración) (Bouton, 1993, 2002, 2004). Estos tres efectos, recuperación espontánea, renovación y restauración, son los fenómenos de recuperación de la extinción más conocidos y más estudiados. En todas estas condiciones, se asigna un papel fundamental al contexto. En el procedimiento de condicionamiento de miedo, todos los estímulos que conforman el escenario del experimento, a excepción del EC y el EI, son considerados claves contextuales, constantes y difusas, que definen la experiencia de aprendizaje. Estos estímulos incluyen claves espaciales, pero también temporales o interoceptivas, entre otras (Bouton, 1993, Reville et al., 2015). De este modo se intenta dar cuenta de que toda experiencia de aprendizaje ocurre en un lugar determinado, en un momento específico, mientras el organismo (sujeto de la experiencia) se encuentra en un estado emocional y fisiológico particular (estrés, saciedad, estado de conciencia, etc), aspectos que determinan el tipo de

interacción que el organismo mantiene con el EC. En este sentido, la recuperación espontánea se relaciona a un cambio de contexto temporal, la renovación a un cambio de contexto espacial y el restablecimiento a un cambio en la fuerza asociativa del contexto (Bouton, 1993, 2002, 2004).

La importancia que en la actualidad recibe el contexto en el estudio de la extinción no podría entenderse sin los aportes de Mark Bouton, quien estudió también con Robert Bolles. En los años 80 este autor describió el fenómeno de renovación y también en la década del cerebro su grupo de investigación, siguiendo los aportes de Fanselow, ligó el hipocampo con la recuperación de la extinción (restablecimiento) (Wilson et al., 1995). Durante las siguientes décadas se fue profundizando en el rol del hipocampo en el aprendizaje contextual y en la extinción. En la actualidad se asume por muchos investigadores que toda esta estimulación sensorial llega al cerebro y se reúne en el hipocampo, donde se forma una “representación configuracional” del contexto (Rudy, 2009). Luego, esta representación interactúa con otras representaciones, como por ejemplo la memoria de miedo EC-EI, o la memoria EC-no EI, que se formaron en el BLA y modula la actividad de las neuronas de este núcleo (Quirk and Mueller, 2008, Orsini and Maren, 2012, Delamater and Westbrook, 2014). La modulación de las neuronas de la BLA por el hipocampo, puede ocurrir de manera directa por señales desde el hipocampo hacia las neuronas del BLA, dando lugar a la activación del EC y la expresión de la RC; o indirectamente mediante proyecciones hacia la CPF que, a su vez, se conectan con las neuronas del BLA. La región infralímbica de la CPF se conecta con las neuronas intercaladas inhibitorias en la amígdala, que limitan la activación de las neuronas del Núcleo Central de la Amígdala (CE) proveniente del BLA (Quirk and Mueller, 2008, Orsini and Maren, 2012, Delamater and Westbrook, 2014). De esta manera, la estimulación provocada por la presencia del EC es inhibida por la información contextual y el organismo no expresa la RC. La región prelímbica de la CPF se conecta con el BLA y activa el circuito de expresión de la memoria de miedo, mediante la activación del CE y da lugar a la RC ante la estimulación provocada por el EC en un contexto diferente al de extinción (Quirk and Mueller, 2008, Orsini and Maren, 2012, Delamater and Westbrook, 2014). De esta

forma, se describió la extinción como un aprendizaje nuevo, de tipo inhibitorio, que demanda la activación de un circuito neuronal complejo, en el que es fundamental el procesamiento de claves contextuales por parte del hipocampo y la modulación de la actividad de la amígdala por parte de la CPF.

1.4 El estudio del condicionamiento contextual y de la extinción pavloviana en la infancia desde el Modelo Neuromadurativo

La producción de un mecanismo neuronal para el aprendizaje de extinción, así como la descripción comportamental de este efecto en etapas tempranas del desarrollo, ha recibido muy poca atención por parte de los investigadores en el campo, en comparación con los esfuerzos dedicados al estudio con animales adultos. Sólo 32 estudios se dedicaron a describir y comprender el efecto de extinción durante la infancia de la rata y dos en bebés humanos. Los primeros estudios fueron desarrollados en las décadas de 1960 y 1970, con un interés principal en describir el fenómeno en términos puramente comportamentales, y en establecer algunas posibles comparaciones ontogenéticas a partir de lo que se conocía a partir de los estudios con animales adultos.

Fue a partir de la década de 1990, coincidiendo con los avances de Bouton y Fanselow en la comprensión de los mecanismos neurobiológicos del aprendizaje contextual y de la extinción, cuando Jerry Rudy, un importante investigador relacionado con la Sociedad Internacional de Psicobiología del Desarrollo, enfrentó el estudio del aprendizaje de extinción y contextual en la infancia de la rata. Durante las décadas de los 70 y 80 este autor realizó numerosos estudios sobre fenómenos de aprendizaje asociativo (Hyson and Rudy, 1984, Rudy and Hyson, 1984, Vogt and Rudy, 1984b, a, Camp and Rudy, 1985, Moye and Rudy, 1985). A finales de los años 80 el autor se involucra en una serie de investigaciones sobre el rol del hipocampo en algunos fenómenos de aprendizaje y memoria en ratas adultas (Rudy and Sutherland, 1989, Sutherland et al., 1989), y pocos años después realiza su primer estudio de extinción en ratas infantiles (Carew and Rudy,

1991) y el estudio ontogenético más citado sobre el aprendizaje contextual (Rudy and Morledge, 1994), cuyos resultados fueron cuestionados en publicaciones posteriores del mismo autor, que tuvieron mucho menos repercusión (Pugh and Rudy, 1996, Beane et al., 2002). Rudy y colaboradores terminan concluyendo sobre cómo una hipotética inmadurez del hipocampo afecta estos aprendizajes, aunque llamativamente, en ninguno de ambos estudios se recoge algún dato que tenga que ver con la manipulación o registro de actividad del hipocampo (Carew and Rudy, 1991, Rudy and Morledge, 1994). La interpretación de los resultados y conclusiones (también los diseños experimentales y los procedimientos), como desarrollaremos más adelante, se sostienen en una visión particular del desarrollo que marcaron una tendencia que terminó por convertirse en hegemónica en la neurociencia en las décadas siguientes. Esta perspectiva, que denominaremos Neuromadurativa (Rovee-Collier and Giles, 2010), considera que el estudio ontogenético es una “técnica” que permite acceder a información específica acerca del “desarrollo” de las capacidades de plasticidad y memoria del cerebro, asumiendo que éstas son funciones o capacidades de determinadas estructuras y/o circuitos cerebrales que no se desarrollan (al menos en términos funcionales) al mismo tiempo y que alcanzan un equilibrio o funcionamiento óptimo en la edad adulta.

Carew y Rudy (1993) analizaron las diferencias en el papel del contexto en el aprendizaje, entre ratas de 17-20 y 20-23 días de vida postnatal en un procedimiento de condicionamiento apetitivo. Los experimentos tuvieron lugar en una caja de plástico, en la que las crías eran puestas de manera individual. El entrenamiento consistía en 10 presentaciones de emparejamiento EC-EI por día, el EC era una vibración en el piso de la caja y el EI, 0.1 ml de una solución dulce administrada directamente en la boca de las crías, a través de una cánula que se le implantaba en el cachete. La extinción y evaluación se llevaron a cabo el cuarto día de experimento. La variable dependiente que los investigadores tomaron como indicador de aprendizaje fue el tiempo que las crías pasaban haciendo movimientos con la boca (abrir y cerrar la boca y lameteo) durante la presentación del EC. Los autores reportaron un efecto de resaturación de la RC extinguida en crías de rata de 17-20 días de vida postnatal (DP17-20), que interpretaron como un

efecto de condicionamiento de contexto, y un efecto de renovación ABA en ratas DP20-23, pero no en ratas DP17-20. Este resultado fue analizado como evidencia de que el contexto puede ser utilizado para “desambiguar” una memoria por ratas DP20, pero no por ratas DP17 y que esta diferencia indica diferencias en el desarrollo funcional del hipocampo (Carew and Rudy, 1991).

De esta forma, los autores marcaron una diferencia con la manera en que se pensaba el desarrollo del sistema nervioso y propusieron un modelo alternativo. La propuesta vigente proponía que hasta que se desarrollase funcionalmente el hipocampo, en el DP21 de la rata, las memorias de eventos concretos carecerían de referencias contextuales (temporales y espaciales). El nuevo modelo, en cambio, considera que las diferentes funciones que tiene el contexto en animales adultos pueden aparecer en distintos momentos del desarrollo, aún antes de que el hipocampo complete su maduración. Estas conclusiones son comparables a la interpretación de los estudios de lesión del hipocampo del grupo de Bouton, que encontraron que la lesión del formix no afectó la renovación, pero sí el restablecimiento (Wilson et al., 1995), lo que hace visible la lógica de considerar al organismo infante como un adulto con una lesión anatómica.

Posteriormente otro grupo de investigadores describió, entre los años 1999 y 2001, una serie de cambios en el aprendizaje de inhibición de respuesta en un procedimiento de extinción y en el mecanismo neuronal relacionado con este aprendizaje, que incluye el hipocampo y la CPF, durante la segunda y tercer semana de vida de la rata (DPs 11-17) (Lilliquist et al., 1999, Nair and Gonzalez-Lima, 1999, Nair et al., 2001). Para estudiar el desarrollo del aprendizaje inhibitorio, los investigadores utilizaron un procedimiento de condicionamiento operante. El dispositivo utilizado para el entrenamiento de las crías de rata (representado en la Imagen 1) fue un pasillo, al final del cual se colocaba a la madre anestesiada detrás de una puerta. La tarea consistía en atravesar el pasillo para encontrarse con la madre. Cada cría tenía colocada una cánula en la mejilla, a través de la cual se infundía leche cuando encontraba un pezón de la madre, como reforzamiento. El entrenamiento consistió en una sucesión de ensayos reforzados y no reforzados, mientras en los ensayos reforzados la cría alcanzaba a su madre y recibía

una gota de leche en la boca, en los ensayos no reforzados la puerta de la madre permanecía cerrada y la cría no conseguía alcanzarla ni recibía la leche. La única clave que señalaba la presencia de la madre al final del pasillo (es decir, si se trataba de un ensayo reforzado o no reforzado), era el resultado del ensayo anterior. El objetivo del entrenamiento era que las crías aprendieran a discriminar qué consecuencia iba a tener su comportamiento y, de esa manera, recorrer o no el pasillo. La variable que se consideró como indicador de aprendizaje fue la velocidad con la que las crías recorrían el pasillo y se hicieron comparaciones entre los primeros y los últimos ensayos, tanto en la adquisición del aprendizaje como en la extinción. Antes de la fase de extinción, las crías fueron inyectadas con fluorodeoxyglucose (FDG) para observar luego las regiones del cerebro que se activaron durante la resolución de la tarea (Lilliquist et al., 1999, Nair and Gonzalez-Lima, 1999, Nair et al., 2001).

Los investigadores encontraron que las crías de rata DP17 aprenden a inhibir una respuesta operante (extinción) de manera más rápida y ajustada al tipo de entrenamiento, que las crías DP12. Además encontraron diferencia entre edades en la activación del hipocampo y la CPF. Las crías de rata DP17, a diferencia de las crías DP12 y de los grupos control de la misma edad, mostraron un circuito funcional durante la extinción que incluye el sistema septohipocampal (CA1 y CA3), el área tegmental ventral, el hipotálamo lateral y los cuerpos mamilares (Gonzales-Lima, 1999), así como la CPF medial, COF y CCA (Nair et al., 2001). Estos resultados indican que los cambios funcionales en el circuito septohipocampal que ocurren durante la tercera semana de vida de la rata, permiten un aprendizaje inhibitorio más rápido durante la extinción. Además, las cortezas prefrontal medial, orbitofrontal y cingular anterior están asociadas a la adaptación del comportamiento a los cambios contextuales, es decir, con la flexibilidad comportamental. Esto permitió a los autores concluir que la flexibilidad comportamental mostrada por las ratas DP17 en el entrenamiento de extinción, está relacionada con los cambios funcionales en los circuitos septohipoampal y prefrontal, que tienen lugar durante la tercera semana de vida postnatal de la rata (Nair et al., 2001).

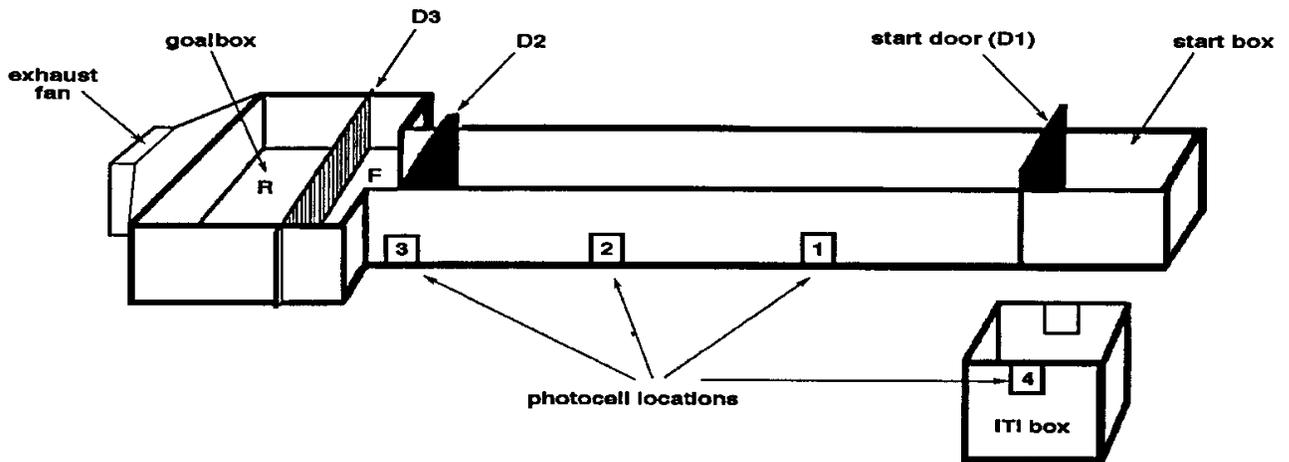


Imagen 2: Aparato utilizado por Gonzales-Lima en sus estudios de extinción en crías de rata. Tomado de Nair y Gonzalez-Lima, 1999.

En el año 2007 Michael Fanselow se reunió con un grupo de investigadores de gran relevancia en el campo de la psicobiología del desarrollo, en un simposio en el que analizaron la posible relación del hipocampo con la emergencia ontogenética de los distintos roles de esta estructura en el aprendizaje y memoria contextual (Hunt et al., 2007). Uno de estos investigadores era Rick Richardson, un científico con una larga trayectoria en el estudio de la ontogenia de la memoria. En el mismo año, Yap y Richardson recuperaron el estudio de Carew y Rudy de 1991 y propusieron analizar el efecto de renovación en crías de rata DP17 en un paradigma de miedo condicionado (Yap and Richardson, 2007). Esta propuesta, además de la discusión teórica acerca del rol del contexto en el aprendizaje en la ontogenia, incorporó la expectativa acerca de los posibles usos clínicos del procedimiento de extinción en el tratamiento de trastornos de ansiedad.

Para estudiar las características del aprendizaje de extinción en la infancia, los investigadores diseñaron una serie de experimentos en los que analizaron el efecto de renovación ABA y AAB en ratas de 17-19 y 23-25 días de vida postnatal, en un procedimiento de condicionamiento de miedo. El condicionamiento consistió en una presentación del EC (un olor) durante 10 segundos, seguida por una descarga eléctrica (EI)

de 0.6 mA y un segundo de duración. Durante la fase de extinción, los animales fueron expuestos al EC una (DP17) o tres (DP23) veces, durante 10 minutos. Para la evaluación, los animales fueron expuestos al EC durante 2 minutos, 10 minutos después de haber sido expuestos al contexto de evaluación por dos minutos. Cada fase (condicionamiento, extinción y test) tuvo lugar en días diferentes consecutivos o separados. La separación de las fases consistió en condicionamiento en DP17, extinción en DP18 o 22 y test en DP23. Los resultados indicaron que los animales que recibieron el entrenamiento completo después del DP23, o que pasaron la fase de condicionamiento el DP17 y las fase de extinción y test los DPs 22 y 23, mostraron renovación ABA pero no AAB. Mientras que los animales que recibieron el entrenamiento completo entre los DPs 17-19, o que pasaron las fases de condicionamiento y extinción los DPs 17 y 18 y el test el DP23, no mostraron renovación en ninguna de las dos condiciones (ABA o AAB). Los autores relacionaron estos resultados con los reportes de la literatura que muestran que la lesión del hipocampo dorsal afecta la dependencia de contexto de la extinción en ratas adultas y concluyeron que la ausencia de renovación de la RC extinguida en crías de rata, señala un estado de inmadurez del hipocampo. A continuación, sugirieron que estos resultados podrían estar indicando que el entrenamiento de extinción lleva a un “desaprendizaje” o borrado de la memoria EC-EI, en crías de rata de 17 días (Yap and Richardson, 2007). Si esto es así, entonces mostraría que existen diferencias cualitativas en el desarrollo en los mecanismos neuronales y asociativos implicados en la extinción, lo cual tendría una relevancia clínica muy grande.

Es importante remarcar que Yap y Richardson sostuvieron estas conclusiones a partir de esta serie experimental, que es el primer análisis de la extinción en condicionamiento de miedo en ratas infantiles, cuyos resultados son exclusivamente comportamentales y no presentan evidencias directas del estado de funcionamiento del hipocampo. Además, contradicen y no discuten las evidencias presentadas por el grupo de Gonzalez-Lima y, fundamentalmente, contradicen la única evidencia reportada hasta ese momento de renovación en bebés humanos. En el año 2005, Cuevas y Rovee-Collier mostraron renovación ABA y ABC en bebés de 3 meses de edad, en un procedimiento de

condicionamiento operante (Cuevas et al., 2005, Cuevas et al., 2016). Yap y Richardson sugirieron que esos resultados eran comparables con sus hallazgos en ratas de 23 días de edad y remarcaron el interés en averiguar si bebés más jóvenes, de 1 o 2 meses de edad, mostraban el efecto de renovación o si, como las ratas de 17 días, mostraban un efecto de extinción independiente de contexto¹. A continuación, repitieron que sus resultados encierran un potencial significado terapéutico así como teórico en el marco del aprendizaje de extinción.

En adelante, el grupo de investigadores liderado por R. Richardson se abocó a la descripción del efecto de extinción en la infancia de la rata como un fenómeno asociativa y neurobiológicamente diferente al descrito en animales adultos, que tiene como consecuencia el borrado de la memoria y, a raíz de eso, potenciales aplicaciones terapéuticas para el tratamiento de trastornos de ansiedad. El procedimiento experimental en los siguientes estudios de extinción (Kim and Richardson, 2007b, a, 2008, 2009, 2010a), varió respecto del primer estudio de Yap y Richardson (2007) y consistió, de forma casi homogénea, en 6 (DP16/17) o 3 (DP23/24) ensayos de condicionamientos (tono-EC de 10 segundos seguido de una descarga eléctrica de 0.6 mA), 30 ensayos de extinción (EC 10 segundos) separados por un intervalo de 10 segundos y un ensayo de extinción de 2 minutos de presentación del EC. Es importante señalar algunas manipulaciones en los estudios del grupo de Richardson, que se podrían considerar atípicas en la literatura. Por ejemplo, si un animal pasa más del 50% del tiempo de la línea base haciendo la conducta de “freezing”, el animal se retira de la caja, y regresa a la jaula hogar, durante 5 o 10 min, y después se le vuelve a situar en la caja experimental para medir otra vez la línea base. Este procedimiento se hace en este laboratorio, y dependiendo del estudio se puede llegar a repetir hasta en 5 ocasiones (Yap and Richardson, 2007), alegando que si la rata muestra altos niveles de *freezing* en la línea base “es difícil” evaluar la respuesta ante el EC (Kim and Richardson, 2007a). Los

¹ Cita textual, Yap y Richardson, 2007. p573. “*It should be noted, however, that the PN23 rats in this study performed similarly to the 3-month-old human infants in the study by Cuevas et al. (2005) in that they exhibited ABA renewal. From this perspective, the question of interest is whether younger human infants would behave like PN18 rats in this study and fail to exhibit renewal. It remains to be seen whether human infants trained at 1 or 2 months of age exhibit renewal of an extinguished instrumental response*”.

investigadores siempre utilizan la misma caja (13.5 cm de largo · 9 cm ancho · 9 cm alto) para las crías de 17 y de 23 días, cajas que dejan considerablemente más espacio a los sujetos más jóvenes. En numerosos experimentos faltan los grupos control que completan los diseños factoriales, o se hacen comparaciones bajo exactamente las mismas condiciones de la ejecución en la prueba de los animales de diferentes grupos de edad. Además, los ECs (tono) tienen una duración muy distinta en las fases de condicionamiento y extinción (10 sec) que en la prueba (2 minutos). En ningún experimento se mostró una variable distinta a la respuesta total de *freezing* durante los dos minutos de evaluación, y en ningún experimento los contextos fueron enriquecidos con olores. Bajo estas condiciones se mostraron claras evidencias de que las ratas de 23 días podían recuperar la RC después de la extinción, y que las crías de 17 días no. Pero no se hizo ningún intento de modificar los parámetros para aumentar la sensibilidad de la prueba para detectar este efecto en PD17.

En estos estudios, ya no discutirán con Rovee-Collier ni con otros investigadores que reportaron evidencias contradictorias a su proyecto de extinción en la infancia, sino que se dedicarán a construir un modelo en el que la extinción puede ser utilizada, en sí misma o acompañada por distintos psicofármacos, como herramienta terapéutica para el borrado de memorias de miedo, extenderán sus publicaciones hasta revistas importantes de Psiquiatría (Quirk et al., 2010) y, basándose en su hipótesis, llegarán a participar ensayos farmacológicos con niños de 5 a 14 años, utilizando un agonista glutamatérgico potencialmente tóxico (Byrne et al., 2015). Entre los años 2007 y 2016 publicaron 16 artículos en los que mostraron que, 1) a diferencia de ratas de 23 días de vida postnatal, las crías entre los DPs 16-19 no muestran renovación ni restauración después de la extinción de una RC (Kim and Richardson, 2007a, Yap and Richardson, 2007); 2) la manipulación de los receptores GABA y NMDA altera el condicionamiento de una RC pero no su extinción, lo cual sugiere que no se trataría de un aprendizaje nuevo (Kim and Richardson, 2007b, Langton et al., 2007, Kim and Richardson, 2010a); 3) la inhibición de la CPF y la administración de un agonista inverso del GABA durante el test no altera la “expresión” de la extinción, lo cual indica que no sería una inhibición de la RC (Kim and

Richardson, 2007b, 2010b); y, finalmente, 4) que no hay actividad de la CPF durante la adquisición y expresión de la extinción, pero sí de la amígdala (Kim and Richardson, 2009, 2010b), lo cual indicaría un efecto de desaprendizaje o borrado de la memoria original que tiene lugar en la amígdala. Además, en los últimos experimentos, mostraron que distintos tratamientos de estrés durante el crecimiento de las ratas (DPs 2-14), provocan una “maduración temprana” del mecanismo neurobiológico de miedo, dando lugar a un patrón de extinción similar al adulto (renovación ABA) en crías DP17 (Callaghan and Richardson, 2012).

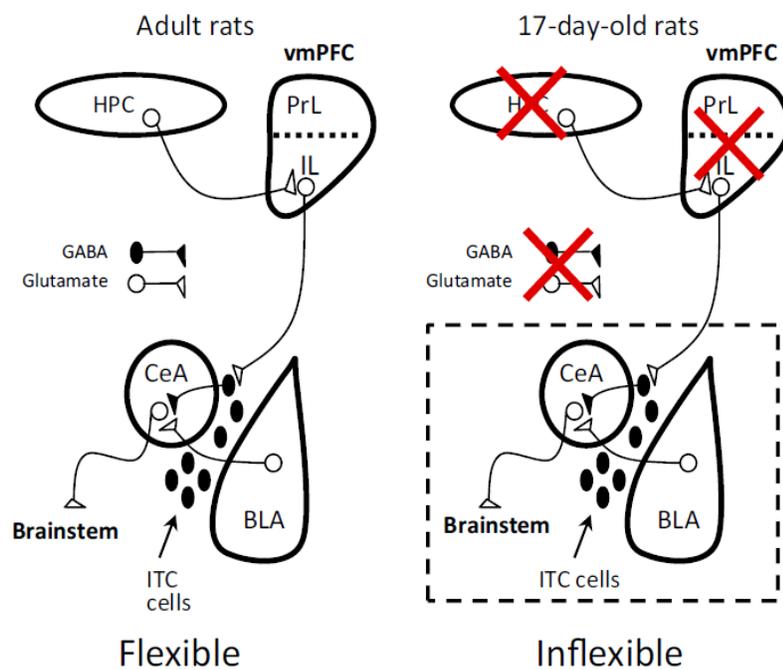


Imagen 2: Esquema de cómo se entiende, desde el Modelo Neuromadurativo, el circuito de extinción. En la imagen se muestra la comparación de circuitos intervinientes en la extinción de una RC en la rata infante y adulta (tomado de Kim y Richardson, 2010). En la imagen de la izquierda se representa el circuito formado por el Hipocampo (HPC), la Corteza Prefrontal infralímbica y prelímbica (PrL e IL) y los Núcleos Central (CeA) y Basolateral (BLA) de la Amígdala, que mediaría la extinción en organismos adultos. En la derecha se representa cómo funcionaría el mismo hipotéticamente en crías de 17 días durante el aprendizaje de extinción, que no incluiría la participación ni del Hipocampo ni de la Corteza Prefrontal en el aprendizaje de extinción, que dependería exclusivamente de la Amígdala. En este caso la extinción sería inflexible.

Hasta aquí comentamos la importancia de estudiar el hipocampo en el aprendizaje de contexto, la importancia del contexto en el aprendizaje de extinción, también hicimos alusión a la importancia de la extinción en el marco clínico-terapéutico y llegamos a describir cómo, a partir de unas cuantas evidencias, tanto el funcionamiento del hipocampo, como el aprendizaje de contexto y extinción y sus potenciales terapéuticos, presentan características particulares en etapas tempranas del desarrollo de la rata. También hicimos algunas referencias a este escenario como una construcción. Esto tiene que ver con que, para poder desarrollar toda la propuesta que hemos comentado a partir de las evidencias experimentales (dependientes de todos los parámetros descritos antes), es necesario, además, tener en cuenta una gran cantidad de “conocimientos” o supuestos, que se derivan de otras disciplinas, de otras prácticas, de aspectos cotidianos o que están presentes en nuestra cultura.

Otro aspecto del estudio del funcionamiento del hipocampo, que realiza el sentido del estudio del aprendizaje contextual, es su vinculación con el “sistema de memoria explícito” (Rovee-Collier and Cuevas, 2009, Fanselow, 2010). El desarrollo del sistema de memoria emocional que venimos describiendo, se reproduce dentro de un modelo general de desarrollo que explica en términos lineales y progresivos el paso de un estado simple o inmaduro en la infancia, a otro eficiente o maduro en la adultez. En el Modelo Neuromadurativo, los organismos infantiles disponen de un sistema de memoria rudimentario, que permite una serie de aprendizajes, pero que está definido principalmente a partir de sus limitaciones como un sistema simple, inflexible, inconsciente, que progresivamente y en la medida que “se desarrollan” algunas estructuras del sistema nervioso como el hipocampo y la CPF, se va complejizando hasta incluir un sistema de memorias más complejas, flexibles, conscientes, etc. que es el sistema de memoria explícito (Rovee-Collier and Cuevas, 2009, Rovee-Collier and Giles, 2010).

En la construcción de este modelo de desarrollo, fue muy importante la descripción del progreso postquirúrgico de una persona a la que, en el año 1953, se le extirpó quirúrgicamente el hipocampo de ambos hemisferios cerebrales, por sufrir de

convulsiones muy severas y que no respondían a otros tratamientos (Rovee-Collier and Cuevas, 2009). El efecto de la cirugía sobre la vida de esta persona fue dramático por muchas razones. Principalmente, porque los conocimientos con los que los médicos propusieron este tratamiento no permitían predecir ni prevenir las consecuencias de la cirugía. Hasta ese momento, se creía que la memoria se encontraba distribuida en todo el cerebro, por lo que era esperable un grado de deterioro cognitivo pero no se podía predecir de qué magnitud. En este contexto, la consecuencia de la cirugía tomó por sorpresa a toda la comunidad científica. Luego de la intervención, el paciente vivió con una amnesia retrógrada de aproximadamente dos años y una amnesia anterógrada casi total, a excepción del aprendizaje de ciertas habilidades motoras. A partir de este momento, comenzaron a describirse distintos tipos de memoria, con características especiales, que se “pierden” tras la lesión de determinadas áreas del cerebro o como consecuencia de enfermedades neurodegenerativas. Estos estudios dieron lugar a la descripción de un deterioro cognitivo “propio” del envejecimiento normal y, por asumir que las primeras estructuras y funciones cerebrales que se pierden en el envejecimiento son las últimas que se desarrollaron durante el crecimiento, también dieron lugar al estudio del desarrollo de las funciones cognitivas complejas durante la infancia. A esta hipótesis que se encuentra en el corazón del Modelo Neuromadurativo se le conoce como hipótesis jacksoniana (Spear, 1984b, Rovee-Collier and Cuevas, 2009).

Es así como Fanshew, Rudy, Stanton y Richardson, entre otros investigadores, estructuraron su propuesta para pensar e intervenir sobre la infancia. El modelo de desarrollo que reproducen estos autores, predice un grado de maduración y funcionamiento del hipocampo en función del tipo de aprendizajes y memorias que esta estructura sostiene a lo largo de la infancia, que a su vez limita el tipo de comportamientos esperables en etapas tempranas del desarrollo. La relación “normal” entre hipocampo y memoria explícita se toma de las descripciones del comportamiento de animales adultos; mientras que la relación entre limitaciones en el funcionamiento del hipocampo y limitaciones en el sistema de memorias explícitas se toma de estudios de lesión o inhibición del hipocampo, o de envejecimiento. En estos estudios, la diferencia

entre animales viejos o con inhibición o lesión del hipocampo y animales adultos sanos, en el desarrollo de tareas de condicionamiento clásico, es entendido como un indicador de “pérdida de función”. Además, esa función perdida es asociada al funcionamiento normal de la estructura lesionada o inhibida. De esta manera, a) conociendo el tipo de comportamientos o memorias que se desprenden de un funcionamiento normal del hipocampo y b) el tipo de “déficits” o limitaciones en el comportamiento o memoria que se asocian a ciertos daños en el hipocampo, c) se describen los cambios en el comportamiento o memoria de las crías de rata en distintos días durante su crecimiento y se establecen estados de maduración del hipocampo. El sistema de memoria para organismos en desarrollo, y en consecuencia el tipo de infante, que se describió de esta manera, es uno que puede aprender determinados aspectos del contexto (condicionamiento contextual) pero no puede utilizar la información contextual para resolver situaciones ambiguas presentadas por otros estímulos (función de desambiguación o flexibilidad cognitiva).

1.5 Pensando y estudiando el desarrollo desde el Modelo Ecológico

Otros investigadores adoptaron una posición diferente para pensar el aprendizaje en la infancia, menos vinculada a la hipótesis Jacksoniana de desarrollo y, por eso, con una lectura distinta y menos restrictiva de los mecanismos asociativos o neurobiológicos de aprendizaje descritos en animales adultos. Estos investigadores comenzaron a estudiar los procesos de aprendizaje y memoria en la infancia, interesados en comprenderlos y no en averiguar de qué manera se transforman en los mecanismos descritos en animales mayores. A esta posición teórica se le denominó Modelo Ecológico (Spear, 1984b, Rovee-Collier and Cuevas, 2009). Esto marcó una diferencia en el tipo de preguntas que dirigen sus investigaciones y, en consecuencia, en el diseño de sus experimentos. Una característica de estos experimentos es que, a diferencia de los pensados a partir del Modelo Neuromadurativo, los procedimientos son más flexibles (Revilla et al., 2015), e

incluyen, por ejemplo, distintos estímulos incondicionados, distintos estímulos condicionados, una mayor variedad en los ensayos de condicionamiento, con variaciones en la duración de los ensayos, contingencias, y también un análisis de diferentes indicadores de memoria. Todo ello, al menos aparentemente, buscando la sensibilidad de la prueba para ser útil a los objetivos del estudio teniendo en cuenta la edad de los animales, y más que la edad, sus características motoras y cognitivas (McKinzie et al., 1994, Brassler and Spear, 1998, 2004, Esmoris-Arranz et al., 2008).

El punto de partida de las preguntas en el Modelo Ecológico es entender las diferencias entre infantes y adultos como rasgos característicos de los individuos. Además, estas diferencias no se limitan al funcionamiento del cerebro o de algunas de sus estructuras, sino que incluyen diferencias cognitivas, perceptivas y atencionales, relacionadas con la selección de estímulos, diferencias en las habilidades motoras y en los recursos de exploración e interacción con el ambiente. Entendiendo así las diferencias, el conocimiento que se desprende del estudio con animales adultos se utiliza como referencia, pero no como guía en el estudio de la infancia. Eso libera a los investigadores del marco interpretativo propio del estudio con animales adultos y les da la posibilidad de explorar otras formas de explicación y de producción de sentido (Spear, 1984b, Rovee-Collier and Cuevas, 2009, Rovee-Collier and Giles, 2010).

Norman Spear es uno de los investigadores más influyentes en el Modelo Ecológico (Arnold et al., 1993). Su trabajo durante los años 60 y 70 se centró en el estudio teórico y empírico de la memoria, tratando diferentes problemáticas, siendo la que más captó su interés el estudio de la amnesia infantil (Campbell and Spear, 1972). En relación al tema de la presente tesis, Spear y sus colegas describieron una serie de aprendizajes complejos durante la infancia de la rata, que implican distintos usos de la información contextual (Spear et al., 1990, McKinzie et al., 1994, Adler et al., 1998, Brassler and Spear, 1998, Kraebel et al., 1998, Brassler and Spear, 2004, ver Revillo et al., 2015 para una revisión detallada de estos trabajos). Por ejemplo, encontraron que: 1) la saliencia del contexto, el tipo de estimulación perceptual que ofrece y el tipo de interacción que el organismo puede alcanzar, es determinante para observar efectos del entrenamiento en

aprendizaje contextual. 2) Durante la tercera semana de vida postnatal, las variaciones en el contexto son muy importantes para comprender algunos aspectos del olvido o la expresión de memorias. 3) Las crías de rata son capaces de aprender y expresar una RC ante un contexto en un procedimiento de condicionamiento de miedo y, a diferencia de animales adultos, la presencia de un estímulo discreto (por ejemplo un tono) que señale el EI (a la manera de un procedimiento típico de condicionamiento de clave EC-EI) potencia, en lugar de ensombrecer, el aprendizaje contextual. 4) Las crías atraviesan durante un periodo del desarrollo infantil una etapa de aprendizaje exuberante, en el que aprenden muchas asociaciones, muchas de las cuales pueden ser inapropiadas, irrelevantes o redundantes, lo que se acompaña de dos mecanismos que permiten mantener al sujeto adaptado en este periodo, el olvido rápido y la extinción también rápida.

Otra investigadora muy influyente en esta línea de pensamiento fue Carolin Rovee-Collier, quien realizó un gran aporte en la comprensión de las características del aprendizaje y la memoria durante los primeros meses y años de vida de los seres humanos. Rovee-Collier y sus colegas utilizaron distintos procedimientos de aprendizaje para describir la interacción de bebés de entre 2 y 18 meses de vida con su entorno (contexto) y, de alguna manera en paralelo con los hallazgos de Spear, encontraron que los cambios en el contexto son importantes para entender el olvido y las posibilidades de expresión de memorias (Cuevas et al., 2005, Rovee-Collier and Cuevas, 2009, Rovee-Collier and Giles, 2010, Cuevas et al., 2016). Contrariamente a lo que se conoce y se espera desde el Modelo Neuromadurativo, estos investigadores encontraron grandes períodos de retención de memoria (de hasta un año) y distintos indicadores de flexibilidad cognitiva característicos del sistema de memoria explícita. Por ejemplo, la resolución de una tarea de imitación diferida en un procedimiento de precondicionamiento sensorial, indica la posibilidad de hacer inferencias o relaciones entre “representaciones” de estímulos que fueron presentados de manera aislada (Barr et al., 2003, Rovee-Collier and Cuevas, 2009). Además, en un procedimiento de extinción, en una tarea de aprendizaje operante con bebés de 3 meses de edad, encontraron evidencias de renovación ABA y ABC, indicando la posibilidad de utilizar el contexto para identificar el significado de una

situación ambigua y responder de manera eficiente (Cuevas et al., 2016).

Para entender estos resultados, Spear y Rovee-Collier propusieron una representación del infante como un organismo acabado (no inmaduro), con herramientas cognitivas y habilidades motoras que le permiten interactuar de manera exitosa con su entorno, en función de sus necesidades. Esta forma de pensar el desarrollo, da igual importancia a las características cognitivas, perceptuales y motoras del organismo y a las características del ambiente, entendiendo que están en constante interrelación y que se afectan mutuamente generando los cambios que denominamos desarrollo. De esto se desprende, por un lado, un valor fundamental de la experiencia y el comportamiento de los animales para la comprensión de la dinámica de su desarrollo y, por otro lado, la relevancia de las características del diseño experimental para su estudio en laboratorio.

Desde esta perspectiva, podemos notar algunas limitaciones en la descripción que hicieron Richardson y sus colegas del aprendizaje de extinción en la infancia de la rata. En ese sentido, nos interesa analizar en qué medida sus resultados y sus conclusiones se pueden sostener si agregamos al diseño experimental algunas de las consideraciones que proponen Spear y Rovee-Collier. Para eso, llevamos a cabo una serie de experimentos con parámetros similares a los utilizados por Richardson y sus colegas y agregamos algunas modificaciones en la “saliencia” o composición de los contextos, así como la exploración de otros indicadores de aprendizaje además del “*freezing*”. A continuación desarrollaremos con más detalle los objetivos de este trabajo, las condiciones y características de los experimentos, los resultados que obtuvimos y las cosas que aprendimos a lo largo de más de cinco años de trabajo.

CAPÍTULO 2 - OBJETIVOS E HIPÓTESIS

2.1 OBJETIVOS

En la introducción describimos y situamos históricamente dos modelos para el estudio del desarrollo en neurociencias cognitivas, a uno lo llamamos Modelo Neuromadurativo y al otro, Modelo Ecológico. El Modelo Neuromadurativo, toma como punto de partida el conocimiento acerca de los mecanismos neurobiológicos del comportamiento descritos en animales adultos y se aproxima a la infancia con el objetivo de “recrear” el proceso de maduración que va desde el nacimiento (o antes del nacimiento) hasta la vida adulta. En este emprendimiento, el conocimiento acerca de la “pérdida” de funciones cognitivas producto del envejecimiento o de determinadas lesiones cerebrales, sirve de guía. El Modelo Ecológico, en cambio, se propone conocer las características del aprendizaje y la memoria durante la infancia, utilizando como referencia los conocimientos que tenemos sobre la infancia y sobre su entorno.

Debido al tipo de explicaciones que prevalecen en el campo, el estudio del aprendizaje contextual y del papel del contexto en el aprendizaje, se convirtió en un punto sensible para la construcción de ambos modelos. Existe un consenso en aceptar que el aprendizaje de contexto da cuenta de un tipo de memoria explícita y que en animales sin lenguaje se considera que sitúa los eventos espacial y temporalmente (Dumigan et al., 2017). En este sentido, el papel del contexto en aprendizajes de interferencia, como el de extinción, es muy importante para el estudio de mecanismos de aprendizaje y sistemas de memoria. Dado que, desde el Modelo Neuromadurativo se considera que el aprendizaje contextual se relaciona con el funcionamiento del hipocampo y que esta estructura alcanza una estabilidad anatómica y funcional después del nacimiento, alrededor del DP21 en la rata, este modelo predice que antes de esa fecha, las crías de rata no son capaces de recordar y utilizar la información del contexto, o lo hacen de manera rudimentaria al igual que las ratas adultas con algún grado de lesión en el hipocampo. A partir de esta premisa, Richardson tomó el papel del contexto en el paradigma de extinción para estudiar, no las características del sistema de memoria en la infancia, sino las del propio paradigma de

extinción en una edad en la que “hipotéticamente” las ratas no tienen la capacidad de aprender y utilizar de manera explícita información contextual. Es decir, sobre la hipótesis de que las crías de rata menores a 21 días de vida postnatal no pueden utilizar información contextual para desambiguar un estímulo, formuló la hipótesis de que el aprendizaje de extinción sería independiente de contexto y llevaría al borrado de la memoria extinguida en esta edad.

Este tipo de construcción no se sostiene desde el Modelo Ecológico, porque no le asigna el mismo valor a la relación entre el estado de maduración del hipocampo y las capacidades de aprendizaje, de manera que no parte de la hipótesis de que las crías de rata no son capaces de aprender sobre el contexto ni de utilizar esta memoria de manera eficiente. En consecuencia, desde el Modelo Ecológico la pregunta por el papel del contexto en el aprendizaje permanece vigente y el paradigma de extinción es un recurso más para explorar las características del sistema de memoria.

En este proyecto, nos propusimos **estudiar las características del aprendizaje de contexto durante la tercera semana de vida postnatal de la rata, a partir del procedimiento de extinción, desde el enfoque del Modelo Ecológico de desarrollo**. Para eso, trazamos el siguiente plan de trabajo, que desarrollamos entre los años 2012 y 2017:

Objetivos específicos:

- a. Analizar el papel del contexto en la modulación del comportamiento en esquemas de restablecimiento, renovación y readquisición, en un procedimiento de aversión condicionada al sabor, durante la tercer semana de vida postnatal de la rata.

- b. A través del análisis de un etograma que cubre de manera exhaustiva el repertorio conductual de la rata en su tercer semana de vida postnatal, estudiar el papel del contexto en la modulación del comportamiento en esquemas de recuperación espontánea, restablecimiento y renovación, en un procedimiento de condicionamiento de miedo.

- c. Analizar, a través del efecto de la administración de MK-801 sobre el aprendizaje, el

papel del sistema glutamatérgico en la adquisición y extinción de una respuesta de miedo condicionada, en ratas de 17 días de vida postnatal.

.2 HIPÓTESIS

En el Capítulo 1 comentamos la manera en que Richardson y sus colaboradores describieron el efecto de extinción en crías de rata predestetadas (menores a DP21) como un efecto inflexible, que lleva al borrado de la memoria extinguida. Nosotros **creemos, y esperamos poder justificarlo a lo largo de este escrito, que la descripción que hicieron Richardson y sus colaboradores es el producto de la aplicación correcta de un modelo explicativo, pero que puede alcanzarse una descripción diferente desde un modelo distinto.**

En la Introducción mencionamos que todos los experimentos que desarrollaron Richardson y sus colaboradores tienen una estructura similar. En todos los casos se hicieron comparaciones entre animales de edades distintas y eligieron parámetros que ya habían sido probados para los animales de mayor edad. Es decir, evaluaron a las crías de rata de 16 ó 17 días de vida postnatal en comparación con ratas de 23 ó 24 días de vida postnatal, en tareas que a priori las ratas mayores podían resolver sin dificultad pero que resultaban un desafío para las crías predestetadas. Luego de los experimentos, las diferencias entre los grupos de edades distintas eran tomadas como falla en la resolución de la tarea y como indicadores de inmadurez en el desarrollo de los mecanismos cerebrales y cognitivos, de los animales menores.

Desde el Modelo Ecológico, los parámetros para el diseño de experimentos se eligen en función de las características cognitivas y motoras propias de la población estudiada. Luego, los grupos control se piensan en relación con los parámetros elegidos. Por ejemplo, en nuestros experimentos de condicionamiento de miedo incluimos olores en los contextos para aumentar su saliencia y analizamos distintos indicadores conductuales de las crías de rata, además de la respuesta de congelamiento o *freezing*. Los grupos control que escogimos, eran animales de la misma edad (DP17) que eran entrenados y evaluados con los mismos parámetros, pero en con contextos básicos, sin

olores que realzaran su saliencia.

De esta manera, esperamos encontrar un perfil similar al descrito por Richardson y sus colaboradores si analizamos los datos siguiendo las predicciones del Modelo Neuromadurativo; mientras que, analizando los datos con las predicciones del Modelo Ecológico, podremos alcanzar una descripción diferente del efecto de extinción en la infancia de la rata. Es decir, **esperamos encontrar que las crías de rata de 17 días de vida postnatal son capaces de utilizar información contextual para ajustar su comportamiento tras la extinción de una RC, en procedimientos de restablecimiento, renovación y recuperación espontánea; y, que el diseño experimental es determinante para la posibilidad de observar estos resultados.**

CAPÍTULO 3 – SUJETOS Y MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES

3.1 SUJETOS

En la primera serie experimental utilizamos 104 crías de rata Wistar, en la segunda 371, y en la tercera 294 (total 769 animales). En cada serie experimental se encontrará una O VARIAS tabla con la cantidad de animales que fueron asignados a cada tratamiento en cada experimento. Siempre tuvimos cuidado de no asignar más de una cría de cada camada a cada tratamiento, para evitar una sobre-representación de una camada. Los animales de todos los experimentos de la presente tesis nacieron y fueron criados en el Bioterio del Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra, INIMEC– CONICET-UNC, en condiciones constantes de temperatura (22 ± 1.0°C) y un ciclo de 12 hs de luz y 12 hs de oscuridad. El día de nacimiento de las ratas fue considerado el DPO. Todas las camadas fueron reducidas, en la medida de lo posible, a 10 crías -5 machos y 5 hembras- dentro de las primeras 48 hs después del nacimiento. Todas las condiciones de criado y alojamiento son las mismas en todas las series experimentales.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES

Aparatos

Los aparatos se describen en cada serie experimental.

Procedimientos

En la presente tesis se usaron procedimientos de aversión condicionada al sabor (ACS) en la primera serie experimental y de condicionamiento de miedo, en las series experimentales 2 y e. Los procedimientos detallados se describen en cada serie experimental.

Análisis de datos

Los resultados de los experimentos fueron siempre analizados por medio de ANOVAs incluyendo las variables independientes representadas en cada figura, y las

medidas repetidas (bloques o ensayos) también recogidos en las figuras. Los efectos significativos principales o de interacción fueron analizados luego con nuevos ANOVAs o con pruebas post-hoc (Newman-Keuls). En todos los análisis utilizamos un nivel de significación de 0.05.

CAPÍTULO 4 - SERIES EXPERIMENTALES

4.1 PRIMERA SERIE EXPERIMENTAL: FACILITACIÓN DE LA READQUISICIÓN, RESTABLECIMIENTO Y RENOVACIÓN TRAS LA EXTINCIÓN DE UNA RC, EN UN PARADIGMA DE AVERSIÓN CONDICIONADA AL SABOR (ACS).

Dado que el laboratorio donde se realizó la tesis contaba con parámetros conocidos en el procedimiento de aversión condicionada al sabor (ACS), la primera serie experimental fue dirigida a estudiar la posibilidad de restauración, renovación y facilitación de la readquisición de una respuesta condicionada (RC) extinguida en crías predestetadas, en un paradigma de ACS. Esta serie experimental es importante porque en ella analizamos la extinción y los posibles efectos de recuperación, a partir de un procedimiento y de unos parámetros que Richardson nunca había empleado en sus estudios.

El procedimiento fue muy similar en todos los experimentos (ver Tabla 1), se realizaron dos ensayos de condicionamiento (días experimentales 1 y 2) y dos ensayos de extinción (días experimentales 3 y 4), en el día experimental 5 las ratas recibieron un nuevo ensayo de condicionamiento (en los Experimentos 1a y 1b –readquisición-) y fueron evaluadas al día siguiente; en los Experimentos 2 (restablecimiento) y 3 (renovación), las ratas fueron evaluadas en el día experimental 5 tras una experiencia con el EI o tras un cambio de contexto, respectivamente. Teniendo en cuenta antecedentes de la literatura (Brasser and Spear, 1998, Thomas et al., 2003, Brasser and Spear, 2004), se procuró que los contextos empleados en el Experimento 3 contengan claves de diferentes modalidades sensoriales, incluyendo olores.

Tabla 1. Diseños experimentales de la primera serie experimental.

Grupo	Condicionamiento DPs 14-15	Extinción DPs 16-17	Re-condicionamiento DP 18	Evaluación DP 19	Olor	n
Experimento 1a						
Agua	Agua+vehículo	Agua	Sacarina+LiCl	Sacarina	Si	10
Almendra	Almendra+LiCl	Almendra				9
Sacarina	Sacarina+LiCl	Sacarina				10
Experimento 1b						
Agua	Agua+vehículo	Agua	Sacarina+LiCl	Sacarina	Si	10
Sacarina-reexposure	Agua+vehículo	Sacarina				11
Sacarina-Extinction	Sacarina+LiCl	Sacarina				9
Experimento 2						
Grupo	Condicionamiento DPs 14-15	Extinción DPs 16-17	Evaluación DP18	Olor	n	
ABA Agua	Agua+LiCl	Sacarina	Sacarina (A)	Si	8	
ABB Sacarina	Sacarina+LiCl		Sacarina (B)		7	
ABA Sacarina	Sacarina+LiCl		Sacarina (A)		8	
Experimento 3						
Grupo	Condicionamiento DPs 14-15	Extinción DPs 16-17	Evaluación DP 18	Olor	n	
Sacarina +/-	Sacarina+LiCl	Sacarina	Vehículo+Saccharin	Si	7	
Vinagre +/+	Vinagre+LiCl		LiCl+Sacarina		7	
Sacarina -/+	Sacarina+Vehículo		LiCl+Sacarina		8	
Sacarina +/+	Sacarina+LiCl		LiCl+Sacarina		8	

MATERIALES Y MÉTODOS

Aparatos

En el Experimento 1 se utilizó, para el condicionamiento, extinción y prueba, una caja de Plexiglas de 15cm x 7cm x 2 cm, con paredes blancas. En el Experimento 2 se usaron dos contextos. El contexto A consistió en una caja de Plexiglas opaca (15 cm x 7 cm x 12 cm), con paredes blancas y una pequeña bolsita con café (6 g.) en el techo. El piso de la caja era de papel absorbente color blanco. El contexto B difería del contexto A en tamaño, color, textura y olor. Estaba formado por un cubículo (10cm x 10cm x 10cm), con tela lisa de color negro en las paredes, una malla de alambre en el piso, un techo traslúcido de color rojo y un algodón mojado con 0,2 ml de esencia de almendra (Esencias del Boticario, Córdoba, Argentina) pegado en el techo. En el Experimento 3 se utilizó el mismo contexto que en Experimento 1, a lo largo de todas las fases.

Procedimientos de los Experimentos 1a y 1b

Condicionamiento: La fase de condicionamiento tuvo lugar en los DPs 14 y 15, una sesión por día. El primer día de condicionamiento, retiramos a las crías de su caja hogar y les asignamos un tratamiento entre Agua, Almendra o Sacarina, que es la solución que consumirían durante la fase de condicionamiento y extinción. A continuación, les implantamos una cánula removible en el cachete (PE 10 polyethylene tubing, length: 5 cm, Clay Adams, Parsippany, NJ), utilizando una aguja de uso odontológico (30-gauge Monoject, Sherwood Medical, Munchen, Alemania) según se describió en trabajos anteriores (Revilla et al., 2011). Es un procedimiento rápido que no altera demasiado a las crías y les permite ingerir o escupir la solución que se le infunde, con mucha libertad. Antes de comenzar el condicionamiento, inducimos micción y defecación mediante la estimulación de la zona ano-genital de las crías con un algodón y fueron pesadas. Esto es importante porque la variable dependiente que analizamos es el cambio en el peso de las ratas después de la fase de ingesta. Después dejamos a las crías en el contexto de condicionamiento, y les administramos un volumen final de 1 ml de una infusión de sacarina (0.15% w/v, grupo Sacarina), almendra (Esencias del Boticario, Córdoba,

Argentina; 0.01%, v/v, grupo Almendra) o agua destilada, a través de la cánula que le implantamos en el cachete, a un ritmo constante de 0,1 ml/minuto durante 10 minutos. Al finalizar la infusión, pesamos nuevamente a cada animal para inferir la cantidad de solución consumida (restando al peso postinfusión, el peso preinfusión), las inyectamos intraperitonealmente (ip) con vehículo (0.9% NaCl, grupo Aguas), o LiCl (1% of a 0.15 M solución, grupos Almendra y Sacarina) y las devolvimos a su caja hogar con el resto de la camada. Durante los dos días de condicionamiento repetimos este procedimiento.

Extinción: Los DPs 16 y 17, volvimos a exponer a las crías a sacarina, almendra o agua, según les asignamos el primer día, siguiendo el mismo protocolo descrito previamente salvo que después de la infusión, devolvimos las crías a su caja hogar sin administrarles la inyección.

Recondicionamiento y evaluación: El DP18, expusimos a todas las crías al consumo de sacarina y luego del inyectamos LiCl ip. El DP19, volvimo a exponer a todas las crías al consumo de sacarina para evaluar su aceptación.

Nota. Todos los procedimientos descritos en esta sección son equivalentes para los Experimentos 1a y 1b, salvo que en el Experimento 1b el grupo Almendra fue reemplazado por el grupo Sacarina-preesposición, que recibió agua durante el condicionamiento (DPs 14 y 15) y sacarina durante las siguientes fases.

Procedimientos Experimento 2

Condicionamiento: El condicionamiento se llevó a cabo en los DPs 14 y 15 de las ratas, una sesión por día, en el contexto A siguiendo el mismo procedimiento descrito en el Experimento 1. Es importante aclarar que el grupo ABA-agua recibió una infusión de agua destilada en lugar de sacarina.

Extinción: La extinción tuvo lugar los DPs 16 y 17, en el contexto B. Los parámetros fueron similares a los empleados en el Experimento 1.

Evaluación: La evaluación se realizó en el contexto A para los grupos ABA-sacarina y ABA-agua y en el contexto B para el grupo ABB-sacarina, en el DP19. Los parámetros fueron similares a los empleados en el Experimento 1.

Procedimientos del Experimento 3

El diseño experimental del Experimento 3 incluye cuatro grupos independientes, Sacarina +/-, Sacarina -/+, Vinagre +/+ y Sacarina +/+. El nombre de los grupos señala la solución recibida en la fase de condicionamiento (sacarina o vinagre) y el tratamiento de condicionamiento (vehículo - LiCl +) y restauración (vehículo - LiCl +). Si el tratamiento de restauración es efectivo, esperamos que el grupo Sacarina +/+ consuma menos sacarina que los demás en la evaluación. El grupo Sacarina +/- mostraría un patrón similar al grupo Sacarina +/+ pero el día de evaluación sostendría un nivel alto de consumo de sacarina producto del aprendizaje de extinción. El grupo Sacarina -/+ controla el efecto agudo de la inyección de LiCl sobre el consumo de sacarina en el día de evaluación. Finalmente, el grupo Vinagre +/+ controla un posible efecto de sensibilización del LiCl durante el condicionamiento y un posible efecto inespecífico de la experiencia previa de condicionamiento.

Condicionamiento: Todos los procedimientos de condicionamiento fueron iguales a los empleados en los experimentos anteriores. Las crías del grupo Vinagre +/+ recibieron una inyección ip de LiCl inmediatamente después de la infusión de 1 ml de una solución de vinagre de manzana 0.15% v/v.

Extinción: Los DPs 16 y 17 todos los animales consumieron sacarina, siguiendo los mismos procedimientos utilizados en los experimentos anteriores.

Evaluación: El DP18 todas las ratas fueron evaluadas en el consumo de sacarina en un procedimiento similar al descrito en los experimentos anteriores, excepto porque 10 minutos antes recibieron una inyección ip de vehículo (grupo Sacarina +/-) o LiCl (grupos Sacarina +/+, Sacarina -/+ y Vinagre +/+).

Análisis de datos

Los datos del primer experimento fueron analizados por medio de un ANOVA mixto que incluyó Grupo (Agua, Almendra o Sacarina) como variable independiente y Día como variable intragrupo, con seis niveles correspondientes a condicionamiento (dos

días), extinción (dos días), recondicionamiento (un día) y evaluación (un día). Los datos del segundo experimento se analizaron mediante un ANOVA mixto incluyendo Grupo (ABA-sacarina, ABB-sacarina y ABA-agua) como factor entre y Día como variable intragrupo, con cinco niveles correspondientes a dos días de condicionamiento, dos días de extinción y un día de evaluación. Los datos de consumo del Experimento 3 se analizaron con un ANOVA mixto incluyendo Grupo (Sacarina +/-, Sacarina +/+, Sacarina -/+ y Vinagre +/+) como factor entregupo y Día como variable intragrupo, con cinco niveles correspondientes a dos días de condicionamiento, dos días de extinción y un día de evaluación.

RESULTADOS

Experimentos 1a y 1b: Readquisición de la respuesta extinguida

La Figura 1a representa el consumo de los diferentes grupos (Agua, Almendra y Sacarina) en función de los ensayos de condicionamiento, extinción, recondicionamiento y evaluación del Experimento 1a. El ANOVA mixto reveló una interacción significativa Grupo x Día [$F(10, 130) = 3.56, p < 0.05$]. Para analizar esta interacción, hicimos ANOVAs de una vía entre factores con los valores de consumo por día. Estos análisis indicaron un efecto principal de Grupo en la evaluación [$F(2, 26) = 4.49, p < 0.05$]. El análisis post-hoc reveló que este día, el grupo Sacarina consumió menos sacarina que los demás (agua y almendra). Estos resultados mostraron que el reaprendizaje en el grupo Sacarina fue más rápido que en los tratamientos de Agua y Almendra. Es importante notar que todos los grupos consumieron la misma cantidad de sacarina durante el ensayo de recondicionamiento (DP18). El ANOVA de una vía entre factores no arrojó indicadores de aprendizaje de aversión en los grupos Almendra y Sacarina durante los ensayos de condicionamiento (C1 y C2). Sin embargo, el aprendizaje de aversión puede detectarse mediante ANOVAs de medidas repetidas, comparando los valores de consumo en ensayos sucesivos dentro de cada grupo. Estos análisis indicaron efectos significativos principales de Día en los grupos Almendra y Sacarina [$F(5, 40) = 10.44, p < 0.05$; $F(5, 45) = 7.44, p <$

0.05, respectivamente]. Los análisis post-hoc mostraron que el consumo durante el primer ensayo de extinción fue significativamente menor que al del primer ensayo de condicionamiento en ambos grupos.

En resumen, estos resultados indican que una experiencia de condicionamiento y extinción de un EC determinado, facilita el posterior aprendizaje de la misma RC. El hecho de que el grupo Sacarina haya expresado mayor aversión en el ensayo de evaluación que el grupo Almendra, sugiere que la experiencia con el EI o la experiencia de aprendizaje de aversión por sí solos no son suficientes para facilitar el aprendizaje en un protocolo de re-condicionamiento, descartando el efecto de sensibilización como explicación alternativa, sino que se trata de un efecto específico de la experiencia previa en el mismo aprendizaje.

Una explicación alternativa para el efecto de facilitación observado en el Experimento 1a es que esté ocasionado por la exposición al EC sólo inmediatamente antes del re-condicionamiento, durante la fase de extinción. Para evaluar esa posibilidad, repetimos el experimento pero reemplazamos el grupo Almendra del Experimento 1a por el grupo Sacarina-preexposición, que recibió agua durante el condicionamiento (DPs 14 y 15) y sacarina durante las fases de extinción, re-condicionamiento y evaluación. Los datos del Experimento 1b están representados en la Figura 1b. El ANOVA reveló una interacción Grupo x Día [$F(10, 135) = 8.02, p < 0.05$], para explorar esta interacción hicimos otros ANOVAs de una vía considerando el Grupo como el único factor entregrupos, que revelaron un efecto significativo de Grupo en el primer día de extinción [$F(2, 27) = 14.82, p < 0.05$], el segundo día de extinción [$F(2, 27) = 3.72, p < 0.05$], y en la evaluación [$F(2, 27) = 3.72, p < 0.05$]. Según este análisis, el grupo Sacarina-extinción consumió menos sacarina que el grupo Sacarina-preexposición. El análisis post-hoc mostró diferencias significativas entre estos grupos en el segundo día de extinción, indicando que la extinción no se completó hasta después del segundo ensayo (mostrándose en el ensayo de re-condicionamiento). El análisis post-hoc del día de evaluación reveló que el grupo Sacarina-extinción consumieron menos sacarina que los demás grupos (Agua y Sacarina-preexposición).

Estos resultados replican los obtenidos en el Experimento 1a, descartando la

posibilidad de explicarlo por efecto de la exposición no reforzada al EC y sosteniendo que la re-adquisición de la RC de aversión condicionada al sabor se ve facilitada (respecto de la primera adquisición) después de su extinción.

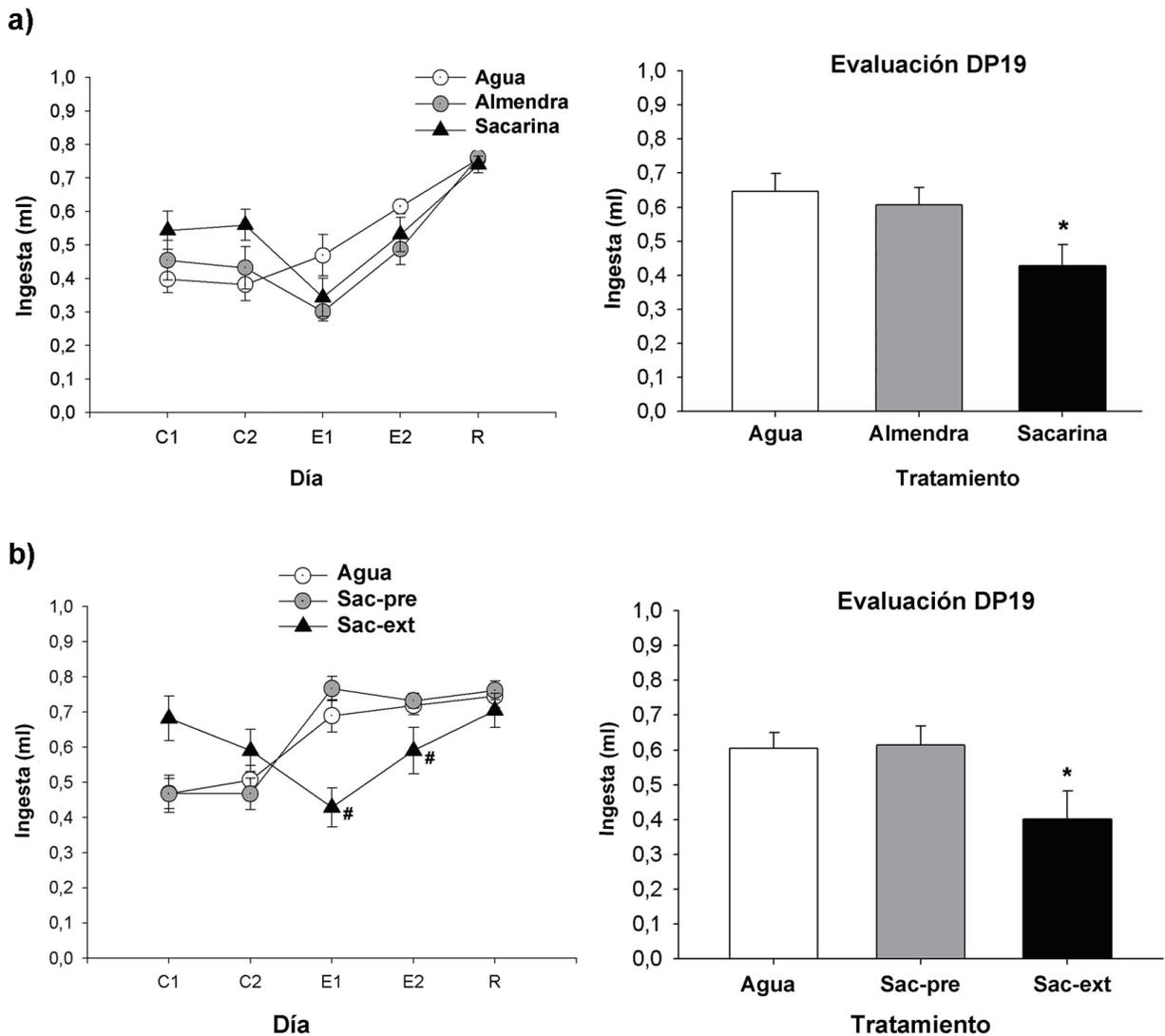


Figura 1: Las Figuras 1a y 1b, muestran los resultados de los Experimentos 1a y 1b. El panel de la izquierda representa los valores de consumo durante las fases de condicionamiento (C1 y C2), extinción (E1 y E2) y recondicionamiento (R), en función de la solución que recibieron durante las fases de condicionamiento y extinción. El panel de la derecha, muestra los niveles de consumo durante la evaluación. # indica diferencia significativa entre el grupo Sacarina-extinción y las demás condiciones experimentales. * indica diferencia significativa entre el grupo experimental y el resto de las condiciones control. $P < 0.05$

Experimento 2: Renovación de la respuesta extinguida

En el Experimento 2 empleamos un procedimiento de renovación ABA, también en aversión condicionada. En este experimento, el condicionamiento de aversión al sabor se realiza en un contexto A y la extinción, en un contexto diferente B. Para la evaluación, algunos animales reciben una infusión de sacarina en el contexto A (grupo ABA-sacarina), mientras otros reciben la infusión en el contexto B (grupo ABB-sacarina). Un tercer grupo que recibió el mismo tratamiento que el grupo ABA-sacarina, salvo que el día de condicionamiento consumió agua en lugar de sacarina. Incluimos este grupo para controlar el posible efecto de condicionamiento de contexto en el grupo ABA-sacarina, que podría explicar una posible disminución en el consumo de sacarina en el contexto A durante el test.

Los resultados derivados del Experimento 2 están representados en la Figura 2. El ANOVA reveló una interacción significativa Grupo x Día [$F(8, 80) = 5.20, p < 0.05$]. Para explorar esta interacción hicimos nuevos ANOVAs de una vía con Grupo como factor entre y Día como variable intragrupo. Estos análisis mostraron un efecto principal de grupo en el primer día de extinción [$F(2, 20) = 4.46, p < 0.05$], indicando que los grupos ABA-sacarina y ABB-sacarina consumieron menos sacarina que el grupo ABA-agua. El análisis de los valores de consumo de la evaluación mostró un efecto significativo de Grupo [$F(2, 20) = 3.92, p < 0.05$], y el análisis post-hoc indicó que el grupo ABA-sacarina consumió menos sacarina que los demás grupos (ABB-sacarina y ABA-agua). Estos resultados muestran un efecto de renovación de la RC extinguida durante la tercera semana de vida postnatal de la rata. La diferencia entre los grupos ABA-sacarina y ABA-agua sugiere que se trata de un efecto en respuesta a la sacarina y no de condicionamiento del contexto, dado que el grupo ABA-agua también recibió dos inyecciones de LiCl tras pasar por el contexto A durante el condicionamiento. Este resultado constituye la primera evidencia de renovación en crías de rata.

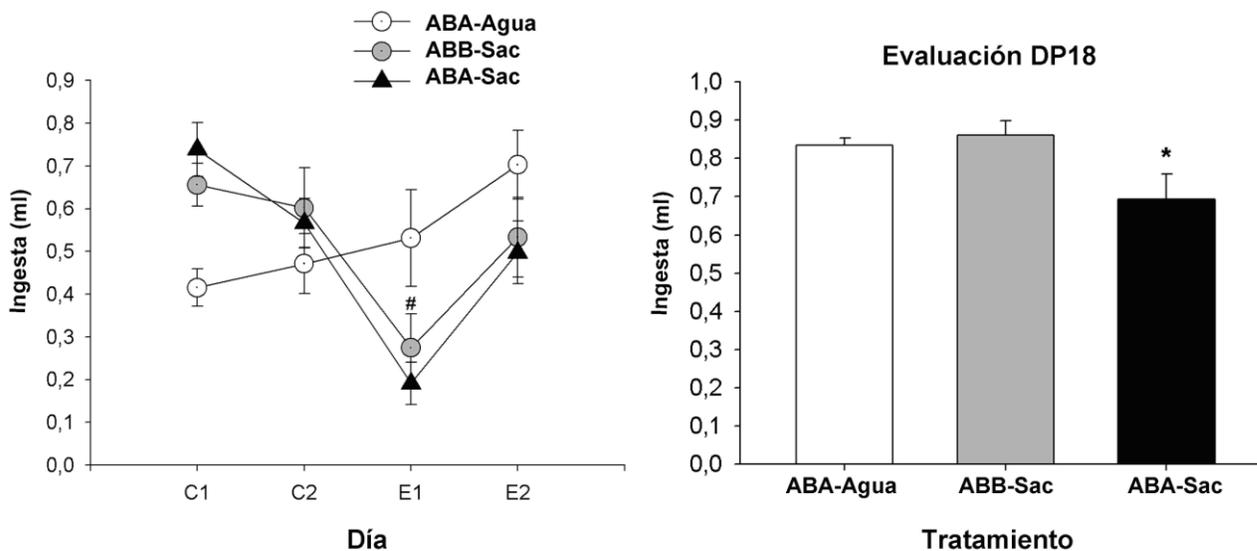


Figura 2: La Figura 2 muestra los resultados del Experimento 2. El panel de la izquierda representa los valores de consumo durante las fases de condicionamiento (C1 y C2) y extinción (E1 y E2), en función de la solución que recibieron durante la fase de condicionamiento y la condición de contexto de cada grupo. El panel de la derecha, muestra los niveles de consumo durante la evaluación. # indica diferencia significativa entre el grupo Sacarina-extinción y las demás condiciones experimentales. * indica diferencia significativa entre el grupo experimental y el resto de las condiciones control. $P < 0.05$

Experimento 3: Restauración de la respuesta extinguida

El objetivo del Experimento 3 fue evaluar la posibilidad de recuperar la RC extinguida mediante la presentación del EI como “recordatorio” en un procedimiento de restauración. En este experimento, los animales del grupo experimental (Sacarina +/-) recibieron dos ensayos de condicionamiento sacarina-LiCl los DPs 14 y 15, dos ensayos de extinción los DPs 16 y 17 y, finalmente, el DP17 fueron evaluados en el consumo de sacarina después de recibir una inyección de LiCl de la mitad de la dosis de condicionamiento. Otros tres grupos fueron incluidos para controlar posibles efectos inespecíficos de este tratamiento.

La Figura 3 representa los valores de consumo de cada grupo en cada día del Experimento 3. El ANOVA reveló una interacción significativa Grupo x Día [$F(12, 104) = 6.01, p < 0.05$]. Posteriores ANOVAs de una vía mostraron un efecto significativo de Grupo en el Día 1 [$F(3, 26) = 11.13, p < 0.05$] y en el día de evaluación [$F(3, 26) = 4.50, p < 0.05$].

Los análisis post-hoc revelaron que en el primer día de extinción el grupo Sacarina -/+ consumió más sacarina que los demás grupos, indicando que los grupos Sacarina +/+ y Sacarina +/- habían aprendido aversión a la sacarina. En el día de evaluación, el grupo Sacarina +/+ consumió menos sacarina que los demás grupos, indicando la efectividad del tratamiento de restauración para recuperar la RC extinguida. Este efecto no puede ser explicado por la experiencia previa con el LiCl ni por la experiencia de condicionamiento, dado que el grupo Vinagre +/+ también consumió significativamente más sacarina el día de la evaluación.

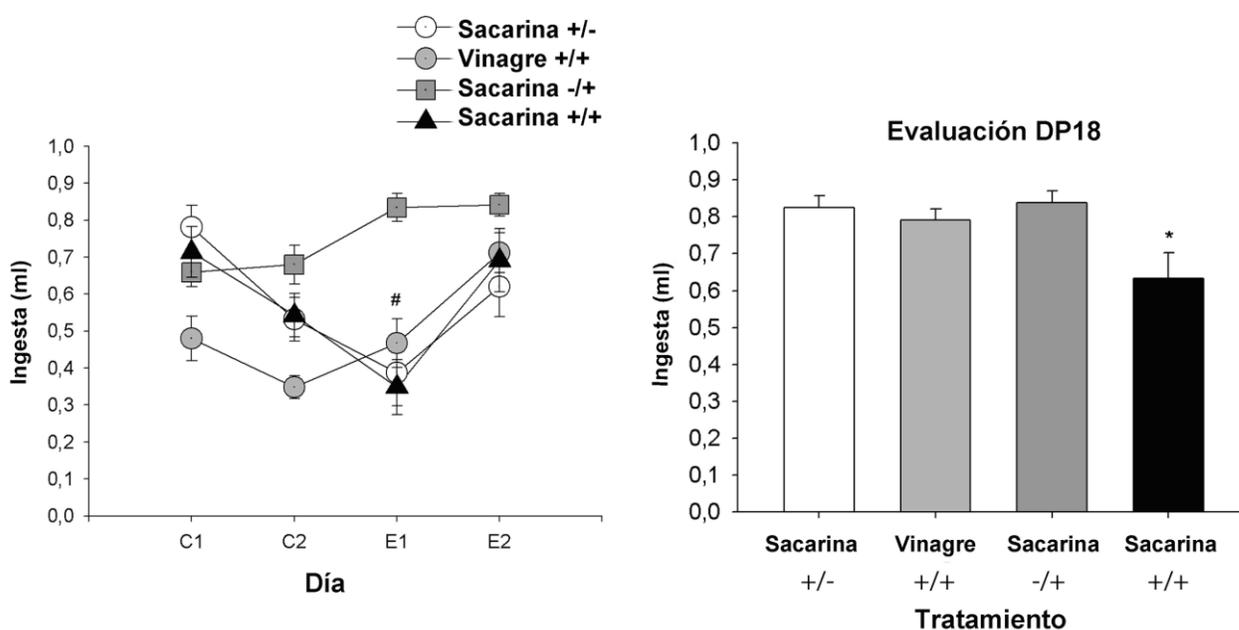


Figura 3: La Figura 3 muestra los resultados del Experimento 3. El panel de la izquierda representa los valores de consumo durante las fases de condicionamiento (C1 y C2) y extinción (E1 y E2), en función de la solución que recibieron durante las fases de condicionamiento y extinción, y el tratamiento de restauración de cada grupo. El panel de la derecha, muestra los niveles de consumo durante la evaluación. # indica diferencia significativa entre el grupo Sacarina-extinción y las demás condiciones experimentales. * indica diferencia significativa entre el grupo experimental y el resto de las condiciones control. $P < 0.05$

Sumario de la primera serie experimental

Se ha sugerido que existen diferencias cualitativas en el fenómeno de extinción a lo largo de la ontogenia de la rata. Se propuso que el proceso de extinción en crías de rata menores a 21 días de vida postnatal, a diferencia de lo descrito en ratas adultas, lleva al olvido (o borrado) de la memoria extinguida (Quirk et al., 2010). Esta primera serie

experimental se propuso con el objetivo de estudiar la posibilidad de restablecimiento, renovación y facilitación de la readquisición de una respuesta condicionada (RC) extinguida en crías de rata predestetadas, en un paradigma de ACS. Los resultados de estos experimentos aportan evidencias concluyentes de que la RC no es eliminada tras su extinción en crías de rata menores a 21 días de vida postnatal. Además, el resultado del Experimento 2 sugiere que, contrariamente a lo que se propuso en la literatura, las claves contextuales juegan un papel importante en la regulación del aprendizaje de extinción en animales menores a 21 días de vida posnatal.

De esta manera, estos resultados desafían la idea de que existan diferencias cualitativas ontogénicas en el aprendizaje de extinción. Sin embargo, podría alegarse que las conclusiones extraídas de los experimentos previos no son directamente comparables con los antecedentes de la literatura, por tratarse de un procedimiento experimental diferente. El procedimiento que empleamos en esta serie de experimentos fue el de aversión condicionada al sabor, y las conclusiones previas de la literatura se apoyaron en resultados obtenidos con un procedimiento de condicionamiento de miedo. Si bien algunas de las estructuras neuronales que se activan en el aprendizaje de miedo, también participan en el aprendizaje de aversión condicionada al sabor, se sabe que en este último participan otras áreas del cerebro que no están involucradas en el aprendizaje de miedo. Por este motivo, resulta necesario extender estos resultados a un procedimiento de miedo condicionado, y para tal fin se propuso la segunda serie de experimentos que se describe a continuación.

4.2 SEGUNDA SERIE EXPERIMENTAL: RENOVACIÓN, RESTABLECIMIENTO Y RECUPERACIÓN ESPONTÁNEA EN UN PROCEDIMIENTO DE MIEDO CONDICIONADO.

Los resultados obtenidos en el paradigma de aversión condicionada fueron muy alentadores. Las evidencias de facilitación de la readquisición, restablecimiento y renovación de la RC extinguida, dan cuenta de que es posible encontrar indicadores de que las crías de rata predestetadas utilizan de manera flexible la información aprendida en el pasado, para resolver una tarea. De esta manera, podemos suponer que los resultados y conclusiones que Richardson y sus colegas extrajeron de sus estudios sobre el efecto de extinción en la infancia de la rata, no pueden generalizarse al procedimiento de extinción como un paradigma de aprendizaje asociativo ni a la infancia de la rata como período ontogénico, sino que deben ser entendidos a partir de los parámetros que definen sus experimentos y del marco explicativo que los contiene.

Dado que Richardson y sus colegas desarrollaron sus estudios en un procedimiento de condicionamiento de miedo, dedicamos una serie de experimentos a estudiar la posibilidad de renovación (Experimentos 4a y 4b), restablecimiento (Experimentos 5a-g) y recuperación espontánea (Experimentos 6a-b) en crías de rata de 17 días de vida postnatal, en un procedimiento de condicionamiento de miedo y con parámetros similares a los empleados por Richardson y sus colegas. En algunos de nuestros experimentos, además, realizamos la saliencia de los contextos agregando un olor e intentamos describir todo el comportamiento que los animales hicieron durante la evaluación, ordenándolo en cuatro categorías: *freezing*, conductas de aseo, exploración vertical y exploración horizontal. A continuación presentamos en detalle cada uno de los experimentos de esta serie. La tabla que contiene los tratamientos y la n por grupo se presenta en el comienzo del apartado de Resultados de cada experimento.

MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES

Aparatos

En el Experimento 4 utilizamos dos contextos diferentes A y B. Ambos contextos eran una caja de Plexiglas (29 cm × 17 cm × 20 cm) con paredes opacas, excepto por la pared del frente que era transparente para permitirnos filmar a los animales durante el experimento. El piso era una reja con barras de cobre de 0,2 cm de diámetro, separadas por 1 cm, conectado a un generador de electricidad (L.I.A.D.E. – FCEFYN, UNC, Córdoba, Argentina) que transmite una descarga eléctrica de 0.6 mA durante 1 segundo. Además, las cajas tenían una tapa de Plexiglas opaca, removible y un pequeño parlante (3 cm x 4 cm x 2 cm) adherida a la parte superior de la pared del fondo. En el Experimento 4a, las paredes del contexto A eran de color blanco, mientras que las paredes del contexto B tenían franjas de color negro de 2 cm de ancho, separadas por 5 cm una de otra. En el Experimento 4b utilizamos los mismos contextos y les agregamos un algodón en el techo con 0.5 ml de esencia de almendra (Esencias del Boticario, Córdoba, Argentina) al contexto A y 0.5 ml de esencia de naranja (Esencias Bangladesh, Buenos Aires, Argentina) al contexto B (Tabla 2).

En el Experimento 5 (a-g) Utilizamos los mismos contextos A y B que en el experimento anterior, con la única diferencia de que en este caso, las paredes del contexto B eran completamente negras. La fase de condicionamiento tuvo lugar siempre en el contexto A, mientras que para las fases de extinción y evaluación utilizamos el contexto A (AAA) o el contexto B (ABB). En todos los experimentos siguientes de esta serie se usaron estos mismos contextos, con o sin enriquecimiento con olores (almendra o naranja) como en el experimento 4, lo cual se indica en cada experimento y en la Tabla 3.

En el Experimento 6 se emplearon los mismos contextos que en el 5, en el 6a sin olores y sin cambio de contexto (sólo contexto A) y en el 6b se realizó un cambio de contexto entre condicionamiento y extinción (AB) y los contextos fueron enriquecidos con olores (Tabla 4).

Procedimientos del Experimento 4

Condicionamiento: El experimento empezó con la fase de condicionamiento, el DP 17 de las ratas. Cada cría fue asignada aleatoriamente a un grupo (ABA o ABB) y transportada de manera individual al contexto A. Luego de un minuto de adaptación al contexto, comenzaba el primer ensayo de condicionamiento que consistía en la presentamos el EC (un tono de 90 dB) durante 10 segundos e inmediatamente después del EC recibían una descarga eléctrica (0.6 mA durante 1 segundo) en las patas (EI). Después de 8 ensayos de condicionamiento separados por 50 segundo, las crías permanecieron en el contexto A durante 30 segundos y volvíamos a llevarlas a su caja hogar con el resto de su camada.

Extinción: El día siguiente (DP18 de las ratas), volvíamos a transportar individualmente a las crías, esta vez al contexto B, para la fase de extinción. Después de un minuto de habituación, le presentamos el mismo EC 30 veces seguidas, con un intervalo de 10 segundos. En esta fase, el EI no fue presentado. Inmediatamente después del último EC, devolvimos a las crías con el resto de su camada.

Evaluación: El DP19 de las crías, las transportamos al contexto A o B, según el grupo al que habían sido asignadas (ABA o ABB) y, después de un minuto, les presentamos el EC durante 2 minutos de manera ininterrumpida.

Para analizar el comportamiento de las ratas durante el experimento, filmamos las fases de extinción y evaluación. La variable dependiente fue el tiempo que cada animal pasó inmóvil, en una la respuesta de congelamiento o *freezing*, durante la presentación del EC. Durante la extinción, la RC fue analizada en 5 bloques que incluían 6 ECs cada uno, mientras que en el test, analizamos la RC durante el tiempo anterior a la presentación del EC (un minutos) y durante los dos minutos de duración del EC, en dos bloques distintos.

Procedimientos del Experimento 5

Experimentos 5a y 5b

Condicionamiento: En los Experimentos 5a y 5b, el condicionamiento tuvo lugar el DP17 de las ratas, en el contexto A. El procedimiento fue similar al descrito en el experimento anterior, pero los parámetros fueron modificados. En este caso, luego de un minuto de

adaptación al contexto, a las ratas del grupo Emparejado les presentamos el EC (un tono de 90 dB) durante 20 segundos y una descarga eléctrica de 0.5 mA (EI) durante el último segundo del EC. El condicionamiento consistió en 2 ensayos en el Experimento 5a y en 6 ensayos en el Experimento 5b, en ambos casos el intervalo entre ensayos varió entre 25 y 130 segundos, con un promedio de 70 segundos. Los animales del grupo Desemparejado, tuvieron la misma cantidad de exposiciones a cada estímulo, pero separados por un intervalo de 45 segundos y el entrenamiento comenzó con la presentación del EI un minuto después de que dejamos a las crías en el contexto A. La fase de condicionamiento finalizó 30 segundos después de la presentación del último EI (grupo Emparejado) o del último EC (grupo Desemparejado). Inmediatamente después del condicionamiento, devolvimos a los animales a su caja hogar con el resto de su camada.

Extinción: La fase de extinción tuvo lugar el DP18 de las ratas, 24 horas después del condicionamiento, en el contexto A para una mitad de los animales y en el contexto B para la otra. Dos minutos después de dejar a los animales en el contexto asignado, fueron expuestos a 2 (Experimento 5a) o 6 (Experimento 5b) ensayos de extinción consistentes en la presentación del EC sólo durante 30 segundos, con intervalos de 30 segundos. Inmediatamente después del último EC, devolvimos a los animales con el resto de su camada.

Experimentos 5c y 5d

El procedimiento fue el mismo en ambos experimentos con la diferencia de que en el 5c los contextos fueron enriquecidos con olores, mientras que en el 5d no.

Condicionamiento y Extinción: El procedimiento de condicionamiento y extinción fue similar al utilizado en el Experimento 5b. En este caso, la mitad de los animales pasaron las distintas fases del experimento en el mismo contexto (AAA) y la otra mitad, pasó las fases de extinción y test en un contexto distinto del de condicionamiento (ABB).

Restauración y evaluación: 24 horas después de la extinción, los animales fueron transportados al contexto de evaluación. La evaluación consistió en 8 presentaciones del EC de 30 segundos de duración, separadas por un intervalo de 30 segundos. El primer EC

apareció 2 minutos después de que los animales entraron al contexto de evaluación. La mitad de los animales de cada grupo (Emparejado y Desemparejado) recibieron una descarga eléctrica de 0.3 mA y 1 segundo de duración (recordatorio) un minuto después de entrar en el contexto, mientras que la otra mitad.

Experimentos 5e y 5f

Condicionamiento: Siguiendo el procedimiento del Experimento 5a utilizamos 2 ensayos de condicionamiento. Los grupos fueron los mismos que en los experimentos anteriores, Emparejado-Recordatorio, Emparejado-Sin recordatorio y Desemparejado-Recordatorio. En el Experimento 5e los contextos tenían olores, mientras en el Experimento 5f, no.

Extinción: El procedimiento de extinción fue igual al de los experimentos 5c y 5d, con la diferencia que en este caso el entrenamiento consistió en 6 ensayos de extinción y no 8, ya que con 6 ensayos se consigue la extinción completa después de 2 ensayos de condicionamiento.

Restauración y Evaluación: Es el mismo procedimiento de evaluación que en los experimentos 5e y 5d.

Experimento 5g

Condicionamiento: Se usó el mismo procedimiento descrito en el Experimento 5f, con dos ensayos de condicionamiento en la condición ABB, sin olores en los contextos, en ratas de 24 días de vida postnatal.

Extinción: El procedimiento de extinción fue el mismo descrito para los experimentos anteriores, con 8 ensayos de extinción en lugar de 6 dado que el entrenamiento generó en estos animales una RC más persistente que en el DP17.

Restauración y evaluación: utilizamos los mismos parámetros que en los experimentos 5e y 5f.

Procedimientos del Experimento 6

Experimento 6a

Utilizamos los mismos parámetros de condicionamiento descritos en los experimentos anteriores, con algunas diferencias. Los animales fueron asignados a los siguientes esquemas de entrenamiento, EC-solo, EI-solo o Emparejado. A continuación se detallan los procedimientos de condicionamiento, extinción y evaluación.

Condicionamiento: Después de un minuto de adaptación al contexto, los animales recibieron 8 ensayos de condicionamiento, separados por un intervalo de 50 segundos y fueron devueltos a su caja hogar. Cada ensayo de condicionamiento consistió en la presentación de un tono de 90 dB y 10s de duración (EC) seguido de una descarga eléctrica de 0.6 mA y 1 segundo de duración (EI) como se describió en los experimentos anteriores. Los animales de los grupos EC-solo y EI-solo, fueron expuestos únicamente al EC o al EI respectivamente durante la fase de condicionamiento.

Extinción: La fase de extinción tuvo lugar entre los DPs 18-21. El entrenamiento de extinción consistió en 8 presentaciones del EC de 2 minutos cada una, dos presentaciones del EC por día después de un minuto de adaptación al contexto y separadas por un minuto de intervalo.

Evaluación de la recuperación espontánea: Diez días después de la última presentación del EC, durante el DP31 de las ratas, volvimos a exponerlas al EC para evaluar su comportamiento.

Experimento 6b

Condicionamiento: El condicionamiento tuvo lugar el DP17 de las crías y siguió un procedimiento similar al descrito en el experimento anterior. Los tratamientos fueron los mismos del Experimento 6a, EC-solo, EI-solo y Emparejado, y agregamos un tratamiento Desemparejado. El entrenamiento se llevó a cabo en el contexto A. A diferencia del experimento anterior, en este caso el entrenamiento consistió en 6 ensayos de condicionamiento en los que se presentó el EC (un tono de 90 dB) durante 20 segundos coincidiendo al final con la aparición del EI (una descarga eléctrica de 0.5 mA durante un segundo) en el segundo 19. Los ensayos de condicionamiento comenzaron un minuto después de que los animales entraron al contexto A y estuvieron separados por un

intervalo promedio de 70 segundos (entre 25 y 130 segundos). Treinta segundos después del último ensayo, los animales fueron devueltos a su caja hogar con el resto de su camada. Los animales de los grupos EC-solo y EI-solo, fueron expuestos únicamente al EC o al EI respectivamente durante la fase de condicionamiento, mientras los animales del grupo Desemparejado fueron expuestos a ambos estímulos separados por un intervalo de 50 segundos.

Extinción: A diferencia del experimento anterior, la extinción tuvo lugar el DP18 de las crías en un contexto diferente del de condicionamiento (contexto B). Un minuto después de entrar al contexto de extinción, las crías fueron expuestas a 8 presentaciones del EC de 30 segundos de duración y separadas por un intervalo de 30 segundos. Inmediatamente después del último EC, las crías fueron llevadas de vuelta a su caja hogar.

Evaluación de la recuperación espontánea: Uno (DP19) y 11 (DP29) días después de la extinción, volvimos a analizar el comportamiento de los animales ante el EC (30 segundos), tras dos minutos de adaptación al contexto B.

Análisis de datos

Los datos del Experimento 4 de extinción fueron analizados mediante un ANOVA mixto, incluyendo Contexto como el único factor entregupo, con dos niveles (ABA y ABB) y Bloque como variable intragrupa, con cinco niveles correspondientes a los 5 bloques en los que agrupamos los 30 ensayos de extinción. Los datos de la fase de evaluación, tanto del minuto previo a la presentación del EC (línea de base o LB), como de los dos minutos de presentación del EC, fueron analizados mediante ANOVAs de una vía que incluyeron Contexto (ABA y ABB) como único factor.

La variable dependiente para el Experimento 5 fue también el porcentaje de tiempo que las ratas pasaron haciendo la respuesta de *freezing*, respecto del tiempo total de exposición al EC. La respuesta de *freezing* fue analizada en bloques de dos ECs. En cada experimento, los valores de *freezing* fueron analizados mediante una ANOVA mixto, incluyendo las variables independientes indicadas en la Tabla 3 (Grupo y Contexto) como factores entregupo y Bloque como variable intragrupa.

Para el Experimento 6a y b se analizaron cuatro categorías de comportamiento como variable dependientes: (1) Exploración Horizontal: el tiempo que las crías pasan explorando la caja, desplazándose con las cuatro patas en el piso. (2) Exploración Vertical: cuando las crías exploran la caja parados sobre sus patas traseras y con las patas delanteras apoyadas a la pared. (3) Aseo: la conducta de aseo fue descrita como una secuencia de movimientos que empiezan con movimientos elípticos y rápidos de las patas sobre la nariz. En algunas ocasiones, este movimiento puede continuar y desplazarse a los costados del cuerpo. (4) Respuesta de congelamiento o *freezing*: descrito como el tiempo que el animal pasa sin más movimientos que los necesarios para respirar. Estas categorías son mutuamente excluyentes y ningún comportamiento fue incluido en más de una categoría.

Consideramos dos indicadores de recuperación espontánea, por un lado los cambios en el patrón de comportamiento de los animales de cada grupo (intragrupo) ante la presentación del EC durante la evaluación respecto del último EC de la extinción. Por otro lado, las diferencias en el comportamiento de los animales en la evaluación tomando el Grupo como variable independiente. Aunque el análisis intragrupo es la medida que normalmente se utiliza para identificar indicadores de recuperación espontánea, decidimos incluir también la comparación entregrupos porque consideramos que puede ser informativo en este caso, debido a los cambios en el comportamiento de los animales que pueden darse tras 10-11 días en este período ontogenético.

RESULTADOS

Experimentos 4a y 4b: Renovación en condicionamiento de miedo

El objetivo del Experimento 4 fue analizar la posibilidad de renovación de una respuesta extinguida de miedo. En la Tabla 2 están recogidos los grupos que conformaron los experimentos, los días de entrenamiento y la n de cada grupo.

Tabla 2. Diseño experimental, Experimentos 4a y 4b. Renovación en condicionamiento de miedo.

Grupo	Condicionamiento DP17	Extinción DP18	Evaluación DP19	Olor	n
Experimento 4a					
ABB	Tono-descarga (A)	Tono (B)	Tono (B)	No	9
ABA	Tono-descarga (A)	Tono (B)	Tono (A)	No	9
Experimento 4b					
ABB	Tono-descarga (A)	Tono (B)	Tono (B)	No	10
ABA	Tono-descarga (A)	Tono (B)	Tono (A)	No	8

La figura 4a, muestra los valores de *freezing* durante la fase de extinción del Experimento 4a. El ANOVA reveló un efecto principal de Bloque [$F(4,64) = 3.77$; $p < 0.05$] y el análisis post-hoc indicó que la RC fue significativamente menor en el último bloque que en los dos primeros. No encontramos diferencias significativas entre los grupos [ABA and ABB, $F(1,16) = 0.28$; $p = 0.87$] ni interacción Contexto x Bloque [$F(4,64) = 0.48$; $p = 0.75$]. Estos resultados indican que el tratamiento de extinción fue efectivo en ambos grupos. Los datos de la evaluación, están presentados en la Figura 4b. El ANOVA no mostró diferencias significativas entre grupos en la línea de base [ABA and ABB, $F(1,16) = 0.76$; $p = 0.40$] ni en la presentación del EC [$F(1,16) = 1.01$; $p = 0.32$, respectivamente].

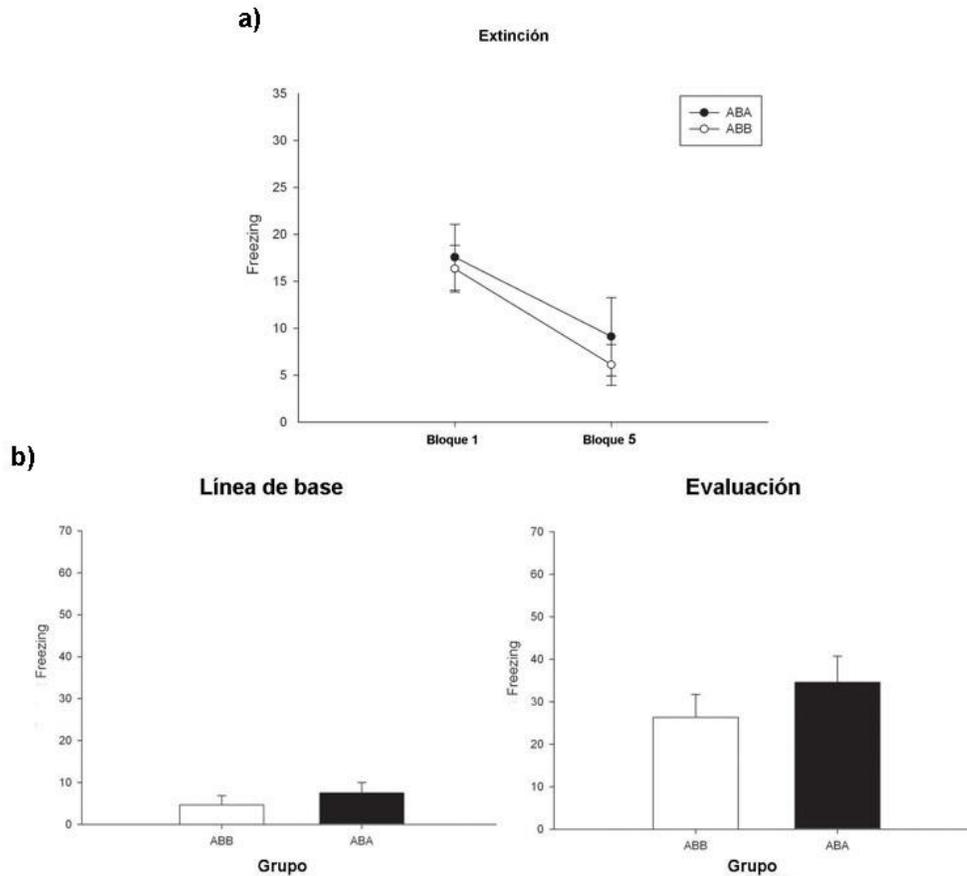


Figura 4: La Figura 4 muestra los resultados del Experimento 4a. En la parte superior están representados los valores de *freezing* en el primero y último Bloque de la extinción, en función del tratamiento de renovación. En la parte inferior, están representados los resultados los datos de la evaluación, durante la línea de base (panel de la izquierda) y la presentación del EC (panel de la derecha).

De manera coherente con los antecedentes de la literatura, estos resultados indican que el cambio de contexto no fue efectivo para recuperar la RC en crías de rata de 17 días de vida postnatal, por lo que no se observó el efecto de renovación. En algunos estudios con animales adultos se ha puesto de manifiesto que el efecto de renovación depende de que los contextos A y B se diferencien en más de una dimensión, siendo el olor una clave que puede contribuir de manera significativa, especialmente en las crías de rata que abren los ojos a los 14-15 días. En la primera serie de experimentos observamos en crías de rata el efecto de renovación con contextos que estaban enriquecidos con olores y otros autores han mostrado que los olores, en este periodo del desarrollo, facilitan el aprendizaje y retención de información contextual. Por eso en el siguiente

experimento repetimos el procedimiento con olores señalando los contextos A y B.

Los resultados del Experimento 4b, están presentados en la Figura 5. La Figura 5a muestra los valores de *freezing* durante la extinción, mientras que la Figura 5b muestra los valores de *freezing* durante la evaluación (LB y EC). El ANOVA reveló un efecto significativo de Bloque durante la extinción [$F(4,84) = 10.06$; $p < 0.05$] y el post-hoc indicó que ambos grupos hicieron significativamente menos *freezing* durante el último bloque que en los primeros dos. Igual que en el Experimento 1a, no encontramos diferencias significativas entre los grupos [ABA and ABB, $F(1,21) = 1.75$; $p = 0.20$] ni interacción Bloque x Contexto [$F(4,84) = 0.53$; $p = 0.71$]. En la fase de evaluación, esta vez el ANOVA detectó diferencias significativas entre grupos en los niveles de *freezing* durante la presentación del EC [$F(1,21) = 4.53$; $p < 0.05$], pero no durante la LB [$F(1,21) = 0.18$; $p = 0.67$]. Las crías del grupo ABA hicieron más *freezing* que las del grupo ABB durante la presentación del EC, indicando un efecto de renovación por el cambio de contexto tras la extinción de la RC en el DP17 de las ratas. Estos resultados coinciden con lo que vimos en la primera serie experimental de este trabajo, en un procedimiento de aversión condicionada.

Los experimentos desarrollados hasta el momento, arrojan evidencias –por distintas vías- de que las crías de rata predestetadas, son capaces de volver a expresar una RC extinguida. Los experimentos de renovación aportan evidencias de la existencia de aprendizaje contextual por un lado, y de modulación contextual de la RC por el otro. Estos resultados se suman a una cantidad de antecedentes que sugieren que en procedimientos de renovación, o en general en condicionamiento de contexto, cuando se trata de crías de rata predestetadas, es necesario emplear contextos compuestos por claves de diferente modalidad sensorial. La falta de renovación en el Experimento 4a no necesariamente refleja una particularidad de este periodo ontogenético, ya que otros autores han demostrado previamente, que el efecto de renovación ABA en ratas adultas tampoco se observa si los contextos A y B difieren exclusivamente en una modalidad sensorial (Thomas et al, 2003).

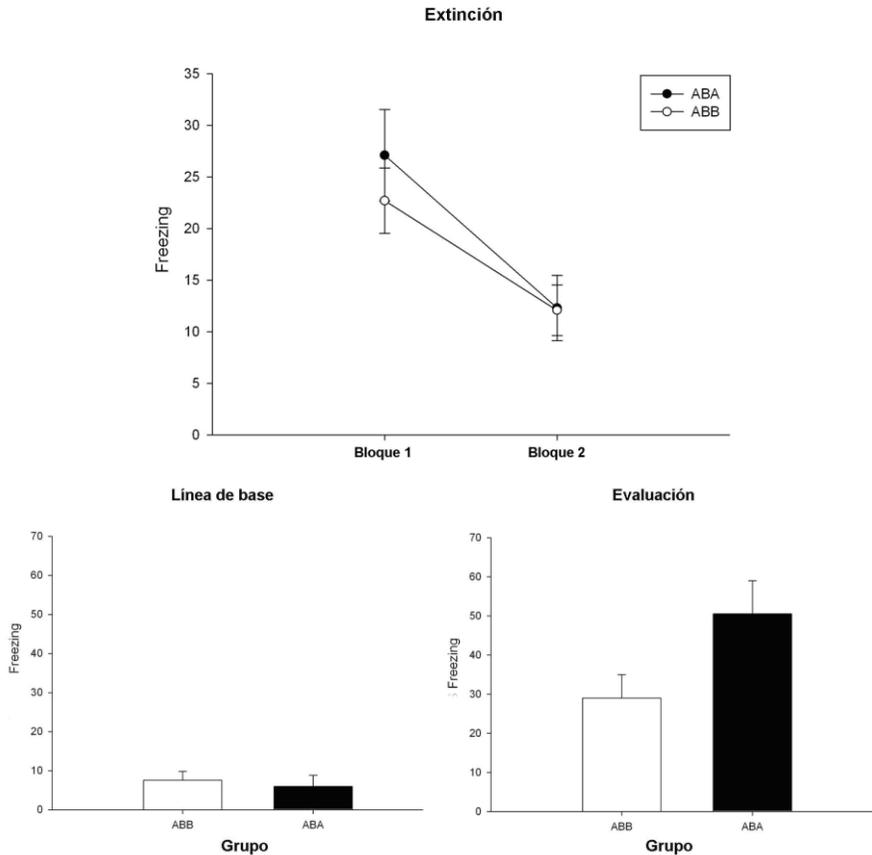


Figura 5: La Figura 5 muestra los resultados del Experimento 4b. En la parte superior están representados los valores de *freezing* en el primero y último Bloque de la extinción, en función del tratamiento de renovación. En la parte inferior, están representados los resultados los datos de la evaluación, durante la línea de base (panel de la izquierda) y la presentación del EC (panel de la derecha). * indica diferencia significativa, $p < 0.05$

Experimento 5: Restauración de la respuesta extinguida

Luego de encontrar que las crías de rata menores a DP21 son capaces de volver a expresar una RC de miedo extinguida, que el contexto juega un papel modulador del comportamiento tras la extinción y que las características sensoriales del contexto es un factor determinante en esta etapa de la ontogenia de la rata, quisimos analizar el efecto de restauración. Para eso realizamos 5 experimentos dirigidos a analizar el efecto de restauración en DP17 en contextos olfativos o estándar (5c-5f) y en DP24 (5g).

Tabla 3. Diseño experimental, Experimentos 5a-5g. Restauración en condicionamiento de miedo.

Exp	Grupo	Condicionamiento	Contexto	Olor	Edad	n
5a	Emparejado	2 ensayos	AA	Si	DP17	7
	Desemparejado		AA			7
	Emparejado		AB			8
	Desemparejado		AB			8
5b	Emparejado	6 ensayos	AA	Si	DP17	7
	Desemparejado		AA			7
	Emparejado		AB			9
	Desemparejado		AB			9
5c	Emparejado-Recordatorio	6 ensayos	AAA	Si	DP17	11
	Desemparejado-Recordatorio		AAA			11
	Emparejado-Sin Recordatorio		AAA			10
	Emparejado-Recordatorio		ABB			8
	Desemparejado-Recordatorio		ABB			8
	Emparejado-Sin Recordatorio		ABB			8
5d	Emparejado-Recordatorio	6 ensayos	AAA	No	DP17	8
	Desemparejado-Recordatorio		AAA			8
	Emparejado-Sin Recordatorio		AAA			9
	Emparejado-Recordatorio		ABB			10
	Desemparejado-Recordatorio		ABB			10
	Emparejado-Sin Recordatorio		ABB			11
5e	Emparejado-Recordatorio	2 ensayos	ABB	Si	DP17	12
	Desemparejado-Recordatorio		ABB			12
	Emparejado-Sin Recordatorio		ABB			12
5f	Emparejado-Recordatorio	2 ensayos	ABB	No	DP17	10
	Desemparejado-Recordatorio		ABB			10
	Emparejado-Sin Recordatorio		ABB			9
5g	Emparejado-Recordatorio	2 ensayos	ABB	No	DP24	11
	Desemparejado-Recordatorio		ABB			11
	Emparejado-Sin Recordatorio		ABB			11

El diseño experimental de cada experimento está descrito en la Tabla 3. Antes de estos experimentos realizamos dos experimentos adicionales (5a-5b), con el fin de

analizar la cantidad de ensayos necesaria para encontrar una respuesta condicionada con y sin cambio de contexto, entre el condicionamiento y la fase de evaluación, y elegir los parámetros para los experimentos siguientes.

Experimentos 5a y 5b

La Figura 6a muestra los datos de *freezing* durante la extinción tras dos ensayos de condicionamiento, ordenados en función de Grupo y Contexto (Experimento 5a). El ANOVA mostró una triple interacción Grupo x Contexto x Bloque [$F(2,44) = 3.47, p < 0.05$]. Esta interacción indica que en la condición de Contexto AB, los valores de *freezing* del grupo Emparejado fueron significativamente mayores que los del grupo Desemparejado, pero solamente en el primer bloque de extinción [$F(1,14) = 19.49, p < 0.05$]. Luego, la RC se extinguió. En la condición de Contexto AA, no encontramos diferencias entre grupos en ningún bloque de extinción.

La Figura 6b muestra los datos de extinción del Experimento 5b, en el que los animales recibieron 6 ensayos de condicionamiento. En este caso, observamos efecto de condicionamiento en ambas condiciones de Contexto (AA y AB). El ANOVA reveló una interacción de Grupo x Bloque [$F(3,72) = 2.82, p < 0.05$]. En ambas condiciones de contexto, el grupo Emparejado mostró niveles de *freezing* significativamente mayores a los del grupo Desemparejado en los tres primeros bloques de extinción [AA: todas las $F_s(1,12) > 7.03$, todas las $s < 0.05$. AB: todas las $F_s(1,16) > 4.64$, todas las $p_s < 0.05$], pero no difirieron en el último bloque.

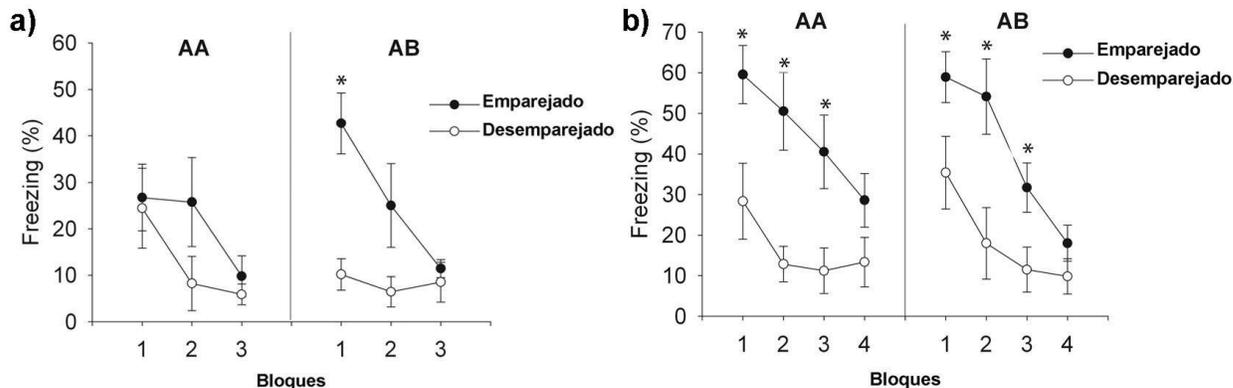


Figura 6: La Figura 6 muestra los niveles de *freezing* durante la evaluación de lo Experimentos 5a (Figura 6a) y 5b (Figura 6b), en función del tratamiento de contexto (AA ó AB) y de condicionamiento (Fig 6a, 2 ensayos y Fig 6b, 6 ensayos). * indica diferencia significativa, $p < 0.05$

Experimento 5c y 5e

El objetivo del Experimento 5c fue explorar si la presentación de un EI (una descarga eléctrica en las patas) de menor intensidad 24 horas después de la extinción de la RC, puede restaurarla. En este experimento aplicamos 6 ensayos de condicionamiento, y la mitad de los animales recibieron todos los tratamientos en el mismo contexto (AAA) y el resto pasaron por un cambio de contexto entre la fase de condicionamiento y de extinción (ABB). En estos experimentos usamos clave olfativa en los contextos.

El panel izquierdo de la Figura 7, muestra los niveles de *freezing* durante la extinción, ordenados en función de Grupo, Contexto y Bloque. El ANOVA mostró una interacción Grupo x Bloque [$F(6,132) = 3.95, p < 0.05$]. Luego hicimos ANOVAs para analizar diferencias entregrupos en cada bloque de extinción, que revelaron un efecto principal de Grupo en los dos primeros bloques en la condición de contexto AAA [todas las $F_s(2,29) > 4.64$, todas las $p_s < 0.05$] y en los tres primeros bloques en la condición de contexto ABB [todas las $F_s(2,21) > 7.66$, todas las $p_s < 0.05$]. De acuerdo con los análisis post-hoc, en todos los bloques en los que se encontró diferencia entregrupos, el grupo Emparejado hizo más *freezing* que el grupo desemparejado, mientras que estas diferencias desaparecieron en el último bloque de extinción. Esto fue igual para ambas condiciones de contexto, indicando que la RC fue correctamente extinguida hacia el final

de la sesión de extinción.

El panel del a derecha de la misma figura muestra los datos de la evaluación. El ANOVA mostró un efecto principal de Grupo [$F(2,44) = 9.83, p < 0.05$]. El análisis post-hoc indicó que los niveles de *freezing* del grupo Emparejado-Recordatorio fueron significativamente mayores a los de los demás grupos (Emparejado-Sin recordatorio, Desemparejado-Recordatorio). Estos resultados replican los hallazgos del Experimento 5b, mostrando el efecto de condicionamiento y extinción en distintas condiciones contextuales (AAA y ABB) y aportan evidencias de restauración de la RC extinguida por la percepción del EI de menor intensidad.

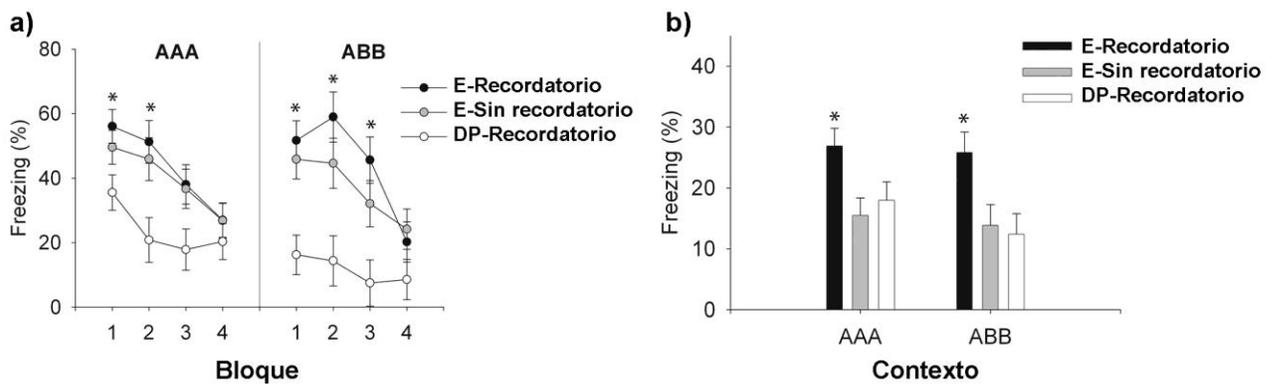


Figura 7: La Figura 7 muestra los niveles de *freezing* durante la extinción (Figura 7a) y la evaluación (Figura 7b) del Experimento 5c, en función del tratamiento de contexto (AAA ó ABB) y de restauración. La Figura 7b muestra los niveles de *freezing* durante la evaluación. El entrenamiento consistió en 6 ensayos de condicionamiento. Se agregaron olores a los contextos. * indica diferencia significativa, $p < 0.05$

El objetivo del Experimento 5d fue evaluar si el efecto de restauración observado en el Experimento 5c, depende de que los contexto empleados incluyan olores como claves características, de la misma manera que el efecto de renovación. Se repitió el procedimiento, pero en esta ocasión sin olores en los contextos. Los datos de extinción están representados en el panel de la izquierda de la Figura 8. El ANOVA reveló una interacción Grupo x Bloque [$F(6,132) = 2.39, p < 0.05$]. Aunque la interacción entre estos factores y el Contexto no resultó significativa, analizamos diferencias entre grupo en cada condición de contexto. Estos análisis mostraron un efecto significativo de Grupo en cada bloque de extinción en la condición de contexto ABB [todas las $Fs(2,28) > 4.99$, todas las

ps < 0.05], mientras que en la condición AAA no encontramos diferencias entre grupo en ningún bloque, más allá de una tendencia en el primer bloque [$F(2,22) = 3.18, p = 0.06$].

Los datos de *freezing* durante la evaluación están representados en el panel derecho de la misma figura. Como puede verse, en este caso el tratamiento de restauración no fue efectivo para recuperar la RC extinguida.

Estos resultados muestran, por un lado que la ausencia de olores en los contextos dificulta la observación del efecto de condicionamiento cuando no existe cambio de contexto entre las fases de condicionamiento y extinción. Por otro lado, tal como observamos en el efecto de renovación, los datos muestran que la presencia de olores en los contextos es importante para trabajar con el efecto de restauración en la tercera semana de vida postnatal de la rata.

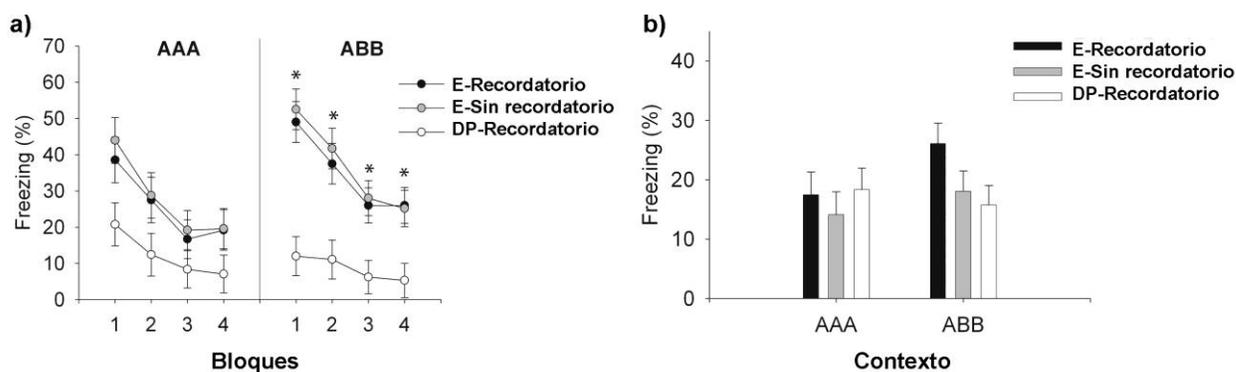


Figura 8: La Figura 8 muestra los niveles de *freezing* durante la extinción (Figura 8a) y la evaluación (Figura 8b) del Experimento 5d, en función del tratamiento de contexto (AAA ó ABB) y de restauración. La Figura 7b muestra los niveles de *freezing* durante la evaluación. El entrenamiento consistió en 6 ensayos de condicionamiento. Se utilizaron contextos estándar.

Experimentos 5e y 5f

El objetivo de los Experimentos 5e y 5f fue corroborar si los resultados obtenidos en los Experimentos 5c y 5d pueden reproducirse modificando los parámetros de condicionamiento y extinción. Usamos dos ensayos de condicionamiento y en el Experimento 5e los contextos fueron enriquecidos con olores, mientras que en el 4f no. En ambos casos trabajamos con un cambio de contexto entre el condicionamiento y la extinción, ya que sin cambio de contexto, en el Experimento 5a, no se observó el efecto

del condicionamiento.

Los resultados del Experimento 5e pueden verse en el panel izquierdo de la Figura 9, en la parte de arriba. De la misma forma que en el Experimento 5a, vimos que la RC cae rápidamente después del primer bloque de extinción. El ANOVA mostró una interacción Grupo x Bloque [$F(4,60) = 2.91, p < 0.05$], que refleja diferencias entre grupos en el primer bloque de extinción [$F(2,33) = 5.38, p > 0.05$]. El análisis post-hoc señaló que el grupo emparejado hizo más tiempo de *freezing* que el Desemparejado. Durante la evaluación (panel derecho de la Figura 4a), el ANOVA mostró un efecto principal de Grupo [$F(2,30) = 4.73, p > 0.05$], indicando que el grupo Emparejado-Recordatorio hizo más tiempo de *freezing* que los demás grupos (efecto de restablecimiento)

En la mitad inferior de la Figura 9 se muestra los resultados del Experimento 5f. La comparación de los valores de *freezing* de los grupos, no mostró diferencias significativas durante la extinción ni durante la evaluación. De manera que encontramos otra vez que el efecto de restauración puede estudiarse a partir de la inclusión de claves olfativas a los contextos, pero no en contextos estándar.

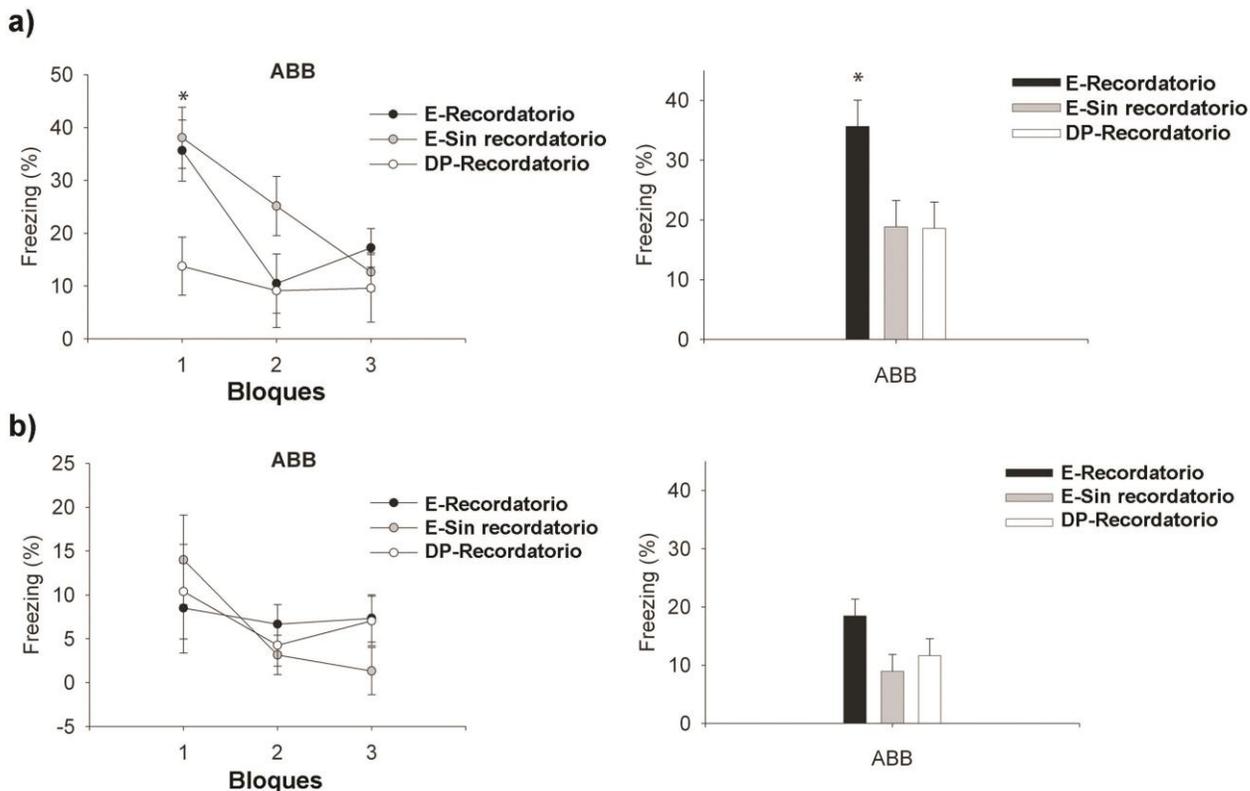


Figura 9: La Figura 9a (mitad superior) muestra los datos del Experimento 5e (contextos con claves olfativas) y la Figura 9b (mitad inferior), los datos del Experimento 5f (contextos estándar). El panel de la izquierda muestra los niveles de *freezing* durante la extinción y el de la derecha, durante la evaluación, en función del tratamiento de restauración. El entrenamiento consistió en 2 ensayos de condicionamiento. * indica diferencia significativa, $p < 0.05$

Experimento 5g

El objetivo de este experimento fue evaluar si la presencia de olores en los contextos como condición para encontrar el efecto de restauración, puede relacionarse a características del período ontogenético de las ratas (DPs 14-21), o puede explicarse por circunstancias del experimento. Para eso, analizamos la posibilidad de que ratas de 24 días de vida postnatal muestren el efecto de restauración utilizando los mismos contextos A y B, pero sin olores. Durante la extinción, los valores de *freezing* de ambos grupos mostraron diferencias significativas entre los bloques [$F(6,81) = 2.55, p > 0.05$]. Encontramos diferencias significativas entre los Grupos en los bloques 1, 2 y 3 [todas las $Fs(2,30) > 4.37$, todas las $ps < 0.05$], que indicaron que los grupos Emparejados hicieron más

tiempo de *freezing* que el grupo Desemparejado (Figura 10, panel de la izquierda). Los datos de la evaluación se representan en el panel derecho de la Figura 10. El ANOVA reveló un efecto principal de Grupo [$F(2,26) = 7.71, p < 0.05$] y el análisis post-hoc indicó que el grupo Emparejado-Recordatorio hizo más tiempo del *freezing* que los demás grupos (Emparejado-Sin recordatorio y Desemparejado-Recordatorio).

Estos resultados son sumamente importantes para la presente tesis, en tanto que muestran que las ratas en DP24 muestran el efecto de restauración con los mismos parámetros que no permitieron ver este efecto en ratas en DP17. Esto nos permite suponer que la presencia del olor como condición para estudiar el efecto de restauración que encontramos en los experimentos 5c y 5f, puede estar relacionada a las características del período ontogenético de las ratas. Si esto es una característica de las ratas durante la tercera semana de vida postnatal, debe ser tomada en cuenta por los investigadores que estén interesados en estudiar efectos de distintas manipulaciones en el aprendizaje en el desarrollo.

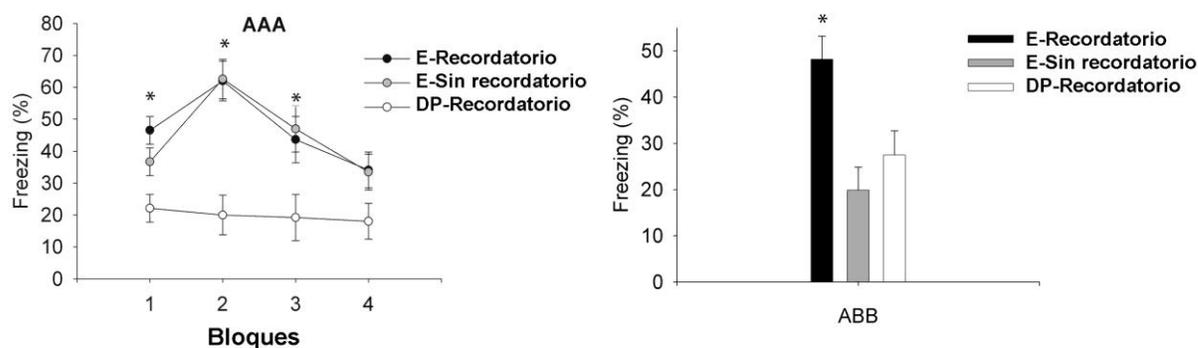


Figura 10: La Figura 10 muestra los niveles de *freezing* durante la extinción (panel de la izquierda) y la evaluación (panel de la derecha) del Experimento 5g, en función del tratamiento de restauración. En este experimento se utilizaron 2 ensayos de condicionamiento y se utilizaron contextos estándar. El experimento tuvo lugar entre los DPs 24-26 de las ratas. * indica diferencia significativa, $p < 0.05$

Experimento 6: Recuperación espontánea de la respuesta extinguida

Además de la renovación y la restauración, un procedimiento muy utilizado para recuperar la RC extinguida es la recuperación espontánea, que consiste simplemente en retrasar el momento de la evaluación. A diferencia de los procedimientos de renovación y

restauración, la recuperación espontánea de una RC extinguida no había sido analizada previamente en crías de rata menores a DP21. En dos experimentos (6a y 6b) analizamos la posibilidad de encontrar recuperación espontánea en las crías de rata. Entre los dos experimentos variamos algunos parámetros para mejorar la sensibilidad del procedimiento, y con respecto a los anteriores, una novedad del Experimento 6 es que en él medimos diferentes comportamientos. Los detalles de los procedimientos se describen a continuación, antes de los resultados.

Tabla 4. Diseño experimental, Experimentos 6a y 6b. Recuperación espontánea en condicionamiento de miedo.

<i>Experimento 6a</i>					
Grupo	Condicionamiento DP17	Extinción DP17-20	Evaluación DP30	Olor	n
EC-solo	Tono (A)	Tono (A)	Tono (A)	No	9
EI-solo	Descarga (A)	Tono (A)	Tono (A)	No	8
Emparejado	Tono-descarga (A)	Tono (A)	Tono (A)	No	10
<i>Experimento 6b</i>					
Grupo	Condicionamiento DP17	Extinción DP18	Evaluación DP19 y 29	Olor	n
EC-solo	Tono (A)	Tono (B)	Tono (B)	Si	9
EI-solo	Descarga (A)	Tono (B)	Tono (B)	Si	9
Emparejado	Tono-descarga (A)	Tono (B)	Tono (B)	Si	9
Desemparejado	Tono/descarga (A)	Tono (B)	Tono (B)	Si	9

Experimento 6a

La Figura11 (a-d) representa los datos de las cuatro categorías de comportamiento analizadas en cada Grupo, durante el entrenamiento de extinción (EC1-8) y la evaluación de recuperación espontánea (EC9).

Freezing: El ANOVA con los datos de *freezing* durante la extinción, mostró una interacción Grupo x EC [$F(2,24) = 11.08, p < 0.05$]. Para explorar esta interacción hicimos ANOVAs de una vía entregrupos con los datos de *freezing* de los EC1 y EC8. Encontramos un efecto significativo de Grupo en el EC1 [$F(2,24) = 11.30, p < 0.05$], indicando que los grupos Emparejado y El-solo hicieron significativamente más *freezing* que los animales del grupo EC-solo. Estas diferencias no se encontraron en el EC8, mostrando el efecto de extinción de la respuesta de *freezing*. El ANOVA con los datos de los EC8 y EC9 también mostró una interacción Grupo x EC [$F(2,24) = 11.08, p < 0.05$], debido a una diferencia significativa entre grupos en el EC9 [$F(2,24) = 6.49, p < 0.05$]. El análisis post-hoc indicó que el grupo Emparejado hizo más *freezing* que los grupos El-solo y EC-solo en la evaluación. Los ANOVAs intragrupo, sólo mostraron diferencias significativas entre los EC8 y EC9 en el grupo Emparejado [$F(1,9) = 5.83, p < 0.05$]. Estos datos muestran que el grupo Emparejado es el único que muestra un incremento en los niveles de *freezing* en la evaluación respecto del último ensayo de extinción. Además ese incremento elevó su respuesta por encima de los demás grupos en el día de evaluación. Ambos indicadores nos permiten pensar que se trata de un efecto de recuperación espontánea de la RC extinguida.

Aseo: Aunque los valores de Aseo de los grupos Emparejado y El-solo fueron menores en el EC1 [$F(2,24) = 15.14, p < 0.05$] y durante la mayor parte de la extinción, que los del grupo EC-solo, el ANOVA no encontró diferencias significativas ni interacción. Tampoco encontramos diferencias significativas en esta categoría entre los EC8 y EC9.

Exploración Vertical: No encontramos diferencias significativas entre grupos durante la

extinción en esta categoría. Sin embargo, durante el EC9 los grupos EC-solo y EI-solo mostraron un claro incremento en el tiempo dedicado a esta conducta, comparados con el grupo Emparejado [$F(2,24) = 16.88, p < 0.05$]. El ANOVA con los valores de los EC8 y EC9, mostró una interacción Grupo x EC [$F(2,24) = 12.11, p < 0.05$] y posteriores ANOVAs intragrupo mostraron un incremento significativo de la Exploración Vertical en el EC9 respecto del EC8 en los grupos EC-solo [$F(1,8) = 86.60, p < 0.05$] y EI-solo [$F(1,7) = 10.05, p < 0.05$], pero no en el grupo Emparejado.

Exploración Horizontal: El ANOVA mostró una interacción Grupo x EC [$F(2,24) = 4.81, p < 0.05$] durante la extinción. Las diferencias entre grupos solamente fueron significativas en el primer EC [$F(2,24) = 14.88, p < 0.05$], en el que los grupos Emparejado y EI-solo hicieron menos tiempo de Exploración Horizontal que el grupo EC-solo. No encontramos efectos significativos entre los EC8 y EC9

En resumen, creemos que estos resultados muestran evidencias de recuperación espontánea de una RC extinguida antes del DP21. Sin embargo, el hecho de que el grupo EI-solo haya mostrado un patrón de comportamiento similar al grupo Emparejado durante la extinción agrega algunas dudas a la interpretación de los resultados, sugiriendo la posibilidad de que el condicionamiento haya generado una sensibilización y que este efecto esté interfiriendo en las fases de extinción y evaluación. A esto se podría sumar un efecto de condicionamiento de contexto, dado que utilizamos en todas las fases el mismo contexto. Para descartar estas explicaciones alternativas, hicimos otro experimento en el que variamos muchos de estos parámetros, para verificar el efecto de recuperación espontánea en crías de rata predestetadas.

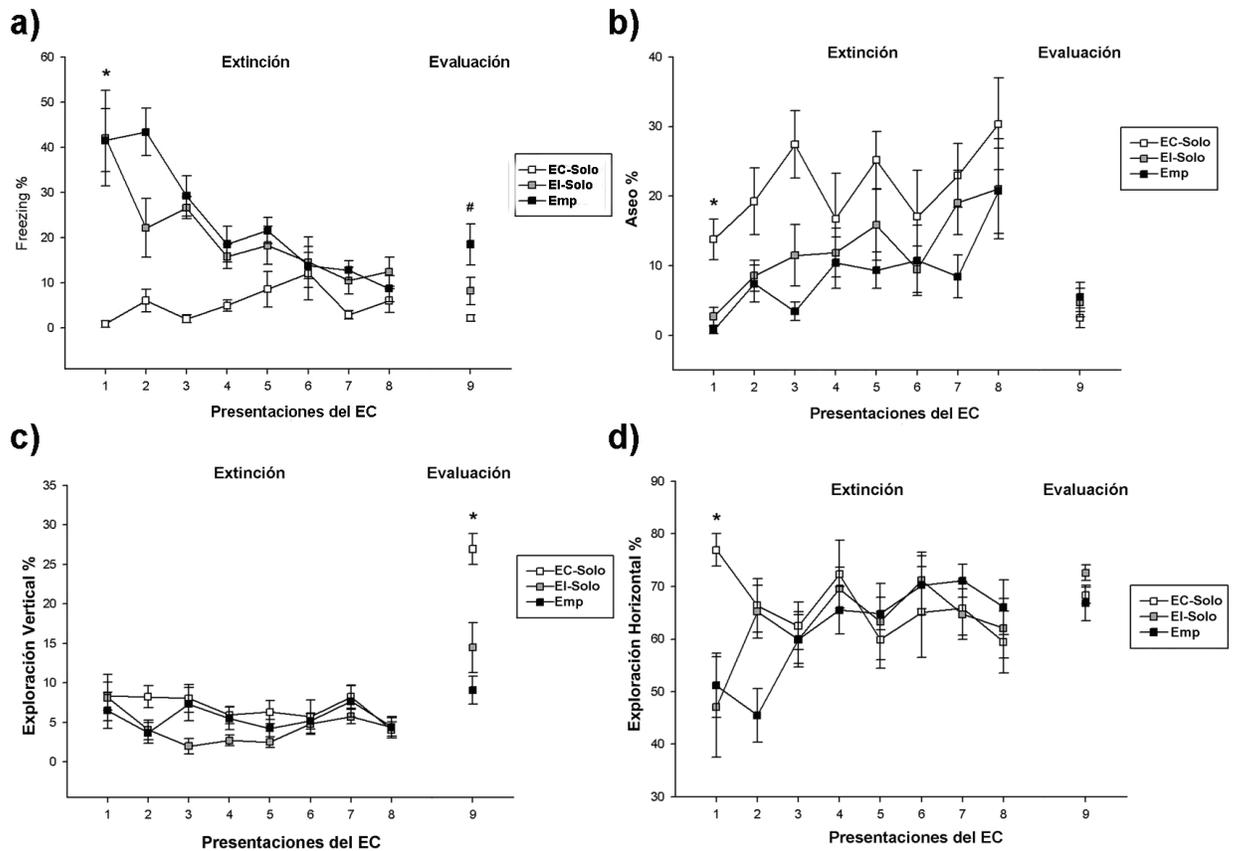


Figura 11: La figura 11 muestra los valores de a) *freezing*, b) Aseo, c) Exploración Vertical y d) Exploración Horizontal, en función de tratamiento de condicionamiento, del Experimento 6a. * indica diferencia significativa, $p < 0.05$

Experimento 6b

A continuación describimos los datos presentados en la Figura 12 (a-d).

Freezing: El ANOVA con los datos de extinción reveló una interacción Grupo x EC [$F(3,32) = 11.08$, $p < 0.05$], debida a diferencias entre grupo observadas únicamente en el EC1 [$F(3,32) = 16.05$, $p < 0.05$]. De acuerdo con el análisis post-hoc, el grupo Emparejado hizo más *freezing* que los demás grupos en el EC1. En el análisis de los valores de *freezing* en los EC8 y EC9 no encontramos la interacción Grupo x EC. El ANOVA con los valores del EC9

mostró un efecto principal de Grupo [$F(3,32) = 6.09, p < 0.05$], indicando que los sujetos del grupo emparejado pasan más tiempo haciendo *freezing* que los de los demás grupos. El ANOVA con los valores de los EC8 y EC10 reveló una interacción Grupo x EC [$F(3,32) = 7.05, p < 0.05$], debida a una marcada diferencia entre grupos en el EC10 [$F(3,32) = 14.47, p < 0.05$], indicando que el grupo Emparejado hizo más *freezing* que los demás grupos. En este caso, solamente el grupo Emparejado mostró un incremento significativo en los valores de *freezing* respecto del último ensayo de extinción [$F(1,8) = 24.82, p < 0.05$].

Aseo: no encontramos diferencias significativas en esta categoría.

Exploración Vertical: el único análisis que mostró efectos significativos es el que incluye los datos de los EC8 y EC10, mientras que no encontramos efectos significativos durante la fase de extinción, ni entre los EC8 y EC9. La interacción Grupo x EC que encontramos está relacionada a las diferencias entre grupos en el EC10 [$F(3,32) = 6.18, p < 0.05$]. El análisis post-hoc mostró que el grupo Emparejado hizo significativamente menos Exploración Vertical que los demás grupos. Además, los grupos EC-solo y EI-solo mostraron un incremento significativo en esta categoría en el EC10 respecto del EC8 [EC-solo: $F(3,32) = 31.22, p < 0.05$; EI-solo: $F(3,32) = 16.12, p < 0.05$]. Estas diferencias casi alcanzan el nivel de significación estadística en el grupo Desemparejado $F(3,32) = 5.26, p = 0.05$, mientras que estuvo lejos de ser significativa en el grupo Emparejado.

Exploración Horizontal: no encontramos interacción significativa entre Grupo y EC en la sesión de extinción ni entre el EC8 respecto de los ensayos de evaluación (EC9 y EC10). Sin embargo, encontramos diferencias entre grupos en los EC1 [$F(3,32) = 7.76, p < 0.05$] y EC10 [$F(3,32) = 6.72, p < 0.05$]. En ambos casos, el grupo Emparejado mostró niveles significativamente menores de Exploración Horizontal que los demás grupos, mientras que no encontramos diferencias significativas entre estos últimos.

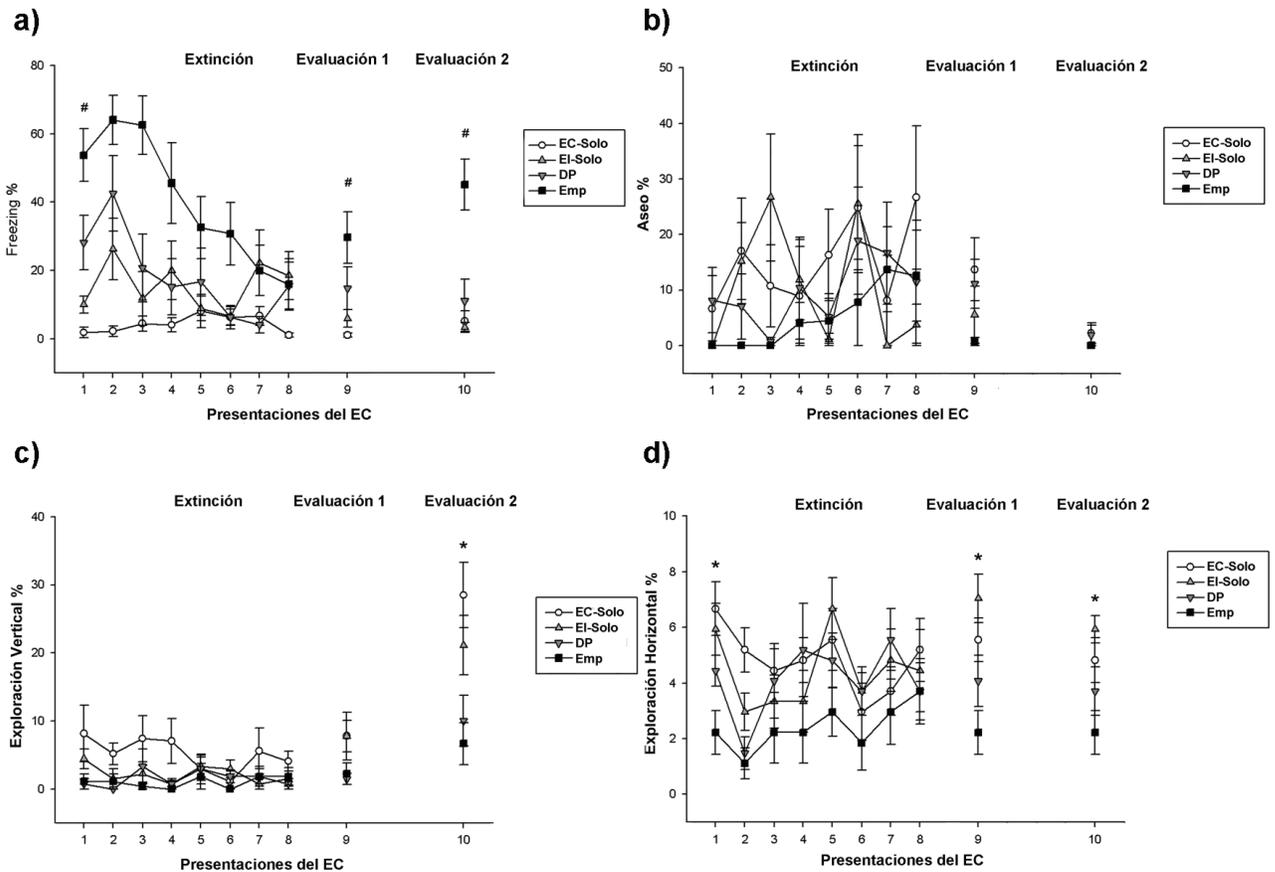


Figura 12: La figura 12 muestra los valores de a) *freezing*, b) Aseo, c) Exploración Vertical y d) Exploración Horizontal, en función de tratamiento de condicionamiento, del Experimento 6a. * indica diferencia significativa, $p < 0.05$

En este experimento se muestra un efecto de recuperación espontánea aún más evidente que en el experimento anterior. Es interesante llamar la atención sobre dos resultados de estos dos últimos experimentos. Primero, que nuevamente, con los contextos enriquecidos con olores, el efecto de recuperación espontánea fue más claro. No obstante en este caso hay que tener cautela con esta conclusión, porque entre los dos experimentos hubo otros cambios adicionales en los procedimientos. El segundo aspecto que nos parece importante es que, en términos de porcentaje de la respuesta de congelamiento, la variable dependiente más utilizada en los estudios de memoria, se ve que en el experimento 6b, la magnitud de la RC fue mayor que en el 6a. Esto es importante porque habitualmente en los estudios con animales adultos, pero también en

los estudios con animales infantiles, la magnitud de la RC se suele tomar como indicador de la “fuerza” de la memoria, de la misma que en otros marcos experimentales se ha considerado la magnitud de la RC indicadora de la fuerza asociativa. Llama la atención este resultado en este caso porque en el Experimento 6b utilizamos una menor cantidad de ensayos de condicionamiento y de menor intensidad que en el Experimento 6a, por lo que, según lo que habitualmente es asumido, debería esperarse una menor RC. La razón por la que ocurrió lo contrario, creemos, es que los tonos (ECs) duraron menos tiempo en el Experimento 6b (30 seg) que en el Experimento 6a (2 min), y creemos por estudios previos, que la cría de rata puede verse perjudicada para mantener la RC durante largos periodos de tiempo, lo que resulta en que se pueda encontrar una correlación negativa entre la duración del EC y la magnitud de la RC. Esto es relevante porque Richardson y su grupo de colaboradores, a diferencia de los parámetros que utilizamos en la presente tesis, en todas sus series experimentales utiliza ECs de 2 minutos de duración, incluso cuando mantiene comparaciones ontogenéticas que involucran crías y organismos de mayor edad.

Sumario de la segunda serie experimental

Esta segunda serie de experimentos fue destinada a completar la descripción conductual del efecto de extinción durante la tercera semana de vida postnatal de la rata. Los experimentos fueron diseñados específicamente para averiguar si *a)* una memoria “de miedo” puede ser recuperada luego de ser extinguida durante la infancia de la rata; *b)* el contexto puede modular el comportamiento de las crías de rata luego de la extinción de una RC; y *c)* si las características sensoriales de los contextos es un factor crítico para el aprendizaje contextual y la modulación contextual del comportamiento en ratas predestetadas. Los resultados muestran que las crías de rata menores a DP21 son capaces de expresar una RC extinguida, y que el contexto modula el comportamiento de los animales luego de la extinción. Además, se vio claramente que la inclusión de olores en los contextos es importante para observar el aprendizaje contextual en crías de rata menores a DP21, y no así para las crías de mayor edad (según vimos en el efecto de restauración).

Estos resultados replican los antecedentes de la literatura (Kim and Richardson, 2007b, a, 2010a) mostrando que el efecto de renovación y restauración de una RC de miedo extinguida no se observa en ratas menores a DP21 cuando se emplean contextos estándar. También replican antecedentes que muestran la importancia de utilizar contextos sensorialmente resaltados para observar aprendizaje contextual en crías de rata (Brasser and Spear, 1998, 2004), y lo extiende a modulación contextual de otros aprendizajes. Finalmente, extienden la descripción conductual del efecto de extinción en crías de ratas predestetadas, mostrando restauración, renovación y recuperación espontánea, cuando se utilizan contextos que incluyen olores. En este sentido, estos resultados también son coherentes con estudios que analizaron el aprendizaje contextual y el efecto de extinción en bebés humanos (Cuevas et al., 2005, Rovee-Collier and Cuevas, 2009, Cuevas et al., 2016).

En conjunto, los resultados obtenidos, más los antecedentes de la literatura, muestran que el efecto de extinción se encuentra desde etapas tempranas del desarrollo y se trata de una instancia de aprendizaje, que compite con el aprendizaje anterior o lo complementa, pero que no lo elimina.

4.3 TERCERA SERIE EXPERIMENTAL: EFECTOS DE MK-801 SOBRE LA EXTINCIÓN Y SOBRE EL COMPORTAMIENTO DE LAS CRÍAS DE RATA EN UN PARADIGMA DE CONDICIONAMIENTO DE MIEDO

Al finalizar las dos primeras series experimentales pudimos ver que las crías de rata menores a 21 días de vida postnatal son capaces de expresar una respuesta condicionada luego de que la misma haya sido extinguida. Esto es importante porque toda la atención en el estudio de la extinción en la infancia, se concentra en la hipótesis de borrado propuesta por Richardson y sus colaboradores. Un aspecto fundamental en esta serie de resultados, es que en nuestro trabajo la RC extinguida puede recuperarse más fácilmente cuando el entrenamiento se lleva a cabo en contextos caracterizados con olores que en contextos estándar. Cuando trabajamos con contextos estándar, nuestros experimentos replican en líneas generales los resultados del grupo de Richardson, lo cual abre la posibilidad de pensarlos como complementarios. Es decir, Richardson concluyó que la extinción borra la memoria en crías de rata menores a 21 días de vida postnatal y nosotros agregamos que esa conclusión podría sostenerse únicamente bajo ciertas condiciones experimentales, mientras que bajo unas condiciones diferentes el efecto de extinción se observa de manera similar a como fue descrito en ratas adultas.

A continuación analizamos los efectos del antagonista glutamatérgico MK-801 durante la extinción de una memoria de miedo, en crías de rata predestetadas. Richardson observó un efecto de interferencia sobre la consolidación del aprendizaje de extinción en ratas de 23 días de edad pero no en crías de 17, lo que interpretó como indicador de que la extinción no implica aprendizaje en las crías predestetadas (Langton et al., 2007). Dado que nuestros resultados muestran que el efecto de extinción implica aprendizaje, es interesante analizar si el efecto del MK-801 sobre la memoria de extinción en condiciones que permiten observar la recuperación de la RC extinguida en crías de 17 días de vida postnatal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aparatos

En todos los experimentos de esta serie los contextos fueron los mismos que en los experimentos de la serie anterior. En todos los experimentos se realizó un cambio de contexto entre el condicionamiento y la extinción, pero no entre la extinción y la evaluación, lo que nos permitió utilizar dos o 6 ensayos de condicionamiento. Los contextos fueron enriquecidos con los mismos olores que en la serie experimental anterior.

Procedimientos del Experimento 7

Condicionamiento: El procedimiento del condicionamiento es similar al de los experimentos anteriores. Después de un minuto de línea base, los sujetos recibieron dos ensayos de condicionamiento [EC (tono 20s) – EI (descarga eléctrica 0.50 mA 1s)] con 80 segundos de intervalo entre ensayos. Los animales fueron inyectados con MK-801 (0.1, 0.05 ó 0.025 mg/kg) o salina, 30 minutos antes del condicionamiento, o MK-801 (0.1 mg/kg) inmediatamente después del condicionamiento.

Evaluación: Veinticuatro horas después del condicionamiento, los animales fueron colocados en la caja de condicionamiento, y tras dos minutos de línea base recibieron 8 presentaciones del EC (Tono 30 s) con 30 s de intervalo entre presentaciones (ver Tabla 5).

Procedimientos del Experimento 8 (ver Tabla 6)

Experimento 8a

Condicionamiento: El condicionamiento consistió en 1 minuto de línea de base (LB) seguidos de 2 ensayos de emparejamiento del EC (tono 20 segundos de duración) – EI (descarga eléctrica de 0.50 mA de 1 segundo de duración, finalizando junto con el EC) y 80 segundos de intervalo entre ensayos. Siguiendo los procedimientos de Richardson, en este primer experimento incluimos tres grupos: Extinguido-vehículo (Ext-Veh); Extinguido-MK-801 (Ext-MK-801) y No Extinguido vehículo (No-ext).

Extinción: La extinción consistió en 2 minutos de LB seguidos de 8 presentaciones del EC (tono de 30 segundos de duración) y 30 segundos de intervalo entre presentaciones. Treinta minutos antes de la extinción, los animales fueron inyectados (IP) con MK-801 (0,1 mg/kg) o salina. El grupo No-Ext estuvo todo el tiempo en la caja de extinción.

Evaluación: Se emplearon los mismos parámetros que la extinción, sin la administración de drogas.

Experimento 8b y 8c

Condicionamiento: Fue similar al del Experimento 8a. En el 8b se emplearon 6 ensayos de condicionamiento, mientras que en el Experimento 8c usamos 2 ensayos. A diferencia del Experimento 8a, en los siguientes experimentos se hizo un diseño factorial completo con 4 grupos derivados de los factores Droga [Vehículo, (Veh) y MK-801] y Extinción [Extinguido (Ext) y No Extinguido (No-ext)].

Extinción: La extinción fue similar al Experimento 8a, salvo que treinta minutos antes de la extinción, los animales fueron inyectados (IP) con MK-801 (0.1 mg/kg) o salina. Los grupos No-Ext pasaron todo el tiempo en la caja de condicionamiento. En el Experimento 8c se incluyen datos adicionales de un grupo que pasa la fase de extinción en otro contexto (Grupo No-ext-ACB). Este grupo pasó la fase de la extinción en una caja de transporte de animales, con viruta limpia en una sala contigua a la de experimentación.

Evaluación: Se emplearon los mismos parámetros que la extinción, sin la administración de drogas.

Experimento 8d y 8e

Condicionamiento: El condicionamiento fue idéntico al del experimento anterior.

Extinción: La extinción fue idéntica al Experimento anterior, salvo que en el Experimento 8d se usó una dosis menor de MK-801 (0.05 mg/kg) y en el Experimento 8e la dosis de MK-801 se administró inmediatamente después de la fase de extinción.

Evaluación: Se utilizaron los mismos parámetros que en los experimentos anteriores.

Procedimientos del Experimento 9 (ver Tabla 7)

Condicionamiento: El condicionamiento fue similar a los experimentos anteriores, y se realizó en el contexto “A” (enriquecido con olor).

Extinción: Treinta minutos antes de la extinción, los animales fueron inyectados (IP) con MK-801 (0.1 mg/kg) o salina. El resto de los parámetros fueron idénticos al de los experimentos anteriores, aunque en este caso la extinción se realizó en el contexto B.

Evaluación: En la prueba los animales fueron evaluados con los mismos parámetros que la extinción, en el contexto “A” o “B”, sin la administración de drogas.

Análisis de datos

En toda la tercera serie de experimentos, las sesiones de entrenamiento y evaluación fueron filmadas y los vídeos analizados posteriormente. Registramos el tiempo que los animales pasaban realizando alguna de las 4 categorías de comportamiento del Experimento 6. Durante el condicionamiento se analizó el comportamiento de los animales en fracciones de 20 segundos, haciendo foco en los momentos de presentación del EC y las fracciones anterior y posterior (dado que este recorte se decidió a posteriori, las grabaciones del entrenamiento no incluyeron los 20 segundos posteriores al segundo ensayo de condicionamiento). Los videos del test se analizaron con foco en los momentos de presentación del EC. De todas las variables analizadas en toda la serie de experimentos, presentamos los análisis estadísticos únicamente de la respuesta de *freezing* y las variables de actividad locomotora, horizontal y vertical, que en ocasiones fueron agrupadas en una única variable, dependiendo de la sensibilidad de los parámetros del experimento. No encontramos ningún dato relevante para la discusión a partir del análisis de la respuesta de higiene.

En el Experimento 7 se realizó un ANOVA con Droga como único factor entre grupo. Se analizó la respuesta de congelamiento (*freezing*) y la actividad locomotora total (vertical más horizontal), en la prueba. Analizamos los datos de actividad en el condicionamiento porque nos interesa conocer el efecto incondicionado del MK-801 y cómo éste se puede relacionar con los resultados del experimento. En el Experimento 8a

se analiza con un ANOVA con una única variable independiente (Grupo), mientras que el resto de experimentos del grupo 8 se incluyen dos variables, Droga (Vehículo Vs MK-801) y Extinción (Extinguido Vs No extinguido). Finalmente, el Experimento 9 se analiza con un ANOVA con dos variables independientes, Droga (Vehículo Vs MK-801) y Renovación (ABB Vs ABA).

RESULTADOS

Experimento 7: Efectos del MK-801 en el condicionamiento de una memoria de miedo

El objetivo de este primer experimento de la serie fue demostrar que el MK-801 tiene efecto en la cría de rata sobre el condicionamiento. Esto nos servirá por un lado para elegir las dosis con las que trabajar posteriormente durante la extinción, pero además para estar seguro de que trabajamos con dosis que generan efectos farmacológicos en las crías de rata (Tabla 5).

Tabla 5. Diseño experimental, Experimento 7.

Grupo	Condicionamiento DP17	Extinción (Evaluación) DP18	Olor	n
<i>Veh</i>	Tono-descarga (A)	Tono (B)	Si	10
0.025 MK	Tono-descarga (A)	Tono (B)	Si	10
0.05 MK	Tono-descarga (A)	Tono (B)	Si	9
0.1 MK	Tono-descarga (A)	Tono (B)	Si	10
0.1 MK post	Tono-descarga (A)	Tono (B)	Si	10

La Figura 13 muestra los valores totales de actividad (Exploración Horizontal más Exploración Vertical) durante el condicionamiento. En la figura se observa un efecto estimulante del MK-801 dependiente de la dosis. El ANOVA mostró un efecto principal de Grupo [$F(4, 45) = 18,57, p < 0.05$] y el análisis post hoc indicó que el grupo que recibió una dosis de 0.1 mg/kg de MK-801 antes del condicionamiento estuvo significativamente más activo que los demás grupos. La dosis de 0.05 mg/kg de MK-801 también generó un nivel de actividad en los animales que fue significativamente mayor que el tratamiento vehículo y 0.1 mg/kg de MK-801 post condicionamiento. Estos últimos grupos y el que recibió una dosis de 0.025 mg/kg de MK-801, no difirieron entre sí.

La Figura 14 muestra los valores totales de actividad durante la evaluación. Nuevamente, los animales que recibieron MK-801 antes del condicionamiento, muestran un aumento en los niveles de actividad dependiente de la dosis respecto de los demás grupos. El ANOVA mostró un efecto principal de Grupo [$F(4, 44) = 2.89, p < 0.05$] y el análisis post-hoc indicó que los animales que recibieron 0.05 o 0.1 mg/kg de MK-801 antes del condicionamiento difirieron significativamente de los animales que recibieron una dosis de 0.1mg/kg de MK-801 después del condicionamiento. El ANOVA realizado con las puntuaciones de *freezing* en la evaluación (Figura 15) arrojó un efecto principal de Grupo [$F(4, 44) = 3.93, p < 0.05$] y el análisis post-hoc indicó que los animales que recibieron 0.1 mg/kg de MK-801 antes del condicionamiento hicieron significativamente menos *freezing* que los demás grupos, mientras que las diferencias entre éstos no alcanzaron el nivel de significación estadístico.

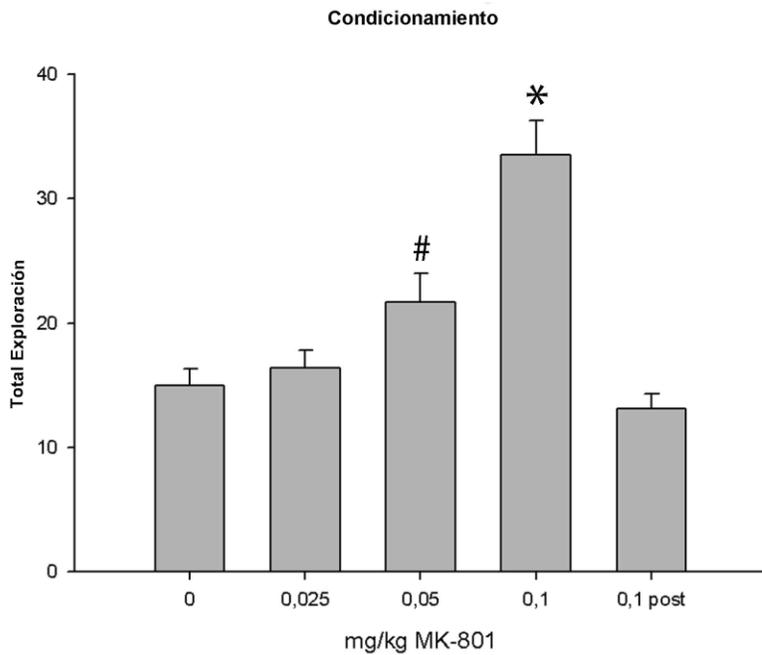


Figura 13: La Figura 13 muestra los niveles totales de exploración durante el condicionamiento, según la dosis de MK-801, del Experimento 7. * indica diferencia significativa, $p < 0.05$

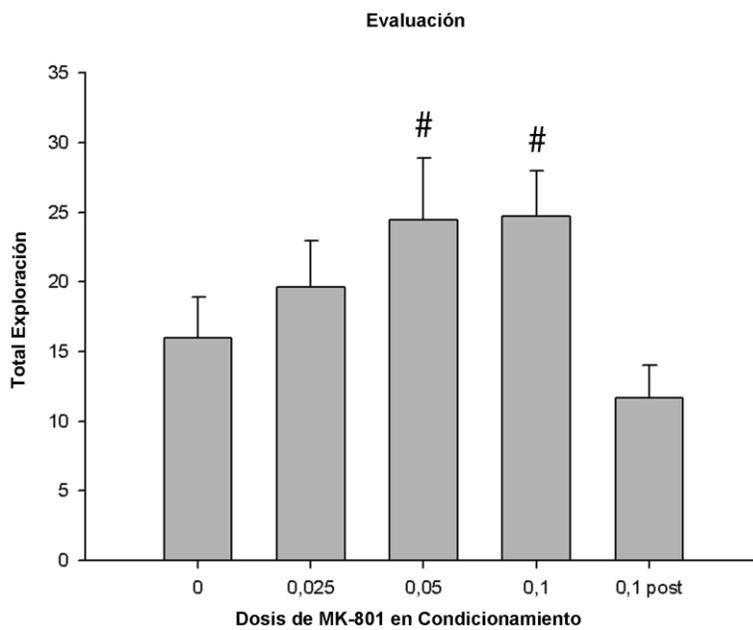


Figura 14: La Figura 14 muestra los niveles totales de exploración durante la evaluación, según la dosis de MK-801 en el condicionamiento, del Experimento 7. * indica diferencia significativa, $p < 0.05$

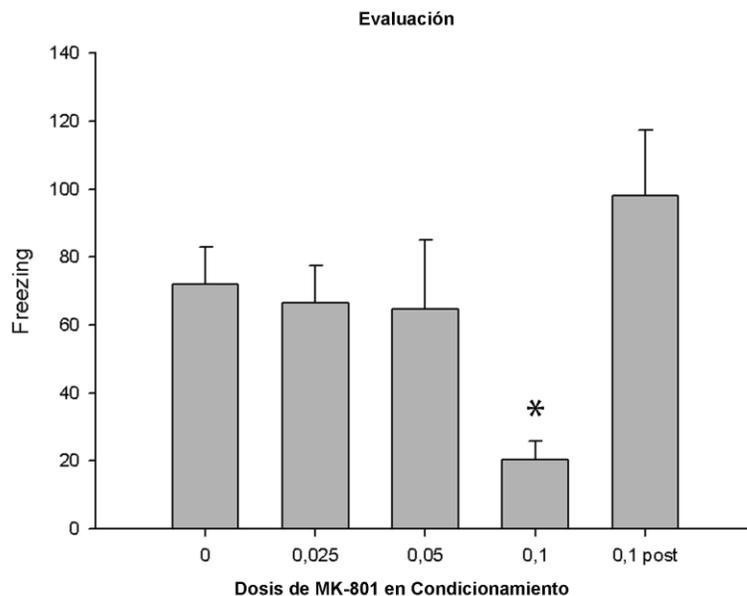


Figura 15: La Figura 15 muestra los niveles de *freezing* durante la evaluación, según la dosis de MK-801 en el condicionamiento, del Experimento 7. * indica diferencia significativa, $p < 0.05$

En conjunto, estos datos nos hacen pensar que la “interferencia” en el *freezing* observada en los animales tratados con 0.1 mg/kg de MK-801 antes del condicionamiento, puede deberse a un efecto locomotor de la droga estimulante, y no necesariamente un déficit de memoria. Dicho de otro modo, los animales entrenados con 0.1 mg/kg de MK-801 mostraron durante el condicionamiento un efecto estimulante, y en la evaluación reprodujeron ese mismo patrón, es decir, mayor actividad que los animales entrenados con salina o que recibieron la misma dosis de MK-801 inmediatamente después del condicionamiento. La hiperactividad es incompatible con la respuesta de *freezing*, lo que abre una hipótesis alternativa a la de interferencia de la consolidación para explicar el efecto del MK-801.

A continuación analizamos los efectos de distintas dosis de MK-801 en la extinción de una respuesta condicionada de miedo.

Experimento 8: Efectos del MK-801 en extinción de una respuesta condicionada de miedo

En el Experimento 8 aplicamos distintos tratamientos con el MK-801 para tratar de entender su efecto sobre la extinción. Recordemos que Richardson y colaboradores concluyeron que esta droga no tenía ningún efecto sobre la extinción porque el proceso de extinción en las crías de rata no es un nuevo aprendizaje sino un borrado de la memoria excitatoria. En la Tabla 6 se muestran los grupos y n de cada experimento con un resumen de los tratamientos principales.

Tabla 6. Diseño experimental, Experimentos 8a-8e. Efecto del MK-801 sobre la extinción

Exp	Grupo	Droga	Extinción	Condicionamiento DP 17	Contexto	Olor	n
8a	Ext-Veh	Salina	Si	2 ensayos/ 0.1 MK-801, 30 min antes	ABB	Si	12
	Ext-MK-801	MK-801	Si		ABB		12
	No-ext	Salina	No		ABB		10
8b	No-ext-Veh	Salina	No	6 ensayos/ 0.1 MK-801, 30 min antes	ABB	Si	10
	No-ext-MK-801	MK-801	No		ABB		10
	Ext-Veh	Salina	Si		ABB		10
	Ext-MK-801	MK-801	Si		ABB		10
8c	No-ext-Veh	Salina	No	2 ensayos/ 0.1 MK-801, 30 min antes	ABB	Si	12
	No-ext-MK-801	MK-801	No		ABB		12
	Ext-Veh	Salina	Si		ABB		12
	Ext-MK-801	MK-801	Si		ABB		12
	No-ext-MK-801-ACB	MK-801	No		ACB		8
8d	No-ext-Veh	Salina	No	2 ensayos/ 0.05 MK-801, 30 min antes	ABB	Si	4
	No-ext-MK-801	MK-801	No		ABB		6
	Ext-Veh	Salina	Si		ABB		6
	Ext-MK-801	MK-801	Si		ABB		6
8e	No-ext-Veh	Salina	No	2 ensayos/ 0.1 MK-801 post-condicionamiento	ABB	Si	10
	No-ext-MK-801	MK-801	No		ABB		11
	Ext-Veh	Salina	Si		ABB		12
	Ext-MK-801	MK-801	Si		ABB		12

Experimento 8a: MK-801 0.1 mg/kg 30 minutos antes de la extinción

En el primer experimento administramos el MK-801 en dosis de 0.1 mg/kg 30 minutos antes de la extinción. Sabemos que las crías de rata son sensibles a los efectos de esta dosis, que por otro lado, es la más comúnmente utilizada en la literatura para estudios amnésicos. En este experimento reproducimos el diseño no factorial de Richardson y su grupo, con tres condiciones: Ext-MK-801, animales que recibieron una inyección de MK-801 antes de la extinción; Ext-Veh, animales que recibieron una inyección de salina antes de la extinción; y, No-ext, animales que recibieron una inyección de salina antes de la fase de extinción pero que permanecieron en el contexto sin exposición al EC. Este diseño asume que la comparación relevante es entre los dos grupos que extinguen la RC, esperando que la droga bloquee la consolidación del aprendizaje de extinción. El grupo que no extingue sirve para comparar la posible amnesia inducida por el MK-801 con un grupo que expresa la RC.

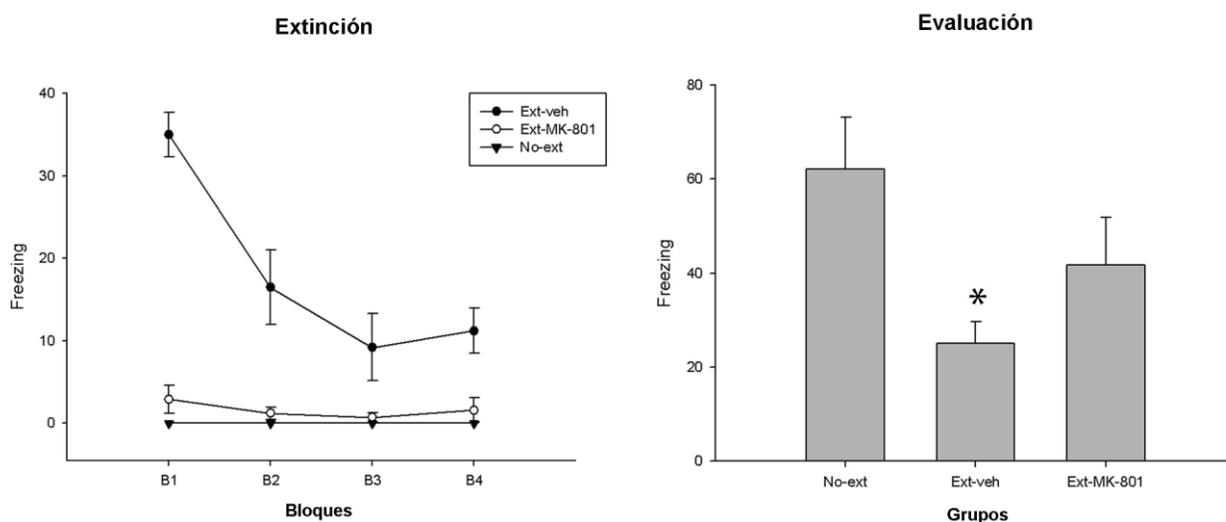


Figura 16: La Figura 16 muestra los niveles de *freezing* del Experimento 8a durante la extinción y evaluación. * indica diferencia significativa, $p < 0.05$

En este experimento intentamos reproducir los parámetros de los estudios previos en la literatura para facilitar la comparación de los resultados. La figura 16 muestra los datos de *freezing* en la fase de extinción (gráfico de la izquierda) y evaluación (gráfico de la derecha). En el gráfico de la izquierda puede verse que la respuesta de *freezing* es alta en

el inicio de la extinción y cae progresivamente en el grupo que recibió salina, mientras que en el grupo que recibió una dosis de 0.1 mg/kg de MK-801, 30 minutos antes, la respuesta de *freezing* es baja y está al nivel del grupo No-ext. Hicimos un ANOVA mixto con el factor Grupo (Ext-veh, Ext-MK-801 o No-ext) como única variable entre grupo y la variable bloque como variable intragrupo, con 4 niveles correspondientes a los cuatro bloques en los que analizamos la respuesta de *freezing*. El ANOVA mostró un efecto principal de Grupo y de bloque y una interacción Grupo x bloque [$F(6, 75) = 14.72, p < 0.05$]. Posteriores ANOVAs de una vía indicaron diferencias significativas entre los grupos en cada bloque: B1 [$F(2, 25) = 6.19, p < 0.05$], B2 [$F(2, 25) = 9.92, p < 0.05$], B3 [$F(2, 25) = 4.71, p=0,18$], B4 [$F(2, 25) = 10.65, p < 0.05$], señalando que el grupo Ext-veh hizo más *freezing* que los demás grupos (Ext-MK-801 y No-ext).

El gráfico de la derecha muestra los valores de *freezing* durante la evaluación. El grupo Ext-veh muestra valores bajos de *freezing* comparado con el grupo No-ext, que naturalmente muestra valores elevados de *freezing*. El grupo Ext-MK801 muestra valores medios de *freezing*. El ANOVA de una vía con factor Grupo, arrojó un efecto significativo [$F(2, 31) = 4.23, p < 0.05$] y el análisis post-hoc indicó una diferencia significativa en el nivel de *freezing* entre los grupos Ext-veh y No-ext, mientras que ninguno de éstos difirió del grupo Ext-MK-801.

Estos resultados replican parcialmente los antecedentes de la literatura, ya que el MK-801 no fue efectivo para bloquear el aprendizaje de extinción. Sin embargo, la respuesta de *freezing* de este grupo tampoco fue significativamente diferente de la respuesta del grupo No-ext. En este primer experimento de análisis del MK-801 sobre la extinción reprodujimos el diseño experimental de Richardson (Langton et al., 2007). En este diseño no factorial, con tres grupos, se excluyó el grupo que no extinguió y recibió el MK-801. Desde el punto de vista de Richardson, este grupo no parece ser informativo, porque el único efecto posible que se valora del MK-801 es su efecto sobre la consolidación de la memoria de extinción. Ante esta dificultad para inferir los efectos del MK-801 en el aprendizaje de extinción en este experimento, y teniendo en cuenta los

efectos sobre la actividad de las crías que encontramos en el Experimento 7, decidimos repetirlo agregando un grupo no-extinguido que reciba MK-801 y utilizando un protocolo de condicionamiento más fuerte con 6 ensayos en lugar de 2.

Experimento 8b: MK-801 0.1 mg/kg 30 minutos antes de la extinción, 6 ensayos de condicionamiento

La Figura 17 muestra, en la parte superior (Figura 17a), los niveles de *freezing* durante la extinción. Hay un efecto de extinción entre los animales tratados con salina (gráfico de la izquierda), que está ausente entre los animales tratados con MK-801 (gráfico del a derecha). El ANOVA reveló un efecto principal de Droga [$F(1,36) = 24.38, p < 0.05$], de Extinción [$F(1,36) = 14.56, p < 0.05$] y de Bloque [$F(3,108) = 13.84, p < 0.05$].

La Figura 17b, muestran los niveles de Exploración Vertical durante la evaluación. De la misma forma que en el experimento anterior, los valores de *freezing* (gráfico de la izquierda) muestran un efecto de Extinción [$F(1,36) = 6.18, p < 0.05$] y la interacción Extinción x Droga estuvo al borde de la significación estadística [$F(1,36) = 3.26, p = 0.07$]. El análisis post-hoc mostró diferencias significativas entre los grupos que recibieron salina, mientras que los grupos tratados con mk-801 mostraron valores intermedios de *freezing*, independientemente de la extinción. Además, los valores de Exploración Vertical muestran un efecto de Droga [$F(1,36) = 6.37, p < 0.05$], indicando (según el análisis post-hoc) que los animales tratados con MK-801 estuvieron más activos que los tratados con salina, independientemente de la extinción. Este resultado muestra que el efecto del MK-801 sobre la actividad en el día del test no sólo se encuentra en el grupo Ext-MK-801, sino también en el grupo que recibió MK-801 pero no pasó por el entrenamiento de extinción. Richardson no incluyó en sus diseños experimentales este grupo.

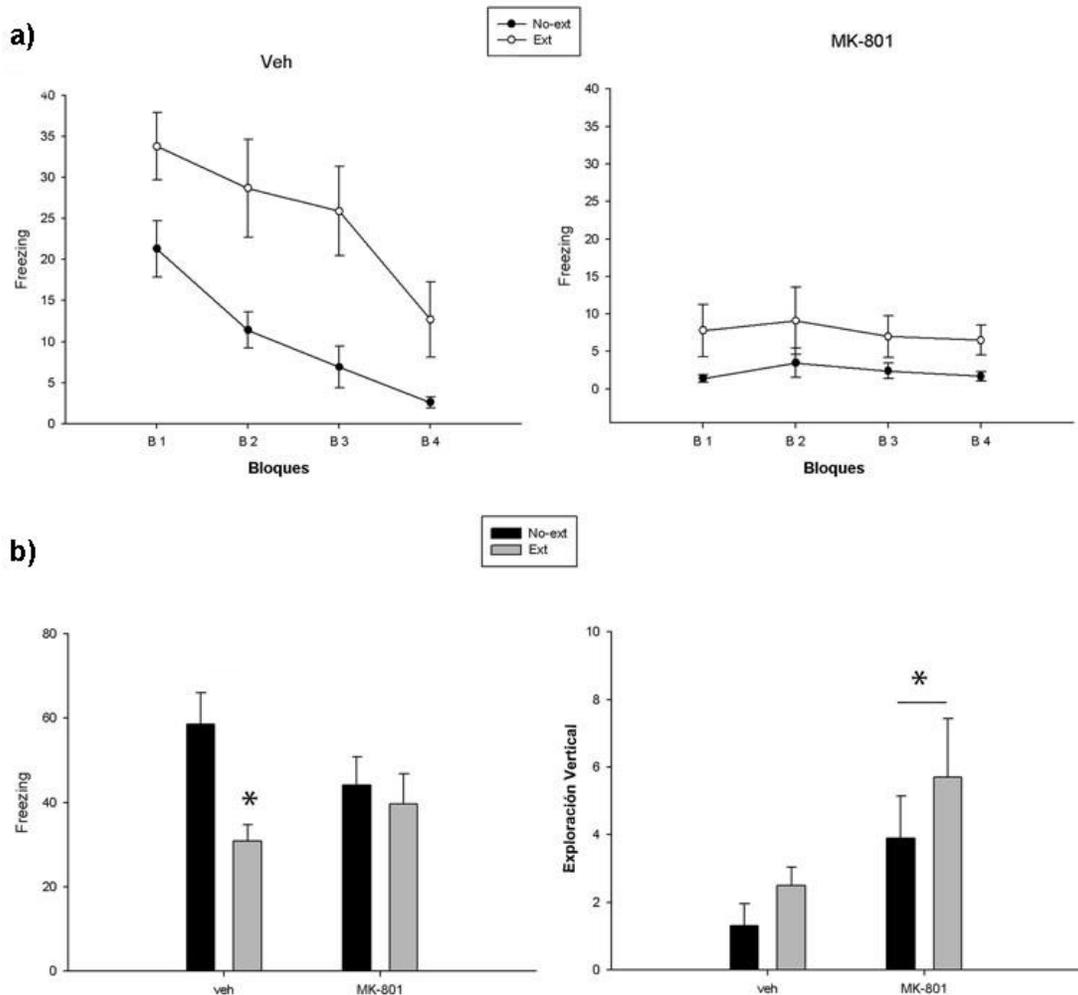


Figura 17: La Figura 17 muestra los resultados del Experimento 8b. En la parte superior están representados los valores de *freezing* durante la extinción, en función del tratamiento de extinción y MK-801 y en la parte inferior, los valores de *freezing* (panel de la izquierda) y Exploración Vertical (panel de la derecha) durante la evaluación. * indica diferencia significativa, $p < 0.05$

Con el fin de averiguar si este efecto de tratamiento es un efecto condicionado, a continuación replicamos el Experimento 8b agregando un grupo que recibió el mismo tratamiento que el grupo No-ext-MK-801, pero que pasó el tiempo de la extinción en un contexto diferente al de evaluación "C" (grupo No-ext-MK-801-ACB). Si la respuesta inducida por el MK-801 es condicionada, esperamos que no se exprese en este grupo y que, en cambio, exprese la RC de *freezing* aprendida en la fase de condicionamiento. Para este nuevo experimento retomamos los parámetros iniciales de condicionamiento con

sólo dos ensayos.

Experimento 8c: MK-801 0.1 mg/kg 30 minutos antes de la extinción, 2 ensayos de condicionamiento

La Figura 18a muestra los valores de *freezing* durante la extinción. De la misma manera que en los experimentos anteriores, el grupo Ext-veh muestra una respuesta elevada en el primer bloque, que disminuye progresivamente, mientras que el grupo Ext-MK-801 mostró niveles de *freezing* similares a los grupos no extinguidos. Los resultados de este experimento replican los datos del Experimento 8b. El ANOVA mostró una interacción Extinción x Droga [$F(1,44) = 10.07, p < 0.05$] y Extinción x Bloque [$F(3,132) = 4.71, p < 0.05$].

El análisis de la respuesta de *freezing* durante la evaluación (Figura 18b, gráfico izquierdo) muestra que la interacción Extinción x Droga está próxima a ser significativa [$F(1,44) = 3.25, p = 0.07$] y arroja un efecto principal de Extinción [$F(1,44) = 4.36, p < 0.05$]. El análisis post-hoc muestra que el grupo Ext-Veh pasó más tiempo haciendo la RC de *freezing* que los demás grupos. Cuando agregamos el grupo No-ext-MK-801-ACB en el análisis, encontramos un efecto principal de Grupo [$F(4,51) = 3.51, p < 0.05$], y el análisis post-hoc muestra que los niveles de *freezing* de este grupo son significativamente mayores a los demás. En la Figura 18b (gráfico derecho), se muestra la respuesta de este grupo en comparación con el grupo No-ext-MK-801-ABB. Este resultado es importante porque en estos grupos se demuestra que el contexto donde se experimenten los efectos del MK-801 es crítico para mostrar una interferencia con la respuesta de congelamiento, aunque en este caso que no hubo tratamiento de extinción (exposición al EC).

El gráfico izquierdo de la Figura 18c, muestra un efecto de tratamiento similar al observado en el experimento anterior, en el que los animales evaluados y extinguidos en el contexto B (ABB) y tratados con MK-801 se mostraron más activos (reflejado en la variable Exploración Horizontal) que los tratados con salina, independientemente de la extinción [$F(1,44) = 8.51, p < 0.05$]. Cuando agregamos el grupo No-ext-MK-801-ACB en el análisis, encontramos un efecto principal de Grupo [$F(4,51) = 3.28, p < 0.05$], y el análisis post-hoc muestra que los niveles de Exploración Horizontal de este grupo son

significativamente menores a los demás. El gráfico derecho muestra la comparación de este grupo con el grupo No-ex-MK-801-ABB, corroborando que la respuesta de interferencia en este caso sobre la respuesta de congelamiento parece deberse a una respuesta motora condicionada.

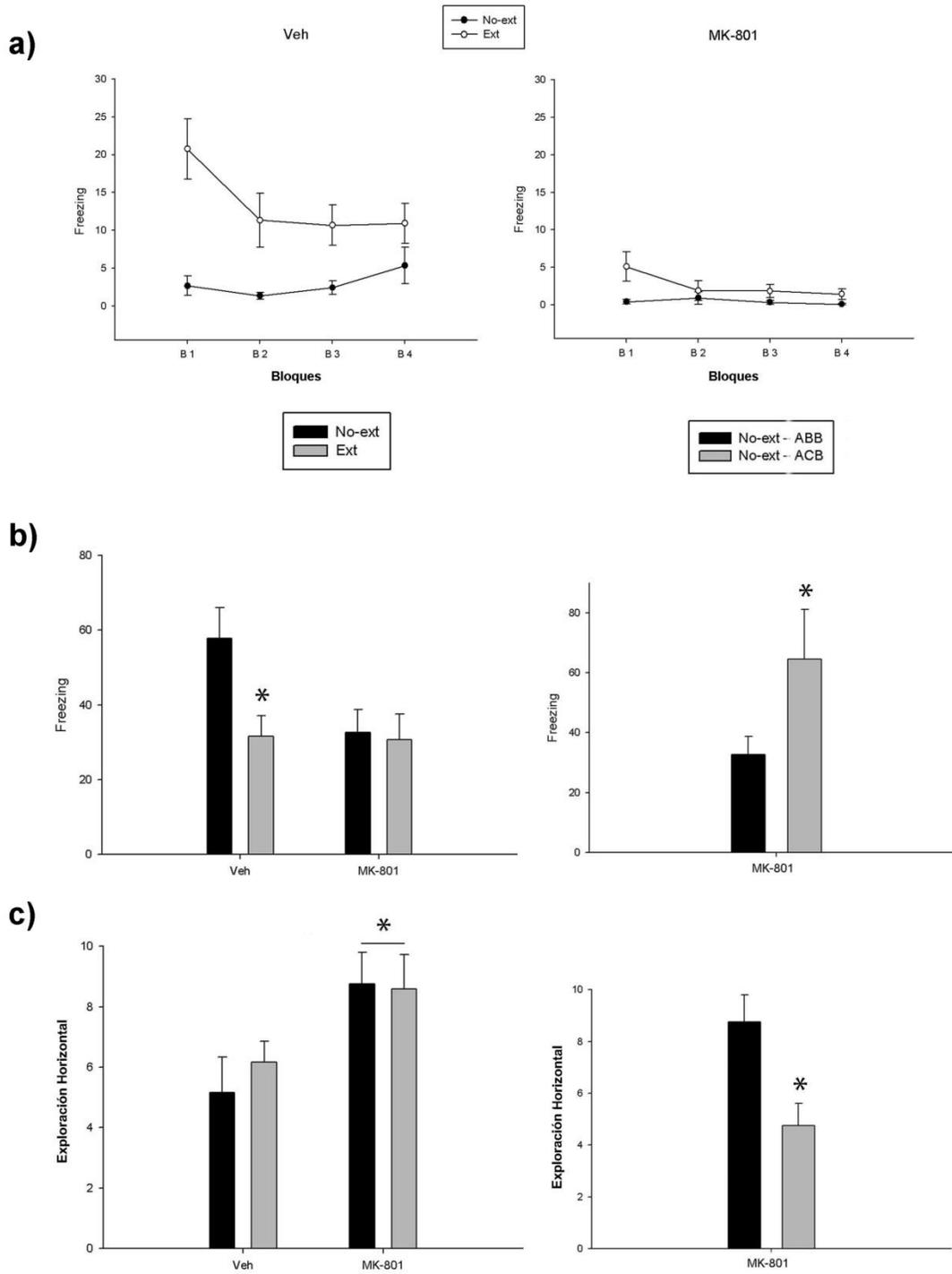


Figura 18: La Figura 18 muestra los resultados del Experimento 8c. En la Figura 18a están representados los valores de *freezing* durante la extinción, en función del tratamiento de extinción y MK-801. Las Figuras 16b y 16c muestran los valores de *freezing* y Exploración Horizontal durante la evaluación, función del tratamiento de extinción y MK-801. El panel de la derecha muestra los datos de la condición de contexto ABB y el panel de la derecha, de la condición ACB. * indica diferencia significativa, $p < 0.05$

En suma, los resultados obtenidos hasta este momento muestran un claro efecto estimulante del MK-801, que genera una RC que se expresa en un aumento de la locomoción que es incompatible con la respuesta de congelamiento. Además encontramos evidencias de que este efecto es dependiente de contexto. Para controlar los efectos estimulantes condicionados del MK-801, en el siguiente experimento replicamos el diseño empleado en los Experimentos 8b y 8c pero con una dosis menor de MK-801, de 0.05 mg/kg, que en el Experimento 7 mostró niveles de estimulación mucho menores a los provocados por la dosis de 0.1 mg/kg.

Experimento 8d: MK-801 en extinción 0.05 mg/kg 30 minutos antes de la extinción

En este experimento, los valores de *freezing* durante la extinción no muestran la curva típica de extinción que se observó en los experimentos anteriores (Figura 19a). Desconocemos el motivo. El ANOVA no encontró efectos significativos. No obstante, el efecto de la extinción se expresó claramente en la prueba. A diferencia de lo que se observó en los Experimentos 8a, 8b y 8c, el análisis de los datos de *freezing* y actividad durante el test muestran un efecto de extinción independiente del tratamiento con MK-801 [$F(1,18) = 20.51, p < 0.05$]. En la Figura 19b se puede ver que los animales que extinguieron, hayan recibido MK-801 o salina, hacen menos *freezing* (gráfico de la izquierda) y más actividad exploratoria [$F(1,18) = 7.61, p < 0.05$] (gráfico de la derecha) durante el test que los animales que no extinguieron.

Estos resultados refuerzan la idea de que el efecto de MK-801 observado en los experimentos 8b y 8c es un efecto condicionado. Una dosis de MK-801 que no afecta la actividad locomotora 24 horas después de, no tiene efectos sobre la extinción. En el siguiente experimento, replicamos los parámetros de los Experimentos 8b y 8c pero administramos la dosis de 0.1 mg/Kg de MK-801 inmediatamente después de la extinción para, intentar controlar el efecto de tratamiento.

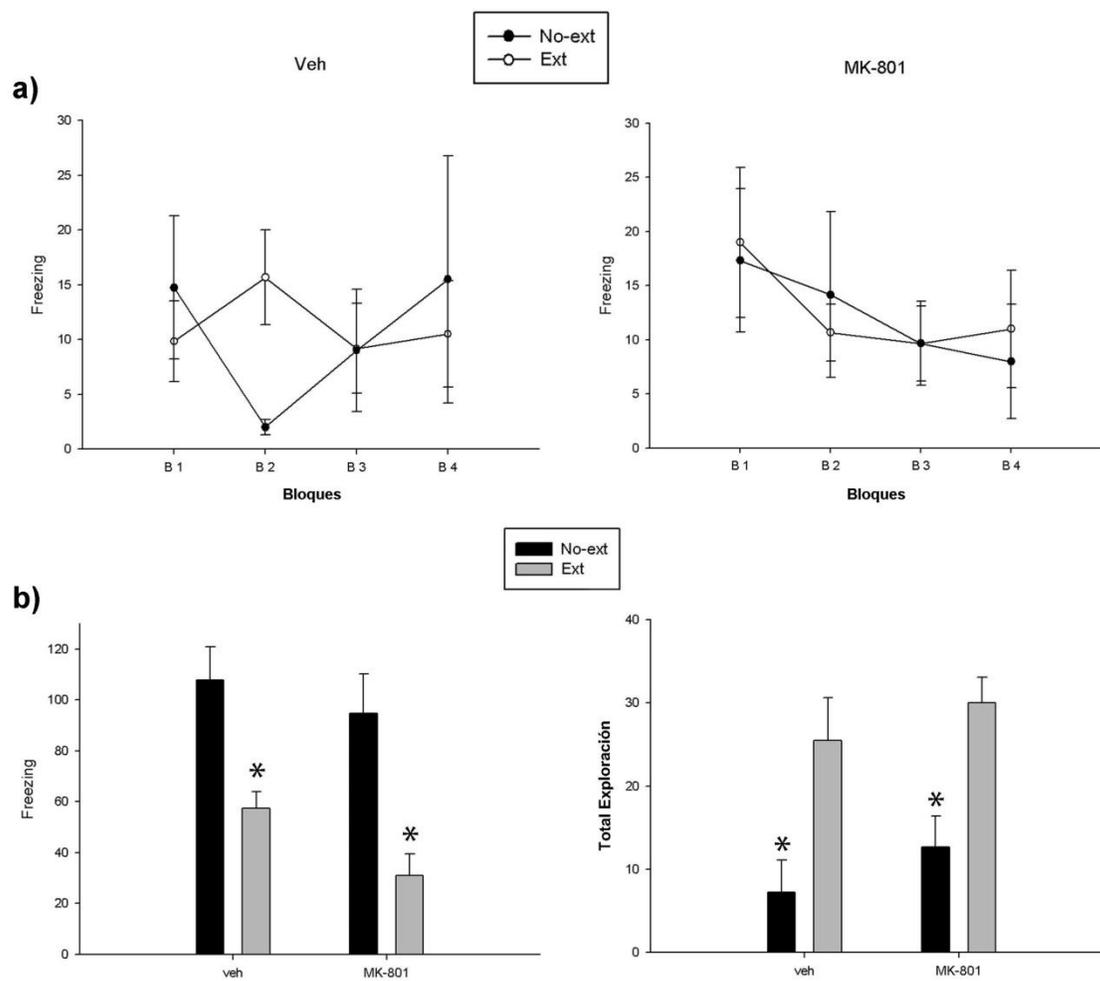


Figura 19: La Figura 19 muestra los datos del Experimento 8d. En la parte superior están representados los niveles de *freezing* durante la extinción, en función del tratamiento de extinción y MK-801. En la parte inferior están representados los niveles de *freezing* (panel izquierdo) y los niveles totales de exploración (panel derecho) durante la evaluación. * indica diferencia significativa, $p < 0.05$

Experimento 8e: MK-801 0.1 mg/kg inmediatamente después de la extinción

Los valores de *freezing* durante la extinción están presentados en la Figura 20a. Se observa que la curva típica de extinción con valores iniciales altos que disminuyen progresivamente. El ANOVA mostró una interacción Extinción x Bloque [$F(3,99) = 6.40, p < 0.05$] indicando un nivel final de *freezing* significativamente menor al inicial, en los grupos

extinguídos.

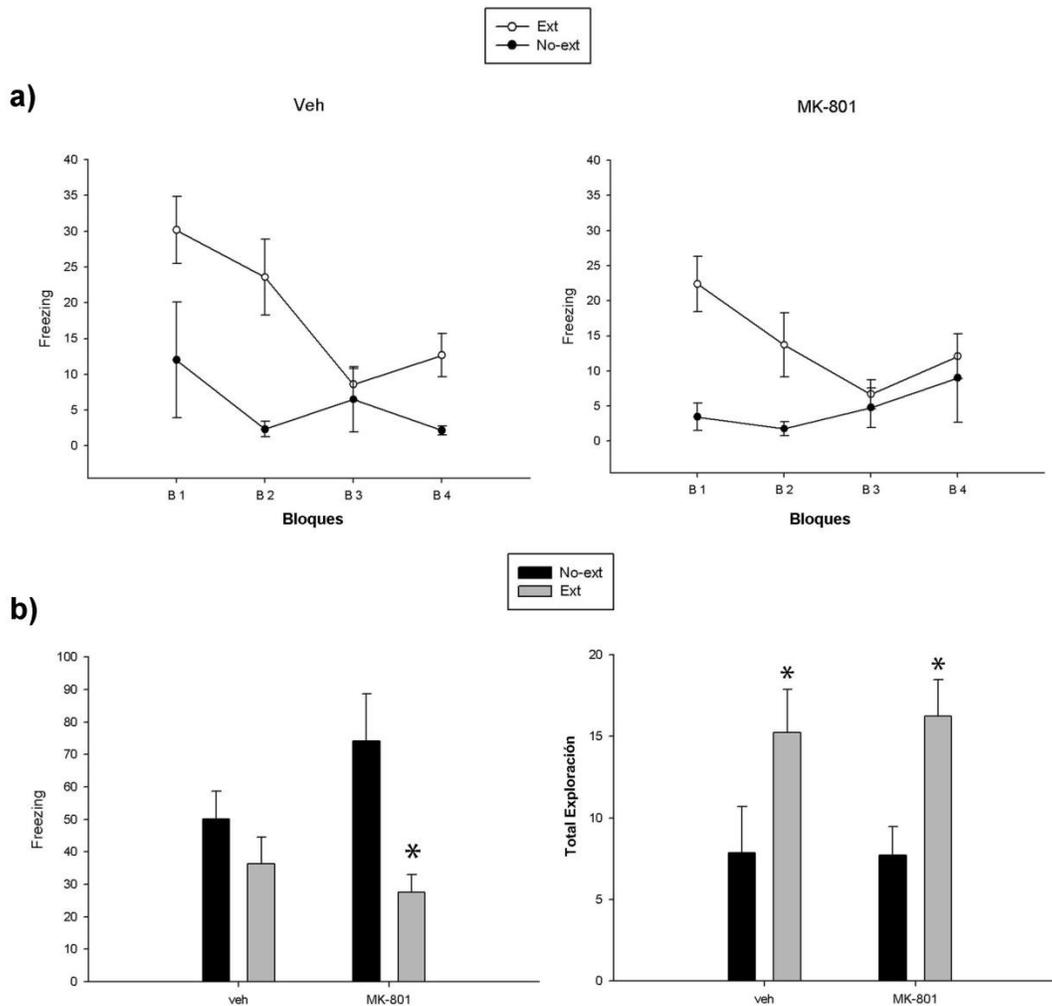


Figura 20: La Figura 20 muestra los datos del Experimento 8e. En la parte superior están representados los niveles de *freezing* durante la extinción, en función del tratamiento de extinción y MK-801. En la parte inferior están representados los niveles de *freezing* (panel izquierdo) y los niveles totales de exploración (panel derecho) durante la evaluación. * indica diferencia significativa, $p < 0.05$

En la evaluación (Figura 20b), en consonancia con el Experimentos 8d, el análisis de los datos de *freezing* y exploración total durante el test muestran un efecto principal de Extinción (*freezing*: $[F(1,41) = 9.28, p < 0.05]$; Exploración Horizontal: $[F(1,39) = 10.97, p < 0.05]$ independiente de la droga, que según los análisis post-hoc refleja que los grupos que extinguieron hicieron menos *freezing* y más actividad exploratoria (gráfico de la izquierda y derecha, respectivamente) que los grupos que no extinguieron.

Este experimento apoya la idea de que si el MK-801 no afecta el comportamiento de las crías durante la extinción, no se observan efectos sobre el comportamiento en la

evaluación. Por lo tanto creemos que el efecto de la inyección sistémica de MK-801 sobre la memoria de miedo, se puede interpretar como un efecto de interferencia de los efectos motores del MK-801 sobre la RC de *freezing*, que normalmente es tomada como índice de memoria.

Experimento 9: efectos del MK-801 en la Renovación de una RC extinguida

El efecto de estimulación del MK-801, se hizo evidente en cada experimento en el que administramos la dosis de 0.1 mg/Kg antes de la fase de extinción. Una dosis menor (0.05 mg/Kg) o la misma dosis administrada inmediatamente después de la extinción, no afectaron la actividad de los animales durante la extinción, y tampoco en la evaluación en comparación con los grupos tratados con salina. Además, en el Experimento 8e, vimos que la administración de MK-801 después del condicionamiento no interfirió con la RC de *freezing* durante la evaluación y en el Experimento 8c vimos que un cambio de contexto favorece la observación de la RC de *freezing*. Esto nos hizo pensar en la posibilidad de observar el efecto de interferencia del aprendizaje de extinción por MK-801, en un diseño de renovación ABA.

Hasta aquí hemos podido observar un efecto estimulante del MK-801 que genera un aprendizaje contextual y posiblemente afecte la RC de *freezing*, lo cual se deduce principalmente de los grupos no extinguidos tratados con MK-801 (Experimentos 8b y 8c), pero no podemos determinar si esta droga tiene algún efecto sobre el aprendizaje de extinción, dado que el tipo de experimento con el que trabajamos no permite observar la RC luego de su extinción. Para averiguar si el MK-801 tiene algún efecto sobre el aprendizaje de extinción en crías de rata predestetadas, hicimos un experimento de renovación ABA. A continuación se presenta la Tabla 7, con los grupos del Experimento 9, y los resultados obtenidos.

Tabla 7. Diseño experimental, Experimento 9.

Grupo	Condicionamiento DP17	Extinción DP18	Evaluación DP19	Olor	n
ABB-MK-801	Tono-descarga (A)/ 0.1 MK-801 30 min	Tono (B)	Tono (B)	Si	12
ABB-Veh	Tono-descarga (A) /Vehículo	Tono (B)	Tono (B)	Si	12
ABA-MK-801	Tono-descarga (A)/ 0.1 MK-801 30 min	Tono (B)	Tono (A)	Si	11
ABA-Veh	Tono-descarga (A) / Vehículo	Tono (B)	Tono (A)	Si	13

La Figura 21a muestra los valores de *freezing* durante la extinción. Como era esperado, los animales que recibieron MK-801 antes de la extinción no mostraron niveles elevados de *freezing* durante toda la fase de extinción, mientras que los animales inyectados con salina mostraron un nivel elevado de *freezing* al inicio de la prueba con una caída a medida progresiva. Es llamativo que todos los grupos mostraron una elevación en el nivel de *freezing* en el último bloque de la fase de extinción, pero no tenemos explicación para este aumento en la respuesta. El ANOVA mostró una interacción significativa entre Bloque x Extinción x Droga [$F(3,132) = 3.49, p < 0.05$]. Seleccionando la condición vehículo, hicimos un ANOVA de una vía y encontramos un efecto principal de Extinción [$F(3,75) = 16.87, p < 0.05$]. El análisis post-hoc indica que el primer bloque de extinción difiere significativamente del segundo y tercero. Curiosamente, el nivel de *freezing* se elevó en el bloque 4 hasta diferir de manera significativa del segundo y tercero.

La Figura 21b muestra los niveles de *freezing* durante la evaluación (gráfico izquierdo). De la misma manera que en los experimentos anteriores, los grupos ABB expresan niveles bajos de *freezing* independientemente de la Droga [$F(3,75) = 16.87, p < 0.05$]. Sin embargo, el grupo ABA-Veh mostró niveles elevados de *freezing*, confirmando el efecto de renovación provocado por el cambio de contexto entre las fases de extinción y

evaluación, mientras que el grupo ABA-MK-801 se mantiene al nivel de los grupos ABB. Por último, el gráfico derecho de la Figura 21bc muestra los niveles de actividad de los cuatro grupos durante el test, en este caso no se observó el efecto de tratamiento reportado en los Experimentos 8b y 8c, aunque existe una tendencia en ese sentido.

Antes de seguir, es importante resaltar que en este experimento encontramos mucha variabilidad intragrupo, especialmente en los animales tratados con MK-801, lo que dificulta la posibilidad de extraer conclusiones precisas. Sin embargo, podemos analizarlo como un resultado preliminar que nos dé información para seguir estudiando, aunque es necesario repetir este experimento para corroborarlo.

Recordemos que en el Experimento 8c vimos que los animales del grupo No-Ext-MK-801-ACB, mostraron niveles menores de Exploración Horizontal y niveles mayores de *freezing* en la evaluación, que los animales que recibieron la droga en el contexto de evaluación, lo cual nos llevó a pensar que el bajo nivel de *freezing* en los grupos que recibieron MK-801 podría estar relacionado con su alto nivel de actividad. En este experimento esperábamos que el cambio de contexto entre extinción y evaluación, limpiara el efecto motor del MK-801, lo cual se ve en el gráfico derecho de la Figura 21b. Sin embargo, a diferencia del Experimento 8c, el cambio de contexto no facilitó la observación de la RC de *freezing*. Dado que el cambio de contexto modificó la magnitud de *freezing* durante la evaluación en los animales tratados con salina, la respuesta del grupo ABA-MK-801 puede ser interpretada como una persistencia en el aprendizaje de extinción. Por esta razón pensamos, que el efecto del MK-801 sobre la extinción en esta serie de experimentos, puede estar potenciando de alguna manera la expresión del aprendizaje de extinción.

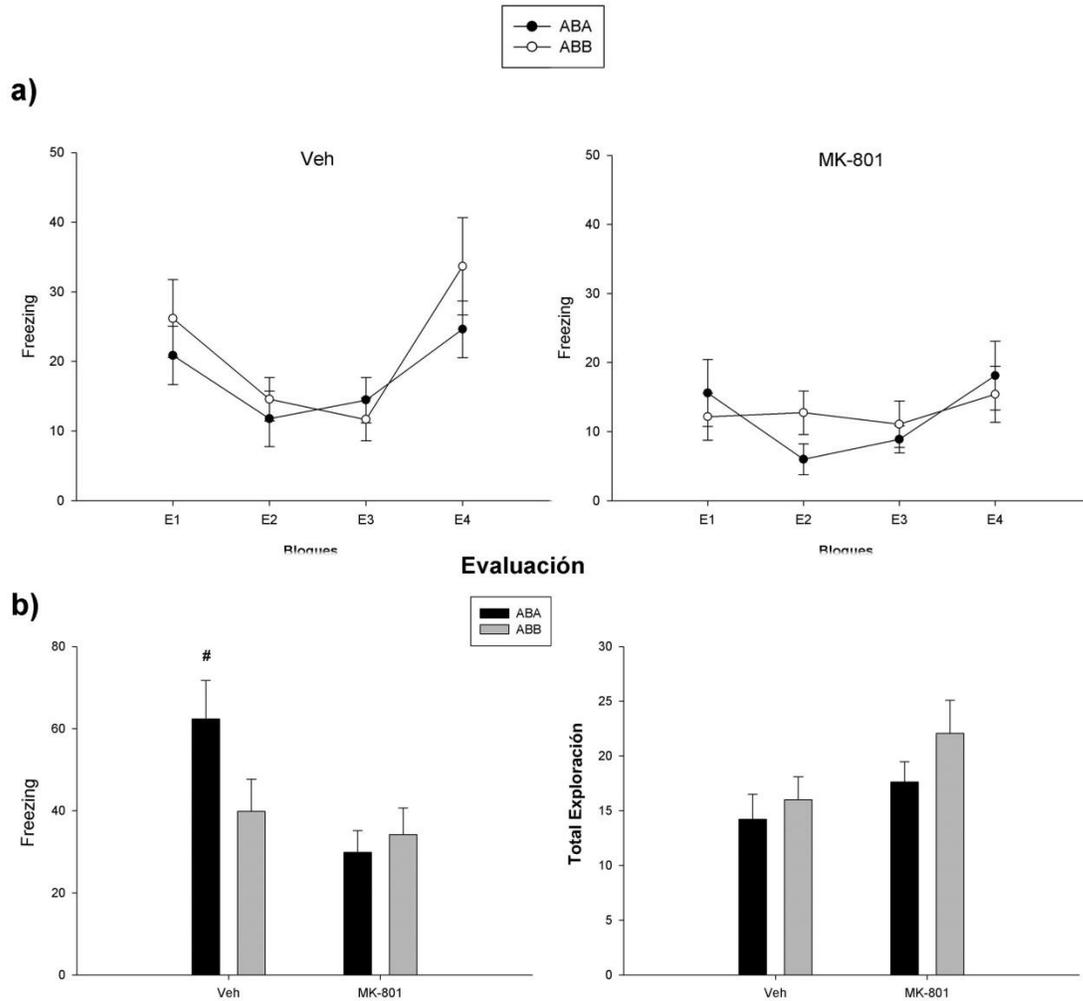


Figura 21: La Figura 21 muestra los datos del Experimento 9. En la parte superior están representados los niveles de *freezing* durante la extinción, en función del tratamiento de extinción y MK-801. En la parte inferior están representados los niveles de *freezing* (panel izquierdo) y los niveles totales de exploración (panel derecho) durante la evaluación. * indica diferencia significativa, $p < 0.05$

Sumario de la tercera serie experimental

Al final de esta serie de experimentos, pudimos ver que a) el MK-801, en la dosis comúnmente utilizada (0.1 mg/kg), tiene un efecto estimulante muy fuerte en las crías de rata, que b) entorpece el aprendizaje de miedo cuando es administrado antes del condicionamiento y que c) genera un aprendizaje que se expresa en un aumento de la locomoción. Cuando el MK-801 es administrado antes de la extinción también genera un

aumento de la locomoción condicionado, que d) no afecta el curso de la extinción (dado que estos animales pueden expresar este aprendizaje en el test 24 horas después), pero que e) disminuye el tiempo de *freezing* en animales que no recibieron el entrenamiento de extinción. Por último, f) estos efectos solamente se vieron cuando el MK-801 fue administrado 30 minutos antes del entrenamiento, pero no cuando fue administrado inmediatamente después.

CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN

El objetivo de esta tesis fue contrastar las aproximaciones del Modelo Neuromadurativo y Ecológico al estudio del desarrollo, a partir del efecto de extinción de memoria en procedimientos de Aversión Condicionada al Sabor (ACS) y Condicionamiento de Miedo, en crías de rata predestetadas. Al momento de comenzar este proyecto, los antecedentes de la literatura mostraban un patrón de extinción cualitativamente diferente en crías de rata durante la tercera semana de vida postnatal (DP17-19), respecto de lo que se conoce sobre animales adultos, en un procedimiento de condicionamiento de miedo. En este período del desarrollo, la extinción fue descrita como un efecto inflexible sobre el comportamiento, independiente de las claves contextuales (ausencia de los efectos de renovación y restauración). Este efecto se relacionó a la activación de la amígdala, de manera aislada del hipocampo y la Corteza Prefrontal, y a la ausencia de una función específica para los receptores GABAérgicos y Glutamatérgicos. De esta manera, la extinción fue presentada como un procedimiento que lleva a un efecto de borrado de la memoria, en crías de rata menores a 21 días de vida postnatal (Kim and Richardson, 2010b).

En la primera serie experimental, exploramos el alcance de esta conclusión acerca del procedimiento de extinción para crías de rata predestetadas. Si se trata de una característica de la extinción para esta etapa del desarrollo, entonces deberíamos haberla encontrado en cualquier esquema experimental. Sin embargo, en esta primera serie encontramos que las crías volvían a expresar la RC extinguida, tras un cambio de contexto (Experimento 2, renovación) y tras una reexposición al EI (Experimento 3 restauración) en un esquema de ACS. Además, encontramos un efecto de facilitación del condicionamiento de aversión al sabor, tras la extinción de esta RC (Experimentos 1a y 1b), que interpretamos como una señal de permanencia de los efectos del primer aprendizaje. Esta primera serie experimental nos dio una pista fundamental para seguir explorando las características de la extinción durante la infancia de la rata. A partir de estos resultados, consideramos que las conclusiones de Richardson y colaboradores deben ser entendidas

en el marco del condicionamiento de miedo en el desarrollo de la rata, pero no como una característica del aprendizaje de extinción en esta edad.

En la segunda serie de experimentos analizamos los efectos de renovación, restauración y recuperación espontánea, en un esquema de condicionamiento de miedo. Salvo en el Experimento 6 de recuperación espontánea, para el que no contábamos con antecedentes en la literatura, intentamos aproximarnos en la medida de lo posible a los parámetros que empleó Richardson, con la finalidad de maximizar las posibilidades de comparación de los resultados de ambos laboratorios. Esto nos parece importante debido a la relevancia de la discusión. No sólo se había concluido que la extinción en crías de rata predestetadas llevaba al borrado de la memoria y no a un aprendizaje inhibitorio, sino que además se había propuesto a la extinción como un tratamiento efectivo en la exploración de estrategias clínicas en el marco de trastornos de ansiedad (Kim and Richardson, 2010b). En este contexto, si pretendíamos matizar esas conclusiones, debíamos comenzar por replicar los resultados y mostrar una forma alternativa de interpretarlos.

Como comentamos en la introducción, los antecedentes de la literatura utilizaban parámetros típicos de estudios con animales adultos, descuidando las recomendaciones de Spear (Spear, 1984b) para el trabajo con crías de rata durante períodos tempranos del desarrollo. Dos aspectos fundamentales de estas recomendaciones tienen que ver por un lado, con la selección de estímulos en función del estado de desarrollo del sistema perceptual de las crías y, por otro lado, con la selección de variables dependientes en función del tipo de comportamientos e interacciones con el ambiente propios del período del desarrollo (Spear, 1984a, b). En este sentido es importante atender a que las características del comportamiento de las crías de rata predestetadas son diferentes a las de ratas unos días mayores, lo cual dificulta la comparación directa de respuestas como freezing. Considerando estas recomendaciones y los parámetros empleados por el grupo de Richardson, decidimos seguir a lo largo de toda esta serie de experimentos, un diseño que nos permitiera aislar el peso de los parámetros experimentales, por un lado, y las características ontogenéticas por el otro, en el estudio de las capacidades de los animales para recuperar la RC extinguida en distintos procedimientos de recuperación. Este diseño

implica el uso de parámetros estándar (aproximándonos a los utilizados por el grupo de Richardson) y una réplica de los mismo añadiendo olores a los contextos. Además, en algunos experimentos, intentamos abarcar todo el patrón comportamental de los animales en las categorías de *freezing*, aseo, exploración horizontal y exploración vertical.

A lo largo de esta serie experimental (y en un experimento publicado en Revillo et al 2015), encontramos sistemáticamente el efecto de recuperación de la RC extinguida (renovación, Experimentos 4a y 4b y restauración, Experimentos 5a-5f) únicamente cuando los contextos de las fases de condicionamiento, extinción y evaluación incluían claves olfativas, pero no cuando los olores estaban ausentes. El Experimento 5g, además mostró que la presencia de olores no es necesaria para observar el efecto de restauración en animales de 24 días de edad, lo que sugiere que se trata de una característica de la edad de los animales y no de nuestro procedimiento experimental. La importancia de la composición de los contextos y de la inclusión de claves olfativas, para la observación de efectos de condicionamiento en procedimientos de condicionamiento clásico, fue descrita también en animales adultos en un paradigma de ACS (Thomas et al., 2003). Finalmente, los Experimentos 6a y 6b, mostraron un efecto de recuperación espontánea de la RC extinguida entre los DPs 17-21, aun cuando los contextos no incluían claves olfativas.

Estos resultados nos llevan a pensar que la conclusión de que la extinción genera un efecto inflexible sobre el comportamiento durante la infancia de la rata, no puede generalizarse más allá de los parámetros que caracterizan los experimentos del grupo de Richardson y los Experimentos 4b, 5d y 5f de esta tesis. Lo que relativiza las conclusiones acerca del uso potencial de este conocimiento en el marco del estudio de trastornos de ansiedad. Estos resultados, además, son relevantes en una discusión acerca de la influencia del diseño experimental en la característica de los resultados y los alcances de las conclusiones, lo cual nos llevaría a pensar en el papel del experimentador en el proceso de producción de conocimientos. Acerca de las características del efecto de extinción, como paradigma de aprendizaje asociativo en la infancia de la rata, estos resultados aportan evidencias a favor de la hipótesis de aprendizaje dependiente de contexto.

En la última serie experimental, quisimos explorar el efecto de la administración de

MK-801 sobre el condicionamiento y extinción de una RC de miedo. Nuevamente replicamos los antecedentes de la literatura, mostrando que la administración de 0.1 mg/kg de MK-801 antes de la fase de condicionamiento, pero no después, afecta la expresión de la RC de *freezing* en la evaluación 24 horas después (Experimento 7). Además, encontramos que el MK-801 provoca una estimulación locomotora a las crías de rata, que se observó de forma aguda y dependiente de la dosis en la fase de condicionamiento y que generó un aumento en la actividad locomotora en la fase de evaluación (24 horas después). Este dato, que normalmente no se reporta en la literatura, relativiza de alguna manera la interpretación de la ausencia de *freezing* en el test como un efecto sobre el mecanismo de consolidación de memoria y sugiere la posibilidad de que se trate, al menos complementariamente, de una interferencia en un sentido práctico con la posibilidad de expresar la respuesta de *freezing*. Es decir, si el tratamiento con MK-801 genera una estimulación locomotora que perdura hasta la evaluación y la RC de *freezing* consiste en ausencia de movimientos, es razonable que veamos afectada esta respuesta en comparación con animales que recibieron salina en lugar de MK-801 en el condicionamiento.

Respecto de la administración de MK-801 en la fase de extinción, los resultados que encontramos son más difíciles de explicar. Si partimos de la perspectiva de consolidación de memoria y nos concentramos en la RC de *freezing* de los grupos Ext-MK-801 y Ext-Veh, podemos decir que la administración de 0.1 mg/Kg de MK-801, antes o después de la fase de extinción, no afectó la expresión de la extinción durante la evaluación 24 horas después (Experimentos 8a, 8b, 8c y 8e). Este es el mismo resultado que reportaron Richardson y colaboradores (Langton et al., 2007). Desde esta perspectiva, podemos sumarnos a la conclusión de que los receptores Glutamatérgicos no tienen una función específica en el aprendizaje de extinción en los DPs 17-19 de la rata. Sin embargo, dado que en esta tesis -y en otros trabajos de nuestro grupo- encontramos reiteradamente que las crías de rata pueden recuperar una RC extinguida, esta conclusión no nos lleva a proponer que la extinción borra la memoria sino a pensar, como proponen David Riccio y otros autores que el mecanismo de consolidación no agota las posibilidades

de aprendizaje (Gisquet-Verrier et al., 2015).

Si abandonamos la perspectiva de consolidación y adoptamos las recomendaciones de Spear para el estudio del aprendizaje en la infancia, vemos la necesidad de añadir otros controles y explorar el efecto del MK-801 en otras variables dependientes. A partir de estas consideraciones, encontramos que el tratamiento con una dosis de 0.1 mg/Kg de MK-801 antes de la extinción, pero no después, generó un efecto de estimulación que se observa en un aumento de la actividad (Exploración Horizontal, Exploración Vertical o la suma de ambas) (Experimentos 8a, 8b, 8c y 8e) y que desaparece si administramos el MK-801 en un contexto distinto del de evaluación, es decir, que es dependiente de contexto (Experimento 8c). Resulta muy interesante que el cambio de contexto, además, favorece la observación de la RC de *freezing*. Esto nos hace pensar que, en alguna medida, es posible explicar los resultados de estos experimentos por el aumento en la actividad de los animales. Es decir, ya sea por una interferencia en la maquinaria de consolidación de memoria o por un efecto de cambio de contexto, la administración de MK-801 antes de la extinción debería hacer que los animales expresen la RC en la evaluación. Sin embargo, como comentamos anteriormente, dado que el MK-801 genera un aumento en la actividad locomotora que interfiere en términos prácticos con la respuesta de *freezing*, es posible que sea este efecto del MK-801 el que nos impide ver el efecto típico de interferencia sobre el aprendizaje de extinción. No es posible caminar y no moverse al mismo tiempo.

En el Experimento 9, analizamos la posibilidad de observar el efecto de interferencia del aprendizaje de extinción por MK-801 en un diseño de renovación ABA. La hipótesis era que el cambio de contexto entre extinción y evaluación, favorecería la expresión del *freezing* en los animales tratados con MK-801. Contrariamente a lo que esperábamos, encontramos que, aún cuando el cambio de contexto atenuó la actividad durante la evaluación de los animales tratados con MK-801, no favoreció la observación de la RC de *freezing* que se mantuvo al nivel del grupo ABB. Si este resultado se confirma en futuros experimentos, podríamos pensar en un efecto de potenciación del aprendizaje de extinción por la administración de 0.1 mg/Kg de MK-801 antes del entrenamiento.

En resumen, estos experimentos muestran un efecto del MK-801 sobre la expresión de la RC de *freezing* que no puede adjudicarse claramente a una intervención en el mecanismo de consolidación de memoria. Tampoco apoyan con claridad la hipótesis de interferencia por “dependencia de estado” (Gisquet-Verrier et al., 2015), aunque no hicimos una exploración exhaustiva en ese sentido, por lo que no podemos descartarla. Como mínimo quisiéramos dejar una descripción de los efectos que observamos del MK-801 sobre el comportamiento de las crías de rata de 17-19 días de vida postnatal: a) un efecto estimulante agudo dependiente de la dosis, que se hace evidente en dosis consideradas bajas (0.05 y 0.1 mg/kg); b) afecta la expresión de la RC de *freezing* en un procedimiento de condicionamiento de miedo, lo que se interpreta normalmente como interferencia en la memoria, aunque también c) genera un aumento de la locomoción que se observa en la evaluación; d) no afecta el curso de la extinción, dado que estos animales pueden expresar este aprendizaje en el test 24 horas después, aunque e) aumenta la actividad de los animales durante la evaluación y, f) disminuye, de manera dependiente de contexto, el tiempo de *freezing* en animales que no recibieron el entrenamiento de extinción; por último, g) estos efectos solamente se vieron cuando el MK-801 fue administrado 30 minutos antes del entrenamiento, pero no cuando fue administrado inmediatamente después.

A partir de este momento, quisiéramos continuar la discusión enfocándonos en 1) los aportes de cada modelo teórico para el estudio del desarrollo; 2) el peso de las decisiones a la hora de diseñar el experimento, así como del uso de la estadística, sobre los resultados y las conclusiones que se pueden extraer de éstos; 3) la responsabilidad que esto adjudica al investigador y las formas posibles de identificar y controlar o dirigir los sesgos en la investigación y generación de conocimiento científico.

Para pensar los aportes de los modelos Neuromadurativo y Ecológico al estudio de las capacidades cognitivas durante el desarrollo, quisiéramos llamar la atención sobre el tipo de “infante” que describe cada uno. La hipótesis general del Modelo Neuromadurativo, es que las capacidades cognitivas durante la infancia, así como durante la vejez, se encuentran en un estado incompleto respecto del estado adulto. A partir de

aquí, el propósito del estudio de la infancia está relacionado a la descripción del estado de maduración (o de inmadurez) de capacidades cognitivas en distintos tiempos del desarrollo, que llegarán a completarse en la vida adulta. Esta hipótesis general, se refleja en las hipótesis de trabajo de los investigadores. En el caso del estudio de la extinción, la hipótesis del grupo de Richardson es que “las ratas menores a 21 días de vida postnatal no serán capaces de recuperar la RC extinguida” (Kim and Richardson, 2010b). También se refleja en la interpretación de los resultados y en las conclusiones. Una característica del Modelos Neuromadurativo es que la interpretación de los resultados requiere siempre de una referencia externa, normalmente el estado adulto. Si bien Richardson propone la existencia de diferencias cualitativas en la infancia, lo cual sugiere que no existiría una referencia en el adulto, ésta se explica por la ausencia de un mecanismo conocido en el funcionamiento adulto. Es decir, Richardson no describe una capacidad diferente y característica del comportamiento de las ratas infantes, sino una carencia particular que las hace cualitativamente diferentes en un aspecto del aprendizaje.

Además, podemos encontrar esta noción de infante en la metodología, en la selección de variables para el diseño del experimento, en la operacionalización de la variable dependiente y en la elección de los grupos control. De esta manera se define el marco de discusión, el tipo de explicaciones que se van a considerar y las explicaciones alternativas que se pretende descartar. En los experimentos de extinción de Richardson, encontramos por un lado, que la formulación de la hipótesis guarda relación con lo que son capaces de hacer los animales mayores al DP21, mientras que sobre los infantes predice que no podrán hacerlo. Por otro lado, el diseño experimental “prepara el terreno” para este resultado. En primer lugar, los estímulos elegidos, de la misma forma que la variable dependiente, son de uso corriente en experimentación con animales mayores al DP21, pero no son los recomendados para la exploración de las capacidades cognitivas de las ratas infantes por los expertos en el campo. En segundo lugar, los grupos control están pensados para descartar falsos negativos, pero no ofrecen información ante la posibilidad de un falso positivo. En esta tesis mostramos que esto podía conseguirse con un procedimiento muy simple. Es decir, los controles elegidos apuntan a descartar

explicaciones alternativas a la diferencia entre edades en la resolución de la tarea. De esta manera, la explicación que se sostiene y se refuerza, es que las diferencias observadas se deben a la inmadurez de las crías predestetadas.

La hipótesis general del Modelo Ecológico, en cambio, es que las ratas infantas cuentan con las herramientas que necesitan para resolver los desafíos que les presenta el ambiente, a partir de una interacción eficiente con el mismo. Además, se considera que el ambiente cambia y exige nuevas competencias al infante, en la medida que éste crece y desarrolla nuevas capacidades motoras, perceptuales y cognitivas. De esta manera, el infante que se describe es un organismo maduro, capaz de interactuar de manera eficiente con el ambiente. Para estudiar el desarrollo de las capacidades cognitivas desde esta perspectiva, es necesario conocer y atender a las capacidades perceptuales y motoras en cada edad. Las comparaciones directas con animales de una edad diferente, interesan en un sentido descriptivo, pero no sirven como guía para la exploración de las capacidades cognitivas en el desarrollo (Rovee-Collier and Cuevas, 2009, Rovee-Collier and Giles, 2010).

Las hipótesis de trabajo que se formulan en este marco, hacen referencia al tipo de habilidades o capacidades que pueden encontrarse en distintas etapas del desarrollo o, como en esta tesis, a las características de los contextos en los que las crías de rata expresan aprendizajes complejos. Partiendo de estas hipótesis, el diseño experimental tiende a confirmar la capacidad de las crías para resolver una tarea, por lo que se seleccionan estímulos y variables que contemplan las capacidades perceptuales y comportamentales de las crías. Los grupos control, se eligen para descartar explicaciones alternativas relacionadas a los parámetros del experimento, para descartar la posibilidad de apoyar las conclusiones sobre falsos positivos. De esta manera, las conclusiones aportan al conocimiento acerca de las capacidades de los infantas en distintas edades del desarrollo, señalando la relevancia de la posibilidad de interactuar de manera eficiente con el ambiente y de la experiencia en la posibilidad de resolver una tarea.

De esta manera, no sólo vemos las diferencias en cuanto al tipo de infante que describen ambos modelos para el estudio de las capacidades cognitivas en el desarrollo, sino que fundamentalmente vemos las vías por las que los investigadores hacemos esas

descripciones, desde el diseño de los experimentos. Es importante abrir y sostener esta discusión, sobre todo en estos tiempos en los que la ciencia y especialmente la Neurociencia, es utilizada por actores de distintos ámbitos para justificar proyectos y persuadir a los interlocutores, con intereses particulares. Un aspecto de la ciencia que la vuelve un discurso convincente, tiene que ver con su fama y su pretensión de “conocimiento objetivo” o neutral, habitualmente relacionada a la aplicación del “método científico”. Sin embargo, desde hace décadas, sabemos que eso no es real. El método científico no garantiza por sí solo la objetividad del conocimiento (Fox Keller, 1994). A partir de los resultados de esta tesis, queremos discutir la posibilidad de que se transmitan sesgos culturales a través de conocimientos producidos mediante la aplicación correcta del método científico. Esto no significa que la producción de conocimiento objetivo sea una empresa imposible, sino que este tipo de conocimiento no se consigue por defecto. Es necesario que los investigadores conozcamos las fuentes posibles de sesgos en nuestros experimentos (como cualquier aproximación al objeto de estudio), para poder identificarlas y controlarlas o ponerlas en evidencia, para que sean los lectores los que decidan sobre la validez de nuestras conclusiones. La objetividad del conocimiento no se logra por la sola aplicación del método científico, también exige de parte de los investigadores claridad conceptual, honestidad intelectual y reconocimiento de los límites de la propia práctica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adler SA, Gerhardstein P, Rovee-Collier C (1998) Levels-of-processing effects in infant memory? *Child Dev* 69:280-294.
- Arnold HM, Robinson SR, Spear NE, Smotherman WP (1993) Conditioned opioid activity in the rat fetus. *Behav Neurosci* 107:963-969.
- Barr R, Marrott H, Rovee-Collier C (2003) The role of sensory preconditioning in memory retrieval by preverbal infants. *Learn Behav* 31:111-123.
- Beane ML, Cole MA, Spencer RL, Rudy JW (2002) Neonatal handling enhances contextual fear conditioning and alters corticosterone stress responses in young rats. *Horm Behav* 41:33-40.
- Bolles RC (1968) Autonomic indices of fear: the collapse of an idea. *Psychol Rep* 23:1249-1250.
- Bolles RC (1970) Species-specific defense reactions and avoidance learning. *Psychol Rev* 77:32-48.
- Bolles RC, Collier AC (1976) The effects of predictive cues on freezing in rats. *Anim Learn Behav* 4:6-8.
- Bolles RC, Fanselow MS (1982) Endorphins and behavior. *Annu Rev Psychol* 33:87-101.
- Bolles RC, Riley AL (1973) Freezing as an avoidance response: another look at the operant-responder distinction. *Learn Motiv* 4:268-275.
- Bouton ME (1988) Context and ambiguity in the extinction of emotional learning: implications for exposure therapy. *Behav Res Ther* 26:137-149.
- Bouton ME (1993) Context, time, and memory retrieval in the interference paradigms of Pavlovian learning. *Psychol Bull* 114:80-99.
- Bouton ME (2002) Context, ambiguity, and unlearning: sources of relapse after behavioral extinction. *Biol Psychiatry* 52:976-986.
- Bouton ME (2004) Context and behavioral processes in extinction. *Learn Mem* 11:485-494.
- Bouton ME, King DA (1983) Contextual control of the extinction of conditioned fear: tests for the associative value of the context. *J Exp Psychol Anim Behav Process* 9:248-265.
- Brasser SM, Spear NE (1998) A sensory-enhanced context facilitates learning and multiple measures of unconditioned stimulus processing in the preweanling rat. *Behav Neurosci* 112:126-140.
- Brasser SM, Spear NE (2004) Contextual conditioning in infants, but not older animals, is facilitated by CS conditioning. *Neurobiol Learn Mem* 81:46-59.
- Byford A (2016) V. M. Bekhterev in Russian Child Science, 1900s-1920s: "Objective Psychology"/"Reflexology" as a Scientific Movement. *J Hist Behav Sci* 52:99-123.
- Byrne SP, Rapee RM, Richardson R, Malhi GS, Jones M, Hudson JL (2015) D-cycloserine enhances generalization of fear extinction in children. *Depress Anxiety* 32:408-414.
- Callaghan BL, Richardson R (2012) Early-life stress affects extinction during critical periods of development: an analysis of the effects of maternal separation on extinction in adolescent rats. *Stress* 15:671-679.
- Camp LL, Rudy JW (1985) Ontogenesis of learning: V. Variation in associative and nonassociative control of an operant forelimb response in infant rats. *Dev*

- Psychobiol 18:173-189.
- Campbell BA, Spear NE (1972) Ontogeny of memory. *Psychol Rev* 79:215-236.
- Carew MB, Rudy JW (1991) Multiple functions of context during conditioning: a developmental analysis. *Dev Psychobiol* 24:191-209.
- Cuevas K, Learmonth AE, Rovee-Collier C (2016) A dissociation between recognition and reactivation: The renewal effect at 3 months of age. *Dev Psychobiol* 58:159-175.
- Cuevas K, Lermans A, Rovee-Collier C (2005) Contextual control of retrieval at 3 months. In: Meeting of the eastern psychological association Boston, MA.
- Chang CH, Knapska E, Orsini CA, Rabinak CA, Zimmerman JM, Maren S (2009) Fear extinction in rodents. *Curr Protoc Neurosci Chapter 8:Unit8* 23.
- Delamater AR, Westbrook RF (2014) Psychological and neural mechanisms of experimental extinction: a selective review. *Neurobiol Learn Mem* 108:38-51.
- Dumigan NM, Lin TE, Good MA, Honey RC (2017) Conditioning with spatio-temporal patterns: Constraining the contribution of the hippocampus to configural learning. *Neurobiol Learn Mem* 142:244-251.
- Esmoris-Arranz FJ, Mendez C, Spear NE (2008) Contextual fear conditioning differs for infant, adolescent, and adult rats. *Behav Processes* 78:340-350.
- Fanselow MS (1994) Neural organization of the defensive behavior system responsible for fear. *Psychon Bull Rev* 1:429-438.
- Fanselow MS (2010) From contextual fear to a dynamic view of memory systems. *Trends Cogn Sci* 14:7-15.
- Fanselow MS, Cramer CP (1988) The ontogeny of opiate tolerance and withdrawal in infant rats. *Pharmacol Biochem Behav* 31:431-438.
- Fox Keller E (1994) La paradoja de la subjetividad científica. In: Nuevos paradigmas, cultura y subjetividad Buenos Aires, Barcelona: Paidós.
- Gisquet-Verrier P, Lynch JF, 3rd, Cutolo P, Toledano D, Ulmen A, Jasnow AM, Riccio DC (2015) Integration of New Information with Active Memory Accounts for Retrograde Amnesia: A Challenge to the Consolidation/Reconsolidation Hypothesis? *J Neurosci* 35:11623-11633.
- Hunt PS, Fanselow MS, Richardson R, Mauk MD, Freeman JH, Jr., Stanton ME (2007) Synapses, circuits, and the ontogeny of learning. *Dev Psychobiol* 49:649-663.
- Hyson RL, Rudy JW (1984) Ontogenesis of learning: II. Variation in the rat's reflexive and learned responses to acoustic stimulation. *Dev Psychobiol* 17:263-283.
- Kim JH, Richardson R (2007a) A developmental dissociation in reinstatement of an extinguished fear response in rats. *Neurobiol Learn Mem* 88:48-57.
- Kim JH, Richardson R (2007b) A developmental dissociation of context and GABA effects on extinguished fear in rats. *Behav Neurosci* 121:131-139.
- Kim JH, Richardson R (2008) The effect of temporary amygdala inactivation on extinction and reextinction of fear in the developing rat: unlearning as a potential mechanism for extinction early in development. *J Neurosci* 28:1282-1290.
- Kim JH, Richardson R (2009) The effect of the mu-opioid receptor antagonist naloxone on extinction of conditioned fear in the developing rat. *Learn Mem* 16:161-166.
- Kim JH, Richardson R (2010a) Extinction in preweanling rats does not involve NMDA receptors. *Neurobiol Learn Mem* 94:176-182.

- Kim JH, Richardson R (2010b) New findings on extinction of conditioned fear early in development: theoretical and clinical implications. *Biol Psychiatry* 67:297-303.
- Kim JJ, Jung MW (2006) Neural circuits and mechanisms involved in Pavlovian fear conditioning: a critical review. *Neurosci Biobehav Rev* 30:188-202.
- Knapska E, Macias M, Mikosz M, Nowak A, Owczarek D, Wawrzyniak M, Pieprzyk M, Cymerman IA, Werka T, Sheng M, Maren S, Jaworski J, Kaczmarek L (2012) Functional anatomy of neural circuits regulating fear and extinction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:17093-17098.
- Kraebel KS, Vizvary LM, Heron JS, Spear NE (1998) Effect of context salience on heart rate orienting and habituation in preweanling and periadolescent rats. *Behav Neurosci* 112:1080-1091.
- Krasne FB, Fanselow MS, Zelikowsky M (2011) Design of a neurally plausible model of fear learning. *Front Behav Neurosci* 5:41.
- Langton JM, Kim JH, Nicholas J, Richardson R (2007) The effect of the NMDA receptor antagonist MK-801 on the acquisition and extinction of learned fear in the developing rat. *Learn Mem* 14:665-668.
- Lilliquist MW, Nair HP, Gonzalez-Lima F, Amsel A (1999) Extinction after regular and irregular reward schedules in the infant rat: influence of age and training duration. *Dev Psychobiol* 34:57-70.
- Maren S (2008) Pavlovian fear conditioning as a behavioral assay for hippocampus and amygdala function: cautions and caveats. *Eur J Neurosci* 28:1661-1666.
- Maren S, Aharonov G, Fanselow MS (1996a) Retrograde abolition of conditional fear after excitotoxic lesions in the basolateral amygdala of rats: absence of a temporal gradient. *Behav Neurosci* 110:718-726.
- Maren S, Aharonov G, Fanselow MS (1997) Neurotoxic lesions of the dorsal hippocampus and Pavlovian fear conditioning in rats. *Behav Brain Res* 88:261-274.
- Maren S, Aharonov G, Stote DL, Fanselow MS (1996b) N-methyl-D-aspartate receptors in the basolateral amygdala are required for both acquisition and expression of conditional fear in rats. *Behav Neurosci* 110:1365-1374.
- Maren S, De Oca B, Fanselow MS (1994) Sex differences in hippocampal long-term potentiation (LTP) and Pavlovian fear conditioning in rats: positive correlation between LTP and contextual learning. *Brain Res* 661:25-34.
- Maren S, Fanselow MS (1996) The amygdala and fear conditioning: has the nut been cracked? *Neuron* 16:237-240.
- McKinzie DL, Lee J, Bronfen JH, Spear LP, Spear NE (1994) Context and tone conditioning are selectively impaired by ethanol in the preweanling rat: effects of dose and time of administration. *Behav Neural Biol* 62:201-209.
- Moye TB, Rudy JW (1985) Ontogenesis of learning: VI. Learned and unlearned responses to visual stimulation in the infant hooded rat. *Dev Psychobiol* 18:395-409.
- Nair HP, Berndt JD, Barrett D, Gonzalez-Lima F (2001) Maturation of extinction behavior in infant rats: large-scale regional interactions with medial prefrontal cortex, orbitofrontal cortex, and anterior cingulate cortex. *J Neurosci* 21:4400-4407.
- Nair HP, Gonzalez-Lima F (1999) Extinction of behavior in infant rats: development of functional coupling between septal, hippocampal, and ventral tegmental regions. *J*

- Neurosci 19:8646-8655.
- Orsini CA, Maren S (2012) Neural and cellular mechanisms of fear and extinction memory formation. *Neurosci Biobehav Rev* 36:1773-1802.
- Pavlov IP (1927) *Conditioned reflexes: an investigation of the physiological activity of the cerebral cortex*. Oxford, England: Oxford Univ. Press.
- Pugh CR, Rudy JW (1996) A developmental analysis of contextual fear conditioning. *Dev Psychobiol* 29:87-100.
- Quirk GJ, Mueller D (2008) Neural mechanisms of extinction learning and retrieval. *Neuropsychopharmacology* 33:56-72.
- Quirk GJ, Pare D, Richardson R, Herry C, Monfils MH, Schiller D, Vicentic A (2010) Erasing fear memories with extinction training. *J Neurosci* 30:14993-14997.
- Revilla DA, Cotella E, Paglini MG, Arias C (2015) Contextual learning and context effects during infancy: 30 years of controversial research revisited. *Physiol Behav* 148:6-21.
- Revilla DA, Spear NE, Arias C (2011) Ontogenetic differences in sensitivity to LiCl- and amphetamine-induced taste avoidance in preweanling rats. *Chem Senses* 36:565-577.
- Rovee-Collier C, Cuevas K (2009) Multiple memory systems are unnecessary to account for infant memory development: an ecological model. *Dev Psychol* 45:160-174.
- Rovee-Collier C, Giles A (2010) Why a neuromaturational model of memory fails: exuberant learning in early infancy. *Behav Processes* 83:197-206.
- Rudy JW (2009) Context representations, context functions, and the parahippocampal-hippocampal system. *Learn Mem* 16:573-585.
- Rudy JW, Hyson RL (1984) Ontogenesis of learning: III. Variation in the rat's differential reflexive and learned responses to sound frequencies. *Dev Psychobiol* 17:285-300.
- Rudy JW, Morledge P (1994) Ontogeny of contextual fear conditioning in rats: implications for consolidation, infantile amnesia, and hippocampal system function. *Behav Neurosci* 108:227-234.
- Rudy JW, Sutherland RJ (1989) The hippocampal formation is necessary for rats to learn and remember configural discriminations. *Behav Brain Res* 34:97-109.
- Sigmundi RA, Bouton ME, Bolles RC (1980) Conditioned freezing in the rat as a function of shock intensity and CS modality. *Bull Psychon Soc* 15:254-256.
- Spear NE (1984a) Behaviours that indicate memory: levels of expression. *Can J Psychol* 38:348-367.
- Spear NE (1984b) The future study of learning and memory from a psychobiological perspective. In: *Perspectives in Psychological Experimentation* (Sarris, V. and Parducci, A., eds), pp 87-103 Hillsdale, NJ: Erlbaum.
- Spear NE, Miller JS, Jagielo JA (1990) Animal memory and learning. *Annu Rev Psychol* 41:169-211.
- Sutherland RJ, McDonald RJ, Hill CR, Rudy JW (1989) Damage to the hippocampal formation in rats selectively impairs the ability to learn cue relationships. *Behav Neural Biol* 52:331-356.
- Thomas BL, Larsen N, Ayres JJ (2003) Role of context similarity in ABA, ABC, and AAB renewal paradigms: implications for theories of renewal and for treating human phobias. *Learn Motiv* 34:410-436.

- Vogt MB, Rudy JW (1984a) Ontogenesis of learning: I. Variation in the rat's reflexive and learned responses to gustatory stimulation. *Dev Psychobiol* 17:11-33.
- Vogt MB, Rudy JW (1984b) Ontogenesis of learning: IV. Dissociation of memory and perceptual-altering processes mediating taste neophobia in the rat. *Dev Psychobiol* 17:601-611.
- Warren JA, Jr., Bolles RC (1967) A reevaluation of a simple contiguity interpretation of avoidance learning. *J Comp Physiol Psychol* 64:179-182.
- Wilson A, Brooks DC, Bouton ME (1995) The role of the rat hippocampal system in several effects of context in extinction. *Behav Neurosci* 109:828-836.
- Yap CS, Richardson R (2007) Extinction in the developing rat: an examination of renewal effects. *Dev Psychobiol* 49:565-575.