



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

**Tesi Doctoral**  
**Neurociències**

**Estimulació elèctrica del feix prosencefàlic medial  
com a tractament per potenciar la memòria:  
condicions d'aplicació**

**Neus Biosca Simon**

Codirigida per:

Dr. Ignacio Morgado Bernal

Dra. Pilar Segura Torres

Departament de Psicobiologia i de Metodologia de les Ciències de la Salut  
Facultat de Psicologia. Institut de Neurociències  
Universitat Autònoma de Barcelona

Bellaterra, 2018



Tesi Doctoral  
Neurociències

**Estimulació elèctrica del feix prosencefàlic medial  
com a tractament per potenciar la memòria:  
condicions d'aplicació**

**Neus Biosca Simon**

Bellaterra, 2018



Aquest treball ha estat possible gràcies a:

- Una beca de Formació de Professorat Universitari (FPU) del *Ministerio de Educación, Cultura y Deporte* (FPU13/04649)
- Dos projectes I+D+i finançats pel Ministerio de Economía y Competitividad dins del Programa Estatal de Fomento de la Investigación Científica y Técnica de Excelencia (PSI2013-41018-P i PSI2017-83202-C2-1-P)



Aquesta tesi doctoral no hauria estat possible sense l'ajut de tots els éssers que citaré a continuació, molts dels quals han estat un suport important en els moments de defalliment.

Primer de tot, vull agrair a la meva filla Montserrat el seu suport incondicional, la seva paciència i els seus consells, per escoltar-me, animar-me i cuidar-me. Al Joel, per ser-hi, per les converses, per fer-me reflexionar amb la seva intel·ligència excepcional.

També he d'agrair a la meva mare Roser haver estat al meu costat per veure culminada la meva aventura acadèmica, per ajudar-me i escoltar-me. Als que ja no hi són, el meu pare Joan i la meva tieta Teresa, per haver confiat en mi quan va caldre. Papa, tieta, m'agradaria creure que podeu llegir aquestes línies i estar orgullosos de mi. Gràcies a la meva germana Alba i al meu nebot Dani per ser la millor família del món, pel vostre suport, els ànims i la companyia.

Als meus amics i companys de feina durant molts anys, Climent i Susagna, per ser la meva segona família, per la vostra immensa paciència, el vostre ajut i comprensió, les converses i l'amistat. Sense vosaltres no hauria arribat on soc, mai us ho podré agrair en la justa mesura.

Gràcies a les meves amigues M<sup>a</sup> Àngels, Cristina, Camino, Victòria, Sònia, Mercè, Manoli, Sílvia, Stefi i Elisabet. Algunes ja ens coneixíem d'abans, altres heu aparegut al llarg d'aquest camí però totes heu fet que fos molt més fàcil transitar-lo.

També vull agrair als meus directors de tesi, a l'Ignacio per haver confiat sempre en mi —en els moments fàcils i en els difícils—, per haver-me guiat al llarg de la meva carrera acadèmica i donar-me aquella empenta que necessitava per culminar-la amb la titulació més elevada que es pot obtenir. Gràcies, gràcies i mil gràcies a la Pilar, per la seva immensa paciència, per les seves paraules d'ànim i per la seva confiança; per haver convertit la meva tesi en una gran obra.

A la Gemma i l'Elisabet de Girona, per haver-me ajudat a fer una part dels treballs d'aquesta tesi, pel suport i els consells. A les professores Marga, Mabe i Meritxell pel seu ajut en la docència i a la resta de professors del departament Laura, Gemma, David, Anna, Sònia, Marc... per les converses, els somriures i les salutacions.

Als tècnics de laboratori Karlos i Cristina per haver-me ajudat i escoltat quan ho he necessitat.



Als meus companys de laboratori i de despatx. Sol, per haver-me ensenyat a ser autònoma i a lluitar pel que vull, per acompanyar-me en els moments difícils, per escoltar-me sempre. Gran persona i gran professional.

Carles, per les inoblidables estones, divertides i no tan divertides, que hem passat al laboratori. Pels tips de riure, els caramels i els croissants de xocolata.

Joan, Laura i Divka, per ajudar-me a treballar i a procrastinar en la seva justa mesura, les converses que hem tingut han estat molt enriquidores, us trobaré a faltar. Crec que la meva introversió no m'ha permès mostrar-vos la meva estima i el meu agraïment com mereixeu...

Als pràcticums que m'han ajudat al llarg d'aquests anys, especialment a la Laura per la seva ajuda incondicional en l'etapa més difícil, per ser una gran persona, sensible i intel·ligent.

Finalment, vull fer un agraïment especial als meus gossos. A l'Haití, la meva fidel companya que va ser al meu costat tots els anys de carrera acadèmica i em va deixar just començar el doctorat. A l'Ockham i al Bob que l'han rellevat i m'han esperat a casa, pacientment, sempre atents i comprensius. Gràcies per acompanyar-me, alegrar-me i donar-me forces per continuar. I a tots els animals que han donat la seva vida per fer possible l'avanç de la investigació.

<b>I. PLANTEJAMENT / APPROACH</b> .....	1
<b>II. MARC TEÒRIC I ANTECEDENTS EXPERIMENTALS</b> .....	11
1. SUBSTRAT NERVIÓS DEL REFORÇ .....	13
1.1 INTRODUCCIÓ .....	13
1.2 AUTOESTIMULACIÓ ELÈCTRICA INTRACRANIAL .....	13
1.3 NEUROANATOMIA .....	14
1.4 NEUROQUÍMICA .....	17
2. AEIC I APRENENTATGE I MEMÒRIA .....	20
2.1 FACILITACIÓ DE L'APRENENTATGE I LA MEMÒRIA .....	20
2.1.1 Tipus de tasca .....	20
2.1.2 Característiques del corrent elèctric estimulant .....	21
2.1.3 Moment d'administració .....	25
2.1.4 Autoadministració (AEIC) i administració remota (DBS) .....	27
2.2 MECANISMES IMPLICATS .....	29
2.2.1. Sistemes neuroanatòmics activats per l'AEIC .....	29
2.2.2. Expressió gènica .....	30
2.2.3. Neuroadaptacions i plasticitat sinàptica .....	31
2.2.4. Neurogènesi .....	31
3. ESTIMULACIÓ ELÈCTRICA CEREBRAL EN HUMANS: DBS .....	32
3.1 INTRODUCCIÓ .....	32
3.2 DBS PER MODULAR CAPACITATS COGNITIVES .....	32
3.3 DBS DEL FPM I ÀREES RELACIONADES .....	34
3.3.1 DBS del FPM en l'addicció .....	34
3.3.2 DBS del FPM en el TOC .....	34
3.3.3 DBS del FPM en la depressió major .....	34
4. AVALUACIÓ DE LA MEMÒRIA EXPLÍCITA .....	35
4.1 INTRODUCCIÓ .....	35
4.2 LABERINT AQUÀTIC DE MORRIS .....	36

## Índex

4.2.1	Introducció .....	36
4.2.2	Procediment estàndard .....	37
4.2.3	Variables analitzades .....	38
4.2.4	Estratègies de natació .....	38
4.2.5	Substrat nerviós implicat .....	39
5.	AVALUACIÓ DE LA MEMÒRIA IMPLÍCITA .....	40
5.1	<i>INTRODUCCIÓ</i> .....	40
5.2	<i>EVITACIÓ ACTIVA DE DOS SENTITS</i> .....	41
5.2.1	Introducció .....	41
5.2.2	Procediment estàndard .....	42
5.2.3	Variables analitzades .....	43
5.2.4	Substrat nerviós implicat .....	43
5.3	<i>DISCRIMINACIÓ VISUAL SIMULTÀNIA (DVS) AL LAM</i> .....	44
5.3.1	Introducció .....	44
5.3.2	Procediment estàndard .....	44
5.3.3	Variable analitzades .....	45
5.3.4	Estratègies de natació .....	46
5.3.5	Substrat nerviós implicat .....	46
III.	<b>HIPÒTESI I OBJECTIUS</b> .....	49
IV.	<b>TREBALL EXPERIMENTAL</b> .....	53
	<b>BLOC I</b> .....	55
1.	PLANTEJAMENT GENERAL .....	57
2.	EXPERIMENT I .....	59
2.1	<i>Introducció</i> .....	59
2.2	<i>Material i procediment</i> .....	59
2.3	<i>Resultats</i> .....	67
2.4	<i>Discussió</i> .....	71
3.	EXPERIMENT II .....	75
3.1	<i>Introducció</i> .....	75

3.2 <i>Material i procediment</i> .....	75
3.3 <i>Resultats</i> .....	76
3.4 <i>Discussió</i> .....	79
4. EXPERIMENT III .....	83
4.1 <i>Introducció</i> .....	83
4.2 <i>Material i procediment</i> .....	83
4.3 <i>Resultats</i> .....	84
4.4 <i>Discussió</i> .....	87
5. EXPERIMENT IV .....	91
5.1 <i>Introducció</i> .....	91
5.2 <i>Material i procediment</i> .....	91
5.3 <i>Resultats</i> .....	92
5.4 <i>Discussió</i> .....	95
<b>BLOC II</b> .....	97
1. EXPERIMENT V .....	99
1.1 <i>Introducció</i> .....	99
1.2 <i>Material i procediment</i> .....	99
1.3 <i>Resultats</i> .....	106
1.4 <i>Discussió</i> .....	110
2. EXPERIMENT VI .....	113
2.1 <i>Introducció</i> .....	113
2.2 <i>Material i procediment</i> .....	114
2.3 <i>Resultats</i> .....	120
2.4 <i>Discussió</i> .....	134
3. EXPERIMENT VII .....	141
3.1 <i>Introducció</i> .....	141
3.2 <i>Material i procediment</i> .....	141
3.3 <i>Resultats</i> .....	145
.....	153

Índex

3.4 <i>Discussió</i> .....	153
<b>V. DISCUSSIÓ GENERAL</b> .....	161
<b>VI. CONCLUSIONS</b> .....	173
<b>VII. BIBLIOGRAFIA</b> .....	177
<b>VIII. ANNEXOS</b> .....	209

<b>ACH</b>	Acetilcolina
<b>ACHE</b>	Acetilcolinesterasa
<b>AEIC</b>	Autoestimulació elèctrica intracranial
<b>ATV</b>	Àrea tegmental ventral
<b>BLA</b>	Amígdala basolateral
<b>CeA</b>	Amígdala central
<b>CIO</b>	Cerca de la intensitat òptima
<b>CM1</b>	Còrtex motor primari
<b>CPF</b>	Còrtex prefrontal
<b>DA</b>	Dopamina
<b>DBS</b>	Estimulació cerebral profunda (de <i>Deep Brain Stimulation</i> )
<b>DVS</b>	Discriminació visual simultània
<b>E</b>	Est
<b>EC</b>	Estímul condicionat
<b>EI</b>	Estímul incondicionat
<b>EV2</b>	Evitació activa de dos sentits
<b>FPM</b>	Feix prosencefàlic medial
<b>GD</b>	Gir dentat
<b>ICSS</b>	<i>Intracranial electrical self-stimulation</i>
<b>IO</b>	Intensitat òptima
<b>HL</b>	Hipotàlem lateral
<b>HPC</b>	Hipocamp
<b>LA</b>	Amígdala lateral
<b>LAM</b>	Laberint aquàtic de Morris
<b>N</b>	Nord
<b>NAcc</b>	Nucli accumbens
<b>NG</b>	Neurogènesi / <i>Neurogenesis</i>
<b>O</b>	Oest
<b>ROI</b>	Regió d'interès (de l'anglès <i>Region Of Interest</i> )
<b>S</b>	Sud
<b>SNR</b>	Substrat nerviós del reforç
<b>TOC</b>	Trastorn obsessiu-compulsiu



## **I. PLANTEJAMENT / APPROACH**

---





L'estimulació de regions cerebrals del sistema del reforç [1] es considera com una experiència reforçadora intensa que produeix patrons conductuals similars als desencadenats per reforçadors primaris com ara els aliments i l'aigua [2]. En animals, la prova més directa que aquesta estimulació produeix reforçament apetitiu és que els individus són capaços d'autoadministrar-se-la mitjançant l'anomenada conducta d'autoestimulació elèctrica intracranial (AEIC). A més de les seves propietats relacionades amb el reforç, l'AEIC ha demostrat ser capaç de modular els processos d'aprenentatge i memòria avaluats en diferents paradigmes, tant de memòria implícita [3–6] com de memòria explícita [7–11] en rates. L'AEIC és una tècnica sense efectes secundaris coneguts que, com hem demostrat repetidament al nostre laboratori, a més de facilitar l'aprenentatge i la memòria en subjectes sans, és capaç de revertir els dèficits de memòria causats per la lesió de diferents àrees del cervell [5, 12, 13].

Malgrat que l'estimulació elèctrica de regions cerebrals (DBS, de l'anglès *Deep Brain Stimulation*) s'ha estat utilitzant amb finalitats terapèutiques en humans des de la dècada dels anys 60, principalment per tractar símptomes motors en la malaltia de Parkinson, no va ser fins l'any 2008 que l'equip d'Andrés Lozano de la Universitat de Toronto la va començar a provar per a tractar problemes d'aprenentatge i memòria; arrel d'un descobriment fortuït en què, al tractar un pacient amb obesitat mòrbida, van veure que l'estimulació cerebral de l'hipotàlem evocava memòries autobiogràfiques detallades i facilitava una tasca de memòria associativa. En els últims anys, la DBS ha experimentat un gran progrés i és àmpliament utilitzada per eliminar o pal·liar símptomes neurològics i/o cognitius en diferents malalties neurodegeneratives i trastorns psicopatològics. La DBS ha resultat efectiva pel tractament de la malaltia de Parkinson [14], depressió major, trastorn obsessiu compulsiu (TOC) i altres trastorns neuropsiquiàtrics [15–20]. Actualment la DBS s'està aplicant també amb èxit a malalts d'Alzheimer [21–23], en especial pels seus potencials efectes positius sobre la memòria. El corrent estimulant utilitzat per a la DBS és d'ona quadrada, principalment perquè permet controlar amb major precisió que la sinusoidal la durada del pols i l'interval entre polsos [24]. Tenint en compte que els estudis de l'administració de DBS en diferents regions diana del cervell per a millorar la memòria en humans són molt recents i poc explorats, creiem necessari seguir fent estudis en animals per poder aprofundir en el coneixement del substrat neural i els mecanismes implicats en aquest tractament, així com l'establiment de les condicions més apropiades per obtenir millora cognitiva. Per aquesta raó, la finalitat principal d'aquest treball consisteix en aprofundir en l'estudi de l'AEIC en la rata, administrada a l'hipotàlem lateral (HL), en les fibres del feix prosencefàlic medial (FPM), com a tractament potenciador de la memòria i, en especial, en l'ús de paràmetres i formes d'administració més propers a les condicions aplicades a la clínica. Aquest

enfocament, encaminat a l'aproximació de les condicions d'aplicació del tractament entre la recerca bàsica i la clínica, augmenta el valor translacional dels resultats obtinguts al nostre laboratori utilitzant AEIC en la rata.

El treball experimental està dividit en dos blocs, el primer bloc de quatre experiments (Experiments I a IV) pretén reproduir o replicar els resultats de potenciació de la memòria obtinguts amb l'AEIC d'ona sinusoidal amb l'administració del mateix tractament però d'ona quadrada<sup>1</sup>. Aquest primer bloc està motivat, per una part, per la manca d'experiments realitzats amb corrent elèctric d'ona quadrada en la rata, ja que la major part dels treballs amb AEIC realitzats al nostre laboratori s'han dut a terme mitjançant estimulació elèctrica amb corrent d'ona sinusoidal. A més a més, en els pocs experiments amb ona quadrada realitzats al nostre laboratori malgrat que s'ha observat certa facilitació de la memòria, els resultats obtinguts no són concloents, no obtenint la facilitació esperada [25] ni amb la mateixa consistència i regularitat que amb ona sinusoidal. Per altra part, aquest objectiu parteix de que el corrent d'ona quadrada és el més utilitzat per la DBS en humans. Així, aquest conjunt d'experiments exploren els paràmetres del corrent d'ona quadrada de l'AEIC que permetin facilitar l'aprenentatge i la memòria, en particular d'una tasca de discriminació visual simultània (DVS).

En el segon bloc d'experiments hem volgut estudiar diferents condicions d'aplicació de l'AEIC, investigant la importància de la contingència del tractament amb les tasques d'aprenentatge o situacions concretes d'entrenament, la major durada del tractament i si depèn o no de que el tractament sigui autoadministrat o administrat remotament. Concretament, a l'Experiment V s'ha procurat un model d'administració de les sessions d'AEIC que s'aproximi a l'administració de la DBS en pacients, pel fet de ser distribuït al llarg del dia i caracteritzat principalment per ser aplicat de manera no contingent a cap entrenament en concret. El principal objectiu d'aquest Experiment V ha estat estudiar la importància de la contingència entre l'AEIC i l'entrenament a la tasca d'aprenentatge, valorant l'efectivitat d'un tractament d'AEIC no contingent sobre la capacitat d'aprenentatge dels subjectes, avaluada en diferents tipus de tasques. A nivell metodològic, els animals s'han sotmès diàriament a dues tasques d'aprenentatge molt diferents entre sí, una emocional de caràcter implícit, l'evitació activa de dos sentits (EV2) que implica principalment l'amígdala, i una altra de tipus espacial explícit, el laberint aquàtic de Morris (LAM), que implica majoritàriament l'hipocamp (HPC).

El segon experiment d'aquest bloc, l'Experiment VI, s'ha centrat en l'estudi de la pauta d'administració del tractament. A diferència de la forma d'administració de la DBS en

---

<sup>1</sup> En els nostres treballs hem administrat corrent amb ona rectangular i quadrada. En estudis de DBS en humans i en experimentació animal també trobem aquestes dues configuracions diferents. A fi de clarificar, en endavant usarem el terme ona quadrada referint-nos indistintament als dos tipus.

pacients, persistent, regular i distribuïda al llarg del temps, en models animals l'administració de l'estimulació cerebral sol ser puntual i de curta durada; habitualment els animals experimentals reben una sola sessió d'entre 10 minuts i 4 hores, podent-se repetir diàriament durant una setmana [11, 26–30]. Per tant, l'objectiu d'aquest experiment ha estat estudiar els efectes de l'AEIC administrada post-entrenament sobre una tasca espacial durant un període superior a l'habitual (2 setmanes). Això ha suposat reduir el nombre d'assaigs per sessió per tal d'evitar un possible efecte sostre de l'aprenentatge i, al perllongar el període del tractament i de l'entrenament, ha permès fer un estudi dels possibles efectes de l'AEIC sobre la neurogènesi (NG). Diversos estudis previs han mostrat que tant l'aprenentatge espacial com el tractament d'AEIC estan relacionats positivament amb la NG al gir dentat (GD) de l'HPC [31–35]. Però, fins on sabem, no s'han fet treballs estudiant la facilitació de l'aprenentatge espacial mitjançant tractament d'AEIC i la relació d'aquesta facilitació amb la NG. Per tant, el segon objectiu d'aquest experiment ha estat fer un estudi de NG, activació neuronal i integració funcional de les noves neurones generades al llarg del procés experimental, analitzant també a nivell molecular possibles canvis en l'activitat de l'enzim acetilcolinesterasa (AChE) en diferents regions cerebrals.

En el tercer i últim experiment d'aquest segon bloc (Experiment VII) hem volgut comparar dues formes d'administració de l'estimulació elèctrica cerebral: autoadministrada (AEIC) i per administració remota, per elucidar si l'autoadministració és una variable rellevant o crítica en els resultats de potenciació de la memòria mitjançant AEIC obtinguts fins al moment. Aquest experiment ha tingut, per tant, l'objectiu de comparar les dues formes d'administració de l'estimulació del FPM sobre un aprenentatge espacial al LAM i la seva retenció, donat que hi ha molt pocs estudis que hagin abordat aquesta comparació [36, 37]. L'AEIC ja ha mostrat la seva capacitat per facilitar la memòria en aquesta tasca [9, 11], mentre que ens manca evidència dels efectes de l'administració remota d'un tractament similar i en la mateixa regió cerebral que l'AEIC, però administrat per l'experimentador en les condicions en què apliquem l'AEIC al nostre laboratori. En aquest segon cas, seria un tractament més comparable a la DBS en humans. Diversos estudis han mostrat que l'AEIC del FPM ha produït activació neuronal en àrees relacionades amb la memòria [35, 38, 39], aquest efecte s'ha evidenciat per l'expressió de la proteïna c-Fos, que és un marcador d'activitat cel·lular. Per tant, en aquest últim experiment hem realitzat un estudi dels efectes dels dos tipus d'administració, AEIC i DBS, en l'activació neuronal d'àrees relacionades amb la memòria, el reforç i l'*arousal*, així com d'àrees motores, tenint en compte que ambdós tipus de tractament es diferencien principalment pel fet que els animals que reben DBS

no han de realitzar una activitat motora durant el tractament, a diferència dels que reben AEIC.

En resum, la present tesi doctoral es compon de set experiments distribuïts en dos blocs i ha tingut com objectiu general estudiar si l'AEIC administrada al FPM facilita la memòria en rates Wistar en diferents situacions experimentals que pretenen aproximar-se a aquelles que s'usen a la clínica: 1) aplicant estimulació amb corrent elèctric d'**ona quadrada**, 2) aplicant el tractament amb ona sinusoidal **no contingent** amb l'aprenentatge, 3) incrementant la **durada** del tractament i 4) **comparant** els efectes d'un tractament **autoadministrat** (AEIC) i un tractament d'**administració remota** (DBS).

Les tècniques d'estimulació cerebral mitjançant implantació quirúrgica d'elèctrodes en àrees del cervell es consideren invasives i en la majoria de casos s'usen com a últim recurs en pacients resistents a altres tractaments. Creiem i confiem que en un futur, mètodes alternatius d'estimulació cerebral menys invasius i que permetin una localització més precisa de l'efecte, com són l'optogenètica, la teràpia genètica amb vectors virals d'estimulació o l'estimulació magnètica transcranial, substituiran les actuals tècniques d'implantació d'elèctrodes. No obstant, els nostres treballs d'AEIC tenen per objectiu general seguir aportant coneixement en relació a les condicions conductuals i als mecanismes implicats en la potenciació de l'aprenentatge i la memòria per estimulació elèctrica de les àrees cerebrals del reforç.

Stimulation of reward-related brain regions [1] is considered an intense reinforcing experience that produces behavioural patterns similar to those triggered by primary reinforcers like food and water [2]. The most evident prove that this stimulation produces appetitive reward is that animals can self-administer it in the so-called intracranial electrical self-stimulation (ICSS). Besides its features related to reward, ICSS has shown to be able to modulate learning and memory cognitive processes in different paradigms, of both implicit [3–6] and explicit memory [7–11] in rats. ICSS is a treatment without known side effects that, as we have repeatedly shown in our laboratory, in addition to facilitate learning and memory it is able to revert memory impairments caused by damage in different brain areas [5, 12, 13].

Although deep brain stimulation (DBS) of different brain regions is being used for therapeutic purposes in humans since the 60's, mainly to alleviate Parkinson's disease motor symptoms, it has not been until 2008 that Andrés Lozano's team at Toronto University started to use it for memory and learning issues. Following an incidental discovery while treating a patient suffering morbid obesity, they found that electrical stimulation of the hypothalamus evoked detailed autobiographic memories and facilitated an associative memory task. In the last years, DBS has experienced a great progress and currently it is widely used to heal or alleviate neurological and/or cognitive symptoms in different neurodegenerative and psychopathological disorders. DBS has been an effective treatment for patients with Parkinson disease [14], major depression, obsessive-compulsive disorder and other neuropsychiatric disorders [15–20].

Currently, DBS is also being successfully used in Alzheimer's patients [21–23], mainly for its potential positive effects on memory. The electrical current typically used for DBS has a square waveform, especially because the pulse width and inter-pulse intervals can be controlled more precisely [24]. Whereas DBS studies of its administration in different brain target regions to improve memory in humans are very recent and little explored, we believe it necessary to continue doing research in laboratory animals to delve into the knowledge of the neural substrate and underlying mechanisms of this treatment. As well as establishing the appropriate conditions to obtain cognitive improvement.

For this reason, the main objective of this thesis consists in deepen the study of ICSS in rats, administered at the lateral hypothalamus in the medial forebrain bundle fibres, as a treatment to enhance memory and, especially, in the use of parameters and methods of administration closer to the conditions applied in clinical practice. This approach, aimed at approximating treatment application conditions between basic and clinical research, increases the translational value of the results obtained in our laboratory, using ICSS in rats.

The experimental studies are divided into two sets of experiments, the first set of four experiments (Experiment I to IV) intended to reproduce or replicate the results of memory enhancement obtained with sinusoidal waveform ICSS, administering the same treatment but with a square waveform. On the one hand, we based the aim of this first set of experiments on the lack of evidence of this kind of facilitation coming from experiments carried out applying square wave electrical current in rats, since most of the research with ICSS carried out in our laboratory has been done with sine wave electrical stimulation. Furthermore, a few experiments of our laboratory have tested the square wave current and found certain memory facilitation produced by ICSS, but the results were not conclusive, not showing the expected facilitative effects [25], nor with the same consistency and regularity that sine wave ICSS showed. On the other hand, this objective is based on the evidence that square wave electrical current is the most used for DBS in humans. Thus, this set of experiments explored the ICSS square waveform parameters that could produce learning and memory facilitative effects, concretely on a simultaneous visual discrimination task.

The second set of experiments aimed to test different conditions of ICSS administration, studying the contingency of the treatment to memory tasks or specific training situations, treatment duration, and whether it depends or not in self-administration or remote administration. Specifically, the Experiment V searched an ICSS model of administration to approach DBS in clinical practice, since ICSS is distributed along the day and mainly not contingently administered to any specific training task. The main objective of this Experiment V was to study the importance of contingency between ICSS and training on the learning task, testing the effectiveness of ICSS non-contingent to learning on animals learning skills, evaluated on different types of tasks. Methodologically, rats were daily subjected to two very different memory tasks, one emotional and implicit, two-way active avoidance, that involves mainly the amygdala, and another one related to explicit and spatial memory in the Morris water maze, that involves mainly the hippocampus.

The second experiment of this second set, Experiment VI, focused on the study of treatment administration pattern. Unlike DBS, treatment pattern in human patients is persistent and regularly administered over time; in animal models, electrical brain stimulation use to be one-time administered and of short duration; usually experimental animals receive a single session of around 10 minutes to 4 hours, that can be repeated daily for one week [11, 26–30]. Thus, this experiment had the aim of testing the effects of ICSS administered post-training on a spatial task during a higher period than usual (2 weeks). This meant reducing the number of trials per session to prevent a roof effect on learning and, while prolonging the treatment and training period, has permitted to study the potential effects of ICSS on neurogenesis (NG). Several previous studies have

shown that spatial learning and ICSS are positively related to NG in the dentate gyrus of the hippocampus [31–35]. But, as far as we know, there is no research studying the facilitative effects of ICSS on spatial learning and the relationship of these effects with NG. Therefore, the second aim of this experiment has been to study NG, neuronal activation and functional integration of new neurons generated during the experimental process. We also analysed, at a molecular level, the possible changes of acetylcholinesterase enzyme activity in different brain regions.

The third and last experiment of this second set (Experiment VII) aimed to compare two different administration modalities of electrical brain stimulation: self-administered and by remote administration, to elucidate whether the self-administration is a critical variable in the results of memory potentiation by ICSS obtained until the present day. Thus, this experiment aims to compare the effects of the two forms of ICSS administration in the MFB on spatial memory in the Morris water maze and its retention, given there is little research addressing this comparison [36, 37]. ICSS has shown its ability to facilitate memory in this spatial memory task [9, 11], while there is a lack of evidence about the effects of remote administration of a similar treatment and in the same cerebral region than ICSS but administered by the researcher, with the specific conditions that we apply ICSS in our laboratory. In this second case, it would be more comparable to DBS in humans. Several studies have shown that ICSS in the medial forebrain bundle can produce neuronal activation in areas related to memory [35, 38, 39], this effect has been shown by the expression of the c-Fos protein, a cellular activity marker. Thus, in this last experiment we studied the effects of two types of administration, ICSS and DBS, on the neuronal activation of areas related to memory, arousal and reward, as well as motor areas; considering that both types of treatment are different, mainly, by the fact that animals that receive DBS do not have to carry out a motor activity during treatment, unlike the ones that receive ICSS.

In summary, the present doctoral thesis is composed of seven experiments divided into two sets. It has the general aim of studying whether ICSS administered in the medial forebrain bundle facilitates memory in Wistar rats, in different experimental situations that pretend to approach those used in clinical practice: 1) applying ICSS with square wave electrical current, 2) applying ICSS treatment non contingent to training, 3) increasing the extension of the ICSS treatment and 4) comparing the effects of a self-administered treatment (ICSS) and a remote administered treatment (DBS).

Brain stimulation techniques, by means of surgical implantation of electrodes in brain areas, are considered invasive and, in most cases, they are used as a last resort for



patients resistant to other treatments. We expect and hope that in a near future, alternative and less invasive brain stimulation methods with a higher target accuracy, like for example, optogenetic techniques, genetic therapy by viral vectors or transcranial magnetic stimulation, will replace the current techniques of electrodes implantation. However, our research in ICSS has the general objective to keep providing knowledge regarding the behavioural conditions and mechanisms implicated in learning and memory potentiation, by electrical stimulation of reward brain areas.

## **II. MARC TEÒRIC I ANTECEDENTS EXPERIMENTALS**

---



## **1. SUBSTRAT NERVIÓS DEL REFORÇ**

### **1.1 INTRODUCCIÓ**

L'any 1954, James Olds i Peter Milner realitzaven un treball per tal d'investigar el sistema reticular activador ascendent del cervell de les rates i analitzar els efectes de l'estimulació elèctrica d'aquest sistema en la motivació. En un dels animals, l'elèctrode va quedar implantat en una àrea no prevista en l'estudi i van trobar que si s'estimulaven elèctricament certes àrees del cervell, les rates estaven disposades a prémer una palanca contínuament per obtenir l'estimulació reforçant, instaurant-se així el que anomenem conducta d'*autoestimulació elèctrica intracranial* (AEIC). Aquest descobriment va permetre verificar l'existència d'un correlat físic del reforç, les estructures cerebrals relacionades amb les experiències reforçants.

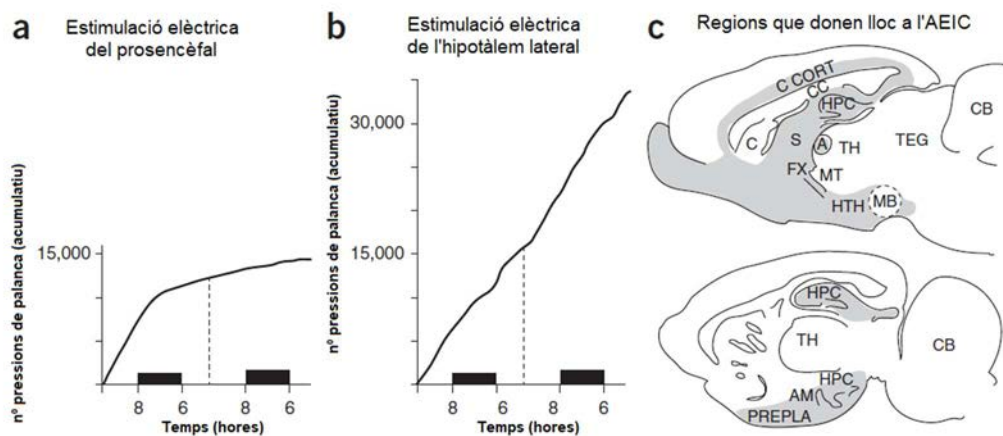
El sistema o substrat nerviós del reforç (SNR) és un conjunt d'estructures del sistema nerviós central que poden ser activades per reforçadors naturals (p.e. menjar, beure, activitat sexual, drogues...), generant conductes apetitives [40]. Aquestes estructures associades amb el reforç activen la transmissió de varis neurotransmissors, però són les vies dopaminèrgiques les majorment implicades, ja que s'ha demostrat que quan ens exposem a un estímul reforçant o quan fem una predicció del valor reforçant d'aquest estímul [41–46], el cervell respon incrementant l'alliberament, principalment, de dopamina (DA) [47].

### **1.2 AUTOESTIMULACIÓ ELÈCTRICA INTRACRANIAL**

La conducta d'AEIC es desencadena per l'activació de sistemes neurals relacionats amb el reforç, així, les rates estan disposades a autoestimular-se de manera continuada per obtenir l'activació d'aquestes regions, podent arribar a morir d'esgotament, inanició i manca de son si no se'ls retira l'estimulació. Ignoren reforçadors naturals com el menjar, inclús en estat de privació [48], i estan disposades a rebre xocs elèctrics a les potes per poder accedir a l'estimulació [49]. Per tant, l'estimulació directa del SNR es considera un reforçador fins i tot més poderós que els reforçadors primaris. L'AEIC no produeix addicció i s'extingeix amb facilitat [1]. Les respostes evocades per l'AEIC depenen de la ubicació de l'elèctrode al cervell, dels paràmetres del corrent elèctric i de l'entorn experimental en el qual s'administra. La regió on s'implanta l'elèctrode rep polsos de corrent molt dèbils, produint un increment en les descàrregues neuronals al voltant de l'extrem distal de l'elèctrode, i els efectes produïts per l'estimulació es poden inferir a partir de l'observació de la conducta dels animals. La conducta d'AEIC es pot obtenir en

diferents espècies de vertebrats [50] i també en humans [51], no obstant, la major part dels estudis s'han dut a terme en ratolins i rates.

Olds i els seus col·laboradors van fer un estudi extensiu del substrat nerviós del reforç i van veure que obtenien els resultats màxims en termes de persistència i taxa de resposta si s'implantava l'elèctrode a l'àrea septal, l'HL [1] i l'àrea tegmental ventral (ATV) [52]. Una àrea crítica per obtenir AEIC és l'HL; estudis de lesió de la mateixa època van mostrar que les lesions electrolítiques de l'HL suprimien la conducta de menjar [53] i de beure [54], mentre que l'estimulació elèctrica d'aquesta àrea produïa una conducta d'ingesta voraç [55], a més de la conducta de prémer la palanca per obtenir l'estimulació [1] (Fig.1). Aquests resultats, en conjunt, van suggerir que l'HL i altres àrees associades no només eren crítiques per la conducta d'ingesta (menjar i beure) sinó que també estaven relacionades amb processos de reforçament [56, 57].



**Fig. 1 L'estimulació elèctrica de diferents àrees del prosencèfal i de l'HL produeix reforçament.**

Les rates presenten conducta d'AEIC quan s'estimulen diferents àrees del prosencèfal basal (a), però només l'autoestimulació elèctrica de l'HL és insaciable (b). Àrees de l'hipotàlem i el prosencèfal (ombregat) que produeixen conducta d'AEIC en ser estimulades (c). CC, cos callós; HPC, hipocamp; S, septum; FX, fòrnix; TH, tàlem; TEG, tegmentum; CB, cerebel; C, caudat; HTH, hipotàlem; AM, amígdala; CORT, còrtex. Adaptat d'Olds (1958) i Garret & Wise (2016).

Des que es va posar de manifest per primera vegada, l'AEIC ha estat una eina bàsica per estudiar el substrat nerviós del reforç en el cervell dels animals. En l'actualitat, s'utilitza principalment com un assaig de prova per avaluar l'impacte de l'abús de drogues [58–61] i també s'ha aplicat per analitzar processos emocionals [62, 63] i, com veurem en la present tesi, d'aprenentatge i memòria [7, 9, 11, 27, 64].

### 1.3 NEUROANATOMIA

En aquest apartat farem referència al principal sistema neuroanatòmic proposat com a substrat de la conducta d'AEIC, amb l'objectiu de comprendre el substrat nerviós

directament estimulat en els experiments que componen aquesta tesi, així com les àrees connectades.

L'estimulació reforçant del cervell es considera un fenomen complex que implica diferents sistemes [65–67]. Els resultats de diversos estudis han permès identificar 4 sistemes que podrien considerar-se substrats independents del reforç: 1) un circuit del romboencèfal relacionat amb la conducta reflexa oral gustativa, 2) el sistema locomotor mesolímbic-estriatopalidal-mesencefàlic, 3) un circuit originat al CPF i 4) el sistema del feix prosencefàlic medial (FPM). Aprofundirem en aquest últim per ser el més important i extensament estudiat, i el que hem estimulat en el present treball.

El FPM és una via neural formada per un conjunt d'axons situats longitudinalment al llarg d'un eix rostrocaudal des del mesencèfal fins el prosencèfal i que passa per l'HL. Inclou axons llargs descendents i ascendents, i axons curts que connecten regions adjacents a nivell de l'àrea preòptica i l'HL.

Els axons ascendents són majoritàriament dopaminèrgics, noradrenèrgics i serotoninèrgics [68] i connecten estructures del tronc de l'encèfal amb el diencèfal i telencèfal. Les neurones noradrenèrgiques connecten majoritàriament estructures de l'hemisferi contralateral i les dopaminèrgiques mantenen una posició bàsicament ipsilateral [69].

Els axons descendents s'originen principalment a l'àrea septal, l'HPC, la banda diagonal de Broca i les cèl·lules circumdants dels illots de Calleja [66] i, en menor mesura, al NAcc, neostriat, còrtex orbitofrontal, nucli dorsomedial de l'hipotàlem, còrtex piriforme i olfatori, nucli del llit de l'estria terminal, substància innominada, i nuclis dorsomedial i paraventricular del tàlem [70, 71]. La major part de les fibres descendents convergeixen a l'HL i àrea preòptica de l'hipotàlem [66] projectant també cap a l'ATV [69] i en menor mesura cap al locus coeruleus, substància gris central, nuclis mesencefàlic del nervi trigèmin, nucli del tracte solitari i als centres autònoms preganglionars del bulb raquídi i la medulla espinal.

Alguns autors han suggerit que el circuit anatòmic crític dels efectes reforçants de l'AEIC del FPM és el constituït per l'HL, l'ATV i l'estriat ventral. Els axons eferents del sistema mesolímbic dopaminèrgic connecten el mesencèfal amb el NAcc, estructura considerada com l'objectiu d'aquest circuit [72]. L'estimulació de l'HL i de l'ATV al llarg del FPM és on la conducta presenta més estabilitat i major nombre de respostes per unitat de temps [49, 73]. Així doncs, s'ha proposat com a responsable de l'AEIC el sistema mesolímbic dopaminèrgic (Fig.2).

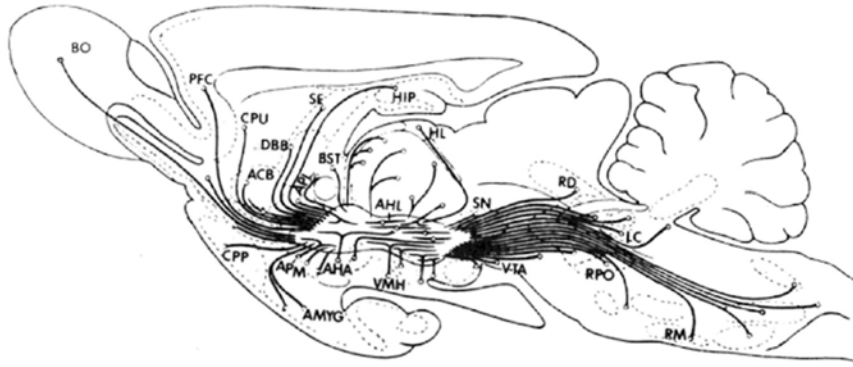


Fig. 2 **Esquema de les vies ascendents del FPM de l'encèfal de la rata.** Adaptat de Nieuwenhuys et al. (1982) i Stellar & Stellar (1985).

La via mesolímbica dopaminèrgica juga un paper primordial en el sistema del reforç connectant l'ATV, una de les principals àrees dopaminèrgiques del cervell, amb el NAcc, una àrea localitzada a l'estriat ventral i fortament associada amb el reforç i la motivació. Una altra via dopaminèrgica important, és la via mesocortical que va des de l'ATV cap al còrtex cerebral i que també forma part del sistema del reforç. Per tant, podem considerar que el SNR està format majoritàriament per les principals vies dopaminèrgiques del cervell (sobretot la via mesolímbica) i estructures com l'ATV i el NAcc connectades per aquestes vies dopaminèrgiques.

Estudis optogenètics més recents suggereixen que l'activació directa de les neurones del sistema mesolímbic dopaminèrgic és suficient per mantenir l'AEIC [74, 75]. Els models actuals del substrat de l'AEIC del FPM i l'ATV suggereixen una primera etapa protagonitzada per les neurones mielíniques descendents activades directament per l'elèctrode, lligada a una segona que inclou neurones mesolímbiques dopaminèrgiques originades a l'ATV.

Mentre que l'estimulació elèctrica activa conjunts de fibres, fent que s'obrin canals iònics presents a les membranes de totes les neurones, l'estimulació optogenètica permet activar només fibres que s'originen en un grup de cèl·lules d'interès i que projecten cap a una àrea determinada. En l'actualitat, els estudis optogenètics han començat a dilucidar quines de les nombroses fibres que s'originen o que passen per l'HL contribueixen a la funció reforçant o motivacional. Per exemple, l'activació directa de neurones de l'HL que expressen transportadors de vesícules de GABA produeix una ingesta voraç i conducta d'autoestimulació òptica [76], similar a l'observada per estimulació elèctrica de l'HL [56, 57]. En canvi, l'estimulació optogenètica de les neurones de l'HL que expressen el transportador de Glutamat tipus 2 provoca efectes conductuals totalment oposats [77]. Malgrat que l'optogenètica pot activar o inhibir neurones de l'HL i circuits associats de manera molt més focalitzada que l'estimulació

elèctrica clàssica, encara no és capaç de modular una única cèl·lula per poder registrar amb precisió la dinàmica de la xarxa neuronal de l'HL vinculada a l'AEIC.

#### 1.4 NEUROQUÍMICA

Diversos estudis han suggerit que la DA està implicada en els efectes reforçants produïts per l'estimulació elèctrica del FPM [78–81]. Com ja hem introduït en l'apartat anterior, les estructures del mesencèfal on es troben els cossos cel·lulars dopaminèrgics i les seves projeccions cap al telencèfal són les principals zones on es poden obtenir nivells estables d'AEIC [66, 82]. L'estimulació elèctrica reforçant del FPM incrementa els nivells de DA al NAcc tant si els animals s'autoadministren el corrent estimulant [83] com si és l'experimentador el que l'administra [84]. Sembla haver-hi una dissociació en els efectes de l'AEIC en funció dels receptors presents a les neurones dopaminèrgiques. Els receptors D1 i D2 del NAcc semblen necessaris per obtenir els efectes reforçants de l'AEIC a l'ATV [85, 86] però no queda clar si ambdós tenen la mateixa funció. Singh i col·laboradors van analitzar la relació dels sistemes de reforç cerebrals amb els receptors de DA i van trobat que si s'administrava un agonista del receptor D2 al NAcc desapareixia la conducta d'AEIC mentre que es trobaven efectes oposats quan s'administrava un agonista del receptor D1 [87]. L'administració d'antagonistes dels mateixos receptors va corroborar aquests efectes [88].

Al llarg del temps, han sorgit diverses hipòtesis explicatives de la relació de la DA amb el reforç i amb processos d'atenció, aprenentatge i memòria. Inicialment, es creia que els sistemes dopaminèrgics intervenien de manera directa en el plaer produït per reforçadors primaris com el menjar, el sexe, les drogues i els reforçadors condicionats [89–91]. Altres autors van hipotetitzar que l'alliberament de DA al *shell* del NAcc produïda per reforçadors naturals depenia d'un aprenentatge d'habitució, en canvi, les drogues d'abús provocarien un alliberament de DA constant i impermeable a l'efecte d'habitució. Això produiria una associació entre el reforç i els estímuls relacionats amb la droga mantenint la conducta de *craving* i l'addicció [92]. També es va veure un impacte de les condicions ambientals sobre els efectes dels reforçadors [93], certes condicions ambientals podrien produir canvis en el sistema de la DA en subjectes que presenten dominància social i aquests canvis estarien associats a diferències en la vulnerabilitat dels subjectes als efectes del reforç [94].

Les hipòtesis actuals apunten a una relació de l'alliberament de DA amb l'error de predicció del reforç, és a dir, els individus poden fer representacions neurals que els permetin esperar recompenses d'acord amb l'experiència prèvia i adaptar la conducta en relació a aquesta experiència quan apareix el reforç [95, 96]. Les neurones



dopaminèrgiques podrien detectar errors en la predicció del reforç, assenyalant que una conseqüència apetitiva pot ser diferent a l'esperada en un moment donat [97]. Es produiria un alliberament de DA quan el subjecte fa un error de predicció positiu, una depressió dopaminèrgica si l'error de predicció és negatiu, mentre que un reforç que és tal com s'esperava no produiria alliberant [98–101]. No obstant, aquesta hipòtesi no és tancada ni definitiva, ja que els estímuls considerats salients o que són nous per un individu en concret, també serien una variable a tenir en compte per avaluar l'activitat dopaminèrgica cerebral.

Com hem vist, la DA és un neurotransmissor crític pels efectes reforçants de l'AEIC, però diversos estudis dels anys 90 van trobar evidències de la implicació d'altres sistemes de neurotransmissió en els efectes reforçants d'aquest tractament, com és el glutamatèrgic [102]. El glutamat es relaciona amb processos de reforç cerebral [103–105], per exemple, l'AEIC de l'HL incrementaria els nivells de glutamat a l'ATV [106], proposant les aferències glutamatèrgiques cap a l'ATV com un possible primer estadi dels efectes de l'estimulació reforçant de HL. Actualment aquesta implicació no queda clara, ja que, tal com hem indicat en el punt anterior, estudis optogenètics contradiuen aquest punt [77].

Per altra banda, s'ha pogut delimitar una població homogènia de neurones gabaèrgiques al FPM que presenten períodes refractaris que entren dins del rang determinat per les fibres directament estimulades per l'AEIC en aquest feix [107, 108]. També s'ha vist que l'AEIC del FPM incrementa l'expressió de la proteïna c-Fos en diferents grups de cèl·lules gabaèrgiques del tronc de l'encèfal [109, 110]. Per tant, les neurones gabaèrgiques del FPM es trobarien situades en una posició crítica per modular l'activitat de les neurones dopaminèrgiques implicades en el reforç [111].

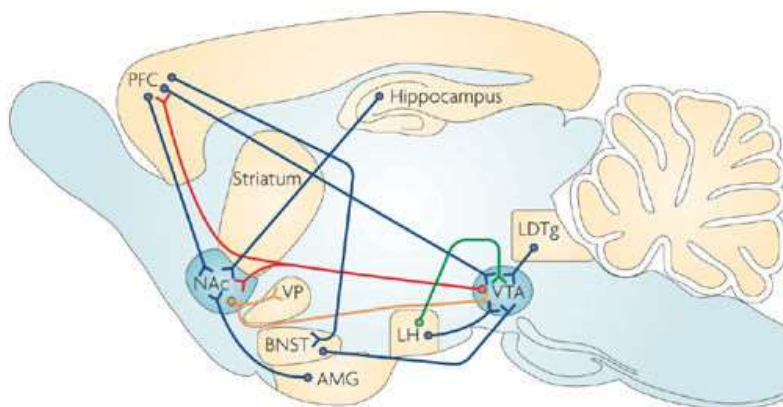
L'acetilcolina (ACh) també és un neurotransmissor relacionat amb els efectes reforçants de l'AEIC del FPM [112–114]. Diversos treballs han mostrat que la infusió d'antagonistes colinèrgics a l'ATV [113, 115] i a l'HL [116], i la infusió d'agonistes colinèrgics al nucli tegmental pedunculopontí (on els receptors muscarínics són inhibitoris) [112], inhibeix o bloqueja els efectes reforçants de l'AEIC.

Les orexines són neuropèptids amb dues possibles formes moleculars, orexina-A i orexina-B, sintetitzades per neurones de l'hipotàlem i que també es consideren implicades en el reforç. Les fibres orexinèrgiques projecten des de l'HL cap a l'ATV [117, 118] i a l'ATV innerven neurones dopaminèrgiques i no dopaminèrgiques [119].

Una de les tècniques usades per estudiar la participació de l'orexina-A en el reforç ha estat l'AEIC. Per exemple, si una droga és capaç de potenciar els efectes reforçants de l'AEIC, la seva administració disminuiria el llindar d'estimulació. No obstant, els resultats

dels estudis d'AEIC implicant les orexines són escassos i contradictoris. Mentre que l'administració directa o intracerebroventricular d'orexina-A a l'ATV mostra un increments del llindar de l'AEIC [120], sembla que l'administració intra-insular o intraperitoneal no n'afectaria el llindar ni la ratio [121, 122]. Per altra banda, els estudis d'AEIC també han permès estudiar altres sistemes que podrien involucrar el sistema orexinèrgic en el reforç. Concretament, l'increment del llindar provocat per la infusió d'orexina-A es pot inhibir amb l'administració d'un antagonista del factor alliberador de corticotropina [120] suggerint que els efectes de l'orexina-A en el llindar d'AEIC estarien relacionats amb el processament de l'estrès. A més, l'orexina-A també pot contrarestar els efectes antireforçants sobre l'AEIC de l'HL produïts per la dinorfina, un neuropèptid que és alliberat a l'ATV junt amb l'orexina-A [123].

La figura 3 mostra les principals projeccions cap al NAcc i l'ATV i els diferents neurotransmissors implicats.



**Fig. 3 Esquema simplificat del sistema mesolímbic dopaminèrgic del cervell de la rata.** Es mostren les principals entrades cap al NAcc i l'ATV. Projeccions dopaminèrgiques (vermell); glutamatèrgiques (blau); gabaèrgiques (taronja) i orexinèrgiques (verd). Abreviatures: AMG, amígdala; BNST, nucli del lit de l'estria terminal; LDTg, nucli tegmental laterodorsal; LH, hipotàlem lateral; PFC, còrtex prefrontal; VP, pàl·lid ventral.

Finalment, també s'ha trobat certa implicació dels opiacis en l'efecte de l'AEIC. Phillips i LePiane [124, 125] van trobar que l'administració directa de morfina o de metencefalina en varies localitzacions al llarg del FPM era molt reforçant per sí mateixa i s'ha vist que l'AEIC del FPM proporciona una línia base conductual estable per avaluar la dependència a la morfina i a substàncies opiàcies relacionades [58]. Estudis més actuals també han mostrat la influència de la morfina en la conducta d'AEIC [126]. A més, l'efecte reforçant de l'AEIC de l'HL produït per l'administració d'agonistes dopaminèrgics pot ser potenciat per la coadministració de morfina [127] i aquest efecte mostrat per

l'administració d'opiacis pot ser revertit mitjançant l'administració dels seus antagonistes [128].

## **2. AEIC I APRENTATGE I MEMÒRIA**

### **2.1 FACILITACIÓ DE L'APRENTATGE I LA MEMÒRIA**

El fenomen de l'AEIC en rates ha estat estudiat àmpliament i diversos treballs han mostrat de manera consistent que aquesta estimulació reforçant és capaç de facilitar processos d'aprenentatge i memòria. Els primers estudis en aquest sentit van ser els de Routtenberg [129–131], mostrant que tant l'estimulació com la lesió de la major part de les localitzacions on es pot generar la conducta d'AEIC era capaç de modular els processos d'adquisició i retenció de l'aprenentatge. Estudis del nostre laboratori i altres, també han trobat que l'estimulació elèctrica reforçant del cervell és capaç de facilitar de manera consistent tant l'adquisició com la retenció de la memòria en diferents paradigmes experimentals, tant de memòria implícita [5, 6, 64, 132–134] com de memòria explícita [7, 9, 11]. La interacció funcional entre el substrat nerviós del reforç i els processos de consolidació de la memòria depenen de diferents variables que poden modificar l'efecte de l'AEIC, com són 1) el tipus de tasca d'aprenentatge, 2) les característiques i paràmetres del corrent elèctric administrat, 3) el moment d'administració del tractament i 4) el tipus d'administració (*autoadministrada* o *per administració remota*).

Donat que per respondre a l'objectiu general d'apropar el model animal de facilitació de la memòria per AEIC al tractament de DBS emprat a la clínica, en els experiments que componen la present tesi doctoral es modifiquen algunes d'aquestes variables, en els següents apartats es tracta amb major detall cadascuna d'elles.

#### **2.1.1 Tipus de tasca**

Els efectes facilitadors de l'aprenentatge i la memòria produïts per l'AEIC del FPM han estat avaluats en una gran diversitat de tasques d'aprenentatge i, com veurem a l'apartat 2.1.3, depenen del moment d'administració del tractament [135, 136] així com de la dificultat de la tasca.

Pel que fa a les tasques de memòria implícita, experiments previs del nostre laboratori ens han permès constatar que l'AEIC de l'HL és capaç de facilitar l'adquisició d'una tasca d'EV2. Aquests efectes s'han vist tant en l'adquisició [12, 137] com en la retenció a curt termini [6, 38, 64] i a llarg termini [6, 12, 137], a més de facilitar la reconsolidació de la memòria quan l'AEIC s'administrava immediatament després de la reactivació de la mateixa [136]. La tasca de DVS, que implica un aprenentatge associatiu implícit,

també s'ha vist facilitada per l'AEIC en els estudis de Garcia-Brito i col·laboradors, de forma que els animals que havien rebut el tractament cometien menys errors i presentaven millor retenció de la tasca de DVS al LAM que els controls [27].

Pel que fa a les tasques de memòria explícita, l'aplicació de l'AEIC també ha permès facilitar l'adquisició i retenció de diferents tasques de tipus espacial com són la prova d'alternança espacial retardada al laberint en T [7, 8] i la tasca d'aprenentatge espacial al LAM [9, 11].

L'AEIC també ha estat capaç de facilitar el *reversal* espacial o aprenentatge invertit. El *reversal* permet avaluar si els animals poden modificar un aprenentatge inicial per adaptar-lo a unes noves condicions; per tant, és una forma d'avaluar la flexibilitat cognitiva. En el cas del LAM, les sessions de *reversal* posteriors a l'adquisició de l'aprenentatge es basen en reubicar la plataforma en un altre quadrant del laberint (normalment l'oposat), de forma que els animals han d'usar les estratègies al·locèntriques desenvolupades per tal de trobar la nova ubicació de la plataforma [138]. Estudis previs del nostre laboratori han posat de manifest que l'AEIC pot facilitar el *reversal* en tasques espacials de memòria explícita al LAM [10] i al laberint en T [7], però que té efectes contraris en una tasca implícita de DVS, on el tractament d'AEIC hauria facilitat l'adquisició inicial i dificultat la nova adquisició quan la contingència entre els estímuls s'havia canviat [27].

## **2.1.2 Característiques del corrent elèctric estimulant**

### **a) Tipus d'ona**

El tipus d'ona aplicada per estimular elèctricament el cervell dels animals és una variable a tenir en compte. A la clínica d'humans s'han provat diferents tipus d'ona elèctrica (Fig.4a), però la que s'aplica més habitualment és l'ona quadrada (Fig.4b), resultant de modificar una ona sinusoidal verdadera. Sol ser una ona de gran amplitud, amb una fase d'estimulació de curta durada, seguida d'una fase de recàrrega de baixa amplitud i llarga durada. Aquesta configuració d'ona ha mostrat ser efectiva per pal·liar diversos problemes motors [14, 139, 140], psiquiàtrics [141] i neurològics [142]. El principal criteri per triar un tipus d'ona o els seus paràmetres és la seva capacitat per generar una resposta neural (potencials d'acció i alliberament de neurotransmissors) minimitzant el risc de produir danys en els teixits circumdants al lloc d'implantació de l'elèctrode [143].

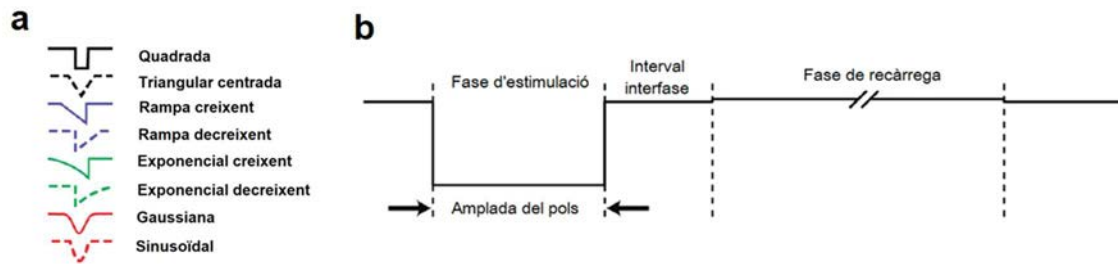


Fig. 4 **Formes d'ona per estimulació cerebral.** (a) Diferents tipus d'ona provades en estudis de DBS, (b) Model d'ona rectangular on s'indiquen les diferents fases de l'estímul. El pols d'estimulació va seguir d'un interval interfase de corrent 0 i de 0.1ms de durada, seguida d'una fase de recàrrega de 5ms. (Adaptat de Foutz & McIntyre, 2010)

En els primers estudis d'estimulació elèctrica cerebral en animals, el tipus d'ona elèctrica que s'usava era sinusoidal pura no modificada [1, 3, 4, 83, 130–132, 144] i en el nostre laboratori hem seguit aplicant estimulació elèctrica cerebral amb aquest tipus d'ona perquè s'ha mostrat efectiva tant per a generar la conducta d'AEIC de forma persistent com per a facilitar la memòria [5, 6, 11, 12, 27, 64, 136], sense danys colaterals o lesions del teixit cerebral.

El corrent d'ona sinusoidal presenta avantatges respecte de l'ona quadrada. En una simulació de *patch-clamp* de membrana es va veure que la forma sinusoidal requeria menys energia que l'ona quadrada, depenent de l'amplada del pols d'estimulació [24]. En un estudi comparatiu de diferents tipus d'ona es va trobar que les formes d'ona òptimes eren la triangular, Gaussiana i sinusoidal, indicant que els components d'alta freqüència de l'estímul eren menys eficients per excitar les neurones que els de baixa freqüència. A més, l'ona sinusoidal va tornar a mostrar un requeriment menor d'energia que la resta de formes estudiades [145]. Per altra banda, el corrent d'ona quadrada suposa una estimulació elèctrica sostinguda en el temps, a mida que s'incrementa la durada del pols el corrent s'expandeix i pot augmentar el risc d'efectes adversos com estereotípies i/o convulsions, aquest risc és menor amb corrent d'ona sinusoidal.

No obstant al llarg del temps l'ona sinusoidal va anar perdent protagonisme i es van començar a provar altres tipus d'ona, considerant 1) la seva capacitat selectiva per activar solament una àrea o conjunt de neurones objectiu, 2) la seva eficiència i eficàcia, 3) els efectes secundaris que pogués produir i 4) els efectes en la millora de l'aprenentatge i la memòria.

El corrent elèctric amb ona quadrada tant en animals com en humans permet un major control de la durada del pols i del tren, així com de la quantitat d'estimulació. Estudis paramètrics han trobat que els polsos de curta durada incrementaven la selectivitat espacial de l'estimulació [146], augmentant alhora l'efectivitat de la DBS [24]. Addicionalment, aplicar determinats paràmetres d'estimulació permet reduir els efectes

secundaris de la DBS [143]. Al nostre laboratori també hem provat el corrent amb ona quadrada per aplicar l'AEIC al nucli basal de Meynert (polsos monofàsics de 0.5ms de durada amb trens de 500ms de durada i 1Hz de freqüència) [147] i a l'HL (polsos monofàsics de 20ms de durada amb trens de 300ms de durada i 50Hz de freqüència) [9], mostrant certs efectes facilitadors de la memòria. En un treball no publicat on estudiàvem l'efecte d'un bloquejador de les orexines sobre la conducta d'AEIC, vam utilitzar corrent d'ona quadrada amb polsos bifàsics de 0.1ms amb trens de 300ms de durada i 100Hz de freqüència per a obtenir l'AEIC [148]. En aquells experiments vam observar una conducta d'AEIC qualitativament diferent a la produïda pel corrent d'ona sinusoidal; els subjectes mostraven una resposta monòtona possiblement deguda a un nivell menor de motivació o de l'activació d'altres vies del reforç. Malgrat tot, tenim poques evidències de facilitació de la memòria per AEIC amb corrent d'ona quadrada i dels efectes diferencials sobre la conducta produïts pels diferents tipus d'ona [9].

#### **b) Quantitat de trens i intensitat del corrent**

La quantitat de trens administrats sembla ser també un paràmetre important en la facilitació de l'adquisició i la retenció de l'aprenentatge per AEIC. Un mínim de 30 trens serien suficients per obtenir efectes, tal com va mostrar un estudi de facilitació de la retenció per AEIC [149], on es van veure efectes facilitadors amb una AEIC de 30s de durada equivalent a 30 trens d'AEIC. Així mateix, una AEIC de l'HL de 30s aplicada després dels assaigs d'evitació es va mostrar efectiva per facilitar la retenció de l'aprenentatge [135]. També es va trobar una correlació positiva i estadísticament significativa entre la quantitat de trens i el nivell de facilitació assolit. Concretament, la facilitació més potent s'observava en tractaments de 2500 trens al 100% de la intensitat òptima d'estimulació per cada subjecte, essent necessari un nivell mínim d'estimulació de 500 trens per poder obtenir efectes facilitadors. Al 80% de la intensitat òptima del subjecte calien 2500 i 4500 trens per poder obtenir efectes facilitadors sobre l'adquisició del condicionament d'EV2 [150, 151]. En un estudi en que es quantificava l'administració per temps i no per nombre d'estímuls es van trobar efectes de facilitació de l'aprenentatge i la retenció amb un tractament d'AEIC de 15 minuts diaris [152].

La intensitat del corrent elèctric també és una variable important, però, degut a què la intensitat necessària per obtenir la conducta d'AEIC depèn d'altres variables com el tipus i la freqüència de l'ona, és difícil delimitar de manera general quines són les intensitats òptimes. Els rangs d'intensitat que s'han mostrat efectives per facilitar tasques d'aprenentatge i memòria amb corrent d'ona sinusoidal poden anar des de 10 $\mu$ A [153] a 350 $\mu$ A [136], depenent també del diàmetre de l'elèctrode. En un estudi paramètric

d'estimulació elèctrica cerebral per facilitar la memòria en un model animal de demència [154] es va trobar que els millors efectes es trobaven en unes intensitats entre 100 i 200 $\mu$ A. En canvi, amb una intensitat de 500 $\mu$ A ja es trobava empitjorament de l'adquisició de la memòria i cap efecte sobre la consolidació i recuperació, a més d'una reducció en l'activació neuronal al GD de l'HPC.

### **c) Freqüència i durada del pols**

En estudis amb animals s'han provat diverses freqüències per trobar aquelles que permetessin facilitar la memòria; per exemple, Lee i col·laboradors van trobar que una estimulació de baixa freqüència (7.7Hz) sobre el septum medial millorava la memòria espacial en animals amb dany cerebral per traumatisme cranioencefàlic, mentre que una estimulació d'alta freqüència (100Hz) no millorava el rendiment [155]. En canvi, un estudi més recent on es van realitzar proves amb diferents freqüències (10, 60 i 130Hz) va mostrar millores en la memòria espacial a una freqüència de 60Hz [28]. La majoria dels estudis del nostre laboratori han trobat efectes de facilitació de la memòria estimulants l'HL a una freqüència de 50Hz [5, 6, 11, 27, 133]. Estudis més recents, amb ratolins com a model animal d'Alzheimer, han trobat efectes positius sobre la memòria amb una freqüència alta de 130Hz [156, 157] estimulants el còrtex entorrinal. En rates, models de dany cerebral traumàtic han permès millorar els símptomes d'aprenentatge i memòria amb una estimulació de 200Hz aplicada al fòrnix [158]. Aquests resultats aparentment contradictoris semblen indicar que els efectes de la DBS no depenen d'un únic factor si no que podrien dependre de la interacció de diversos factors, tant dels paràmetres del corrent elèctric i l'ona, com de l'àrea estimulada i/o de l'espècie de destí. La durada del pols implica una estimulació més o menys sostinguda al llarg del temps. En els primers estudis d'estimulació elèctrica, l'amplada dels polsos d'ona quadrada es trobaven en un rang entre 0.5 i 2ms. Posteriorment es va poder constatar que l'amplada òptima de la despolarització neuronal es troba entre 0.1 i 0.2ms [159, 160]. Polsos excessivament amples podien no ser eficients, aplicant la major part de l'energia durant el període refractari posterior a la despolarització. El canvi progressiu d'ús de l'ona sinusoidal cap a ona quadrada a una freqüència de 60Hz, amb polsos quadrats breus (0.1 ò 0.2ms de durada) va suposar una reducció molt important en els efectes adversos de l'estimulació [161, 162]. Així, un estudi recent en pacients amb depressió major on es feia una comparació entre polsos de 0.3ms i de 1.5ms va mostrar que la disminució en la durada del pols reduïa significativament els efectes cognitius adversos i preservava l'eficàcia de l'estimulació [163].

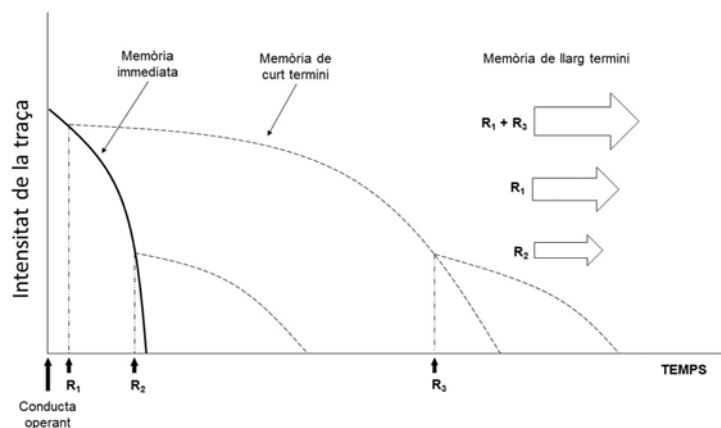
### 2.1.3 Moment d'administració

El moment en què s'administra el tractament respecte al procés cognitiu en curs afecta aquest procés, de manera similar al que s'ha observat amb altres tractament moduladors de la memòria [164].

#### a) Contingent

##### Administració post-entrenament

Els primers estudis de Huston i col·laboradors [134, 135] sobre facilitació de la memòria per estimulació reforçant del cervell ja van mostrar les propietats d'aquesta estimulació quan s'aplicava immediatament post-entrenament. Segons la teoria del reforçament de Huston (Fig.5) una resposta operant deixa una traça de memòria immediata. Un reforçador aplicat durant aquest període prolongarà aquesta traça fins a establir una memòria de curt termini, i un reforçador aplicat durant el període làbil de la memòria de curt termini podria facilitar la memòria de llarg termini.



**Fig. 5 Representació gràfica de la teoria del reforçament de Huston.** (R<sub>1</sub>) Estímul reforçant aplicat a l'inici de la fase de memòria immediata i just abans d'iniciar-se la formació de la memòria de curt termini. (R<sub>2</sub>) Estímul reforçant aplicat poc abans de desaparèixer la memòria immediata i a l'inici de la fase de formació de la memòria de curt termini. (R<sub>3</sub>) Estímul reforçant aplicat poc abans de finalitzar la fase de formació de la memòria de curt termini i a l'inici de la formació de la memòria de llarg termini. Adaptat de Huston et al. (1977).

Actualment sabem que aquesta teoria no explica tots els efectes que l'AEIC pot tenir sobre l'aprenentatge, ja que estudis posteriors han mostrat que l'estimulació cerebral aplicada 30 dies després de l'aprenentatge és capaç de facilitar la persistència de la memòria a llarg termini malgrat la no contingència entre entrenament i tractament [165]. Prenent en consideració els treballs existents, ha quedat demostrat de manera consistent que l'estimulació elèctrica del FPM a nivell de l'HL quan s'aplica post-entrenament pot facilitar tant l'adquisició com la consolidació de la memòria de diverses tasques d'aprenentatge [3, 4, 6, 7, 10, 11, 166, 167].



### **Administració pre-entrenament**

Malgrat que la major part d'experiments que han estudiat els efectes de l'AEIC per facilitar l'aprenentatge i la memòria aplicaven el tractament post-entrenament, alguns treballs també l'han aplicat prèviament a la tasca d'aprenentatge.

Al nostre laboratori s'han realitzat estudis on el tractament d'AEIC s'aplicava prèviament a l'aprenentatge i de manera contingent, l'AEIC va mostrar efectes facilitadors de l'adquisició d'un condicionament distribuït d'EV2 [132] i va mantenir la facilitació durant 10 dies amb la mateixa eficàcia que quan s'administrava post-entrenament. En canvi, Coulombe i White no van trobar cap efecte aplicant una única sessió d'AEIC immediatament abans d'un condicionament clàssic apetitiu [3]. Tot i semblar-ho, no seria precís considerar aquests resultats com a contradictoris ja que s'aplicaven dissenys experimentals diferents.

### **b) No-Contingent**

Com ja hem explicat anteriorment, en un estudi pioner d'estimulació elèctrica de l'HL es va considerar la contingència entre tractament i entrenament com una variable important per facilitar l'aprenentatge, mentre la traça de memòria es troba en un període làbil i es pot consolidar com a memòria de llarg termini [135]. L'efecte de l'estimulació elèctrica cerebral en l'aprenentatge, es va considerar que estava relacionat inversament amb la demora amb què s'administrava l'estimulació en relació a la sessió d'entrenament [3, 4, 166]. Els mateixos autors van trobar que la contingència entre estímuls o entre estímuls i respostes durant l'aprenentatge també eren rellevants per l'efecte facilitador de l'AEIC post-entrenament.

En canvi, estudis posteriors d'estimulació elèctrica de l'HL en rates van mostrar que una estimulació primerenca no-contingent amb l'entrenament millorava l'execució d'una tasca avaluada 28 dies més tard [168, 169]. Així mateix, un tractament continuat durant 10 dies prèviament a la realització d'una tasca d'aprenentatge espacial i operant, podia facilitar-ne l'adquisició [152] i inclús reduir l'efecte negatiu produït per l'estrès crònic en l'aprenentatge [170]. A més, aquest protocol de tractament continuat i no contingent produïa canvis sinàptics en diferents àrees cerebrals relacionades amb la memòria [8, 37, 170–173] que es mantenien en el temps fins a 60 dies després de finalitzar el tractament [174]. Al nostre laboratori, també hem trobat evidències que mostren com un tractament d'AEIC post-entrenament no contingent amb l'aprenentatge és capaç de facilitar el manteniment d'una memòria prèviament facilitada en una tasca de memòria implícita d'EV2 [165].

#### **2.1.4 Autoadministració (AEIC) i administració remota (DBS)**

Una altra variable important de l'estimulació elèctrica cerebral és la manera com s'administra el tractament, si és autoadministrat pel propi subjecte, com a l'AEIC, o si és administrat de manera remota per l'experimentador o altres dispositius mecànics, com a la DBS. En un estudi pioner on es van comparar aquestes dues variants d'administració es va veure que, quan l'elèctrode estava localitzat a l'HL, els dos tipus d'estimulació post-entrenament eren capaços de facilitar la retenció, però que requerien diferents quantitats de trens; 1000 trens d'AEIC i 30 de DBS. En canvi, si s'invertien les quantitats d'AEIC i DBS no hi havia facilitació [36]. Els autors van concloure que un nivell òptim d'*arousal* podria ser la clau per la facilitació, partint del fet que un animal que rep AEIC pot regular la quantitat de tractament i, per tant, el propi nivell d'*arousal*. Una altra hipòtesi explicativa que es va proposar és que ambdues variants d'administració activarien substrats neurals de reforçament diferents, amb uns requeriments diferents per ser capaços de produir canvis en el sistema nerviós i, per tant, facilitació cognitiva.

Estudis posteriors van mostrar que el tractament d'estimulació elèctrica intracranial a l'HL tant si era administrat per l'experimentador com autoadministrat [6, 27, 64, 132, 133, 135, 136, 149, 153] era capaç de facilitar l'aprenentatge i la memòria de diverses tasques d'aprenentatge. En canvi, Shankaranayana Rao i col·laboradors van trobar que l'estimulació remota administrada per l'experimentador i l'AEIC no provocaven els mateixos canvis estructurals a l'HPC [37], indicant efectes diferents de cada tractament. Així doncs, no queda clar si ambdues formes d'administració són equivalents, ja que hi ha dades contradictòries.

La taula 1 de la pàgina següent mostra un resum de treballs d'estimulació elèctrica cerebral per estudiar processos de memòria en rosegadors, des de l'any 2005 fins a l'actualitat.

## Marc teòric i antecedents experimentals

	Estructura estimulada	Espècie/ Model	Paràmetres d'estimulació	Tasca de memòria	Moment d'aplicació/ contingència	Canvis conductuals i neuronals	Referència
Autoadministrada (AEIC)	FPM (HL)	Rata	Unilateral, ona quadrada, 50Hz, trens de 0.3s, intensitats entre 50 i 250µA	Espacial: LAM	Contingent, post-entrenament	Facilitació de l'aprenentatge i la memòria espacial amb poc entrenament	Ruiz-Medina et al. (2008)
	FPM (HL)	Rata	Unilateral, ona sinusoidal, 50 Hz, trens de 0.3s, intensitats entre 10 i 250µA	Espacial: Radial maze, T maze	Contingent, post-entrenament	Facilitació de l'expressió flexible de la resposta al·locèntrica	Soriano-Mas et al. (2005)
Administració remota (DBS)	FPM	Rata (model de Depressió major)	Bilateral, 130Hz, polsos de 100µs, 250µA de mitjana, continu durant 10d	Espacial: laberint aquàtic en doble H	Pre-adquisició, no contingent	Modulació del reforç, la motivació i els sistemes de memòria	Thiele et al. (2018)
	CA1 (HPC)	Rata	Bilateral, 20-100Hz, i 100µs d'amplada del pols, trens de 1.5-3s	Espacial: delayed-nonmatched-to-sample	En l'adquisició	Memòria espacial	Berger et al. (2011)
	Sèptum medial	Rata (model de dany cerebral traumàtic)	Unilateral, 7.7Hz, 1.0ms amplada del pols, trens de 3 segons, 80µA d'intensitat	Espacial: laberint de Barnes	Pre-adquisició, contingent. 1 minut abans de l'adquisició	Memòria de treball espacial. Increment de la força theta hipocampal	Lee et al. (2015)
	Sèptum medial	Rata	Unilateral, 60Hz, polsos de 120 µs, 100µA d'intensitat	Espacial: LAM	Pre-adquisició, no contingent, contingent post-adquisició, contingent pre-test	Increment de BDNF i millora de la memòria espacial en el grup pre-adquisició. Neurogènesi hipocampal.	Jeong et al. (2017)
	Escorça entorrinal	Ratolí	Bilateral, 130Hz, 90µs d'amplada del pols, 50µA d'intensitat	Espacial: LAM	Durant l'adquisició	Memòria espacial. Neurogènesi hipocampal	Stone et al., (2011)
	Fibres septohipocampals	Rata	Unilateral, 7.7Hz, polsos de 500µs d'amplada	Espacial: LAM	Durant l'adquisició i retenció	Memòria espacial. Es recuperen ritmes theta hipocampals	McNaughton et al. (2006)
	Fòrnix	Rata	Bilateral, 100Hz, polsos de 100µs, 100µA d'intensitat, durant 4 hores	Espacial: LAM	Pre-adquisició no contingent	Millora de la memòria espacial independent de la neurogènesi	Hescham et al. (2017)
Nucli anterior del tàlem	Rata	Bilateral, 130Hz, 90µs d'amplada del pols, continu durant 1 hora	Espacial: delayed-nonmatched-to-sample	Pre-adquisició no contingent	Memòria espacial. Neurogènesi hipocampal	Hamani et al. (2011)	

**Taula 1** Resum de publicacions que han usat la DBS per facilitar la memòria en rosegadors. La taula s'ordena segons la manera en que s'administra el tractament i l'àrea estimulada, a la part superior les àrees relacionades amb el reforç i a continuació les relacionades amb la memòria i estructures de connexió. Inclou l'espècie i/o model utilitzat, si l'estimulació és bilateral o unilateral i el tipus d'ona aplicada (en el cas dels tractaments per estimulació remota tots els treballs s'han realitzat amb corrent d'ona quadrada). Els paràmetres d'estimulació: durada del tractament, amplitud del corrent, freqüència d'estimulació, amplada del pols, durada dels trens també s'inclouen si la publicació ho especifica. Així com el tipus de tasca de memòria, a quina fase de l'estudi s'aplica l'estimulació i quins efectes conductuals i neuronals s'observen.

## 2.2 MECANISMES IMPLICATS

Diverses evidències experimentals demostren que l'AEIC del FPM té la capacitat d'activar diferents sistemes i àrees cerebrals associades a processos d'aprenentatge i memòria, a més, sabem que el SNR està relacionat amb els sistemes d'activació general. Partint d'aquestes premisses, alguns autors han suggerit que un factor important per la modulació de la memòria a través de l'AEIC podria ser l'increment de l'activació general del sistema nerviós (*arousal*) durant el període de processament de la informació [153, 175, 176] i, en especial, de regions de diferents sistemes de memòria. Per conèixer més a fons aquesta relació entre reforç i memòria s'han fet estudis a nivell molecular que passarem a detallar a continuació, descrivint en primer lloc els sistemes activats per l'AEIC i a continuació alguns dels mecanismes moleculars que podrien estar implicats en el seu efecte potenciador sobre els processos d'aprenentatge i memòria.

### 2.2.1. Sistemes neuroanatòmics activats per l'AEIC

*c-Fos* és un proto-oncogen que pertany a un grup de gens d'expressió primerenca. S'expressa en algunes neurones un cop s'han despolaritzat i el producte resultant de la seva expressió és la proteïna *c-Fos*, que es pot identificar mitjançant tècniques immunohistoquímiques i permet inferir si les neurones han estat actives [177]. *c-Fos* també està relacionat amb la plasticitat sinàptica i els processos de consolidació de la memòria en zones relacionades amb la memòria com l'HPC i l'amígdala. Diversos estudis han mostrat la capacitat de l'AEIC per incrementar l'expressió de *c-Fos* [34, 35, 39, 178].

Estudis pioners en l'anàlisi de l'expressió de la proteïna *c-Fos*, produïda per l'AEIC del FPM, van trobar que l'estimulació reforçant del FPM a l'alçada de l'HL incrementava l'immunoreactivitat en diverses àrees com són: l'àrea preòptica (principalment la zona lateral), el sèptum lateral i amb menor mesura el septum medial, el nucli del llit de l'estria terminal, el rafe dorsal, els nuclis parabraqiuals, l'ATV i l'amígdala central i basolateral [179–181]. Aquestes àrees ja havien estat detectades per autoradiografia, però amb immunohistoquímica es van poder detectar altres àrees també activades per l'AEIC, principalment la substància innominada, el NAcc, el pàl·lid ventral i diversos nuclis hipotalàmics i estructures del tronc de l'encèfal. Aquests resultats van ser confirmats parcialment en estudis posteriors [178, 182]. Arvanitogiannis i col·laboradors van trobar que l'estimulació del còrtex prefrontal (CPF) podia produir efectes similars a l'activació del FPM; així, van trobar activació en neurones del còrtex prelímbic i cingulat, al NAcc, àrea preòptica lateral, substància innominada, HL i ATV anterior [183]. Addicionalment,

l'AEIC s'ha mostrat capaç de produir inducció de l'expressió de c-Fos en àrees relacionades amb la memòria espacial hipocamp-dependent, com són CA3, la capa granular del GD [35] i el còrtex retrosplenial [39]; així com a l'amígdala [38], àrea relacionada amb memòria emocional. Per tant, sembla ser que l'administració d'AEIC al FPM pot activar gran quantitat de regions cerebrals que realitzen funcions diverses.

### 2.2.2. Expressió gènica

Els gens d'expressió primerenca són un component important de la cascada molecular relacionada amb la plasticitat sinàptica i la formació de la memòria a llarg termini. Com ja hem indicat a l'apartat anterior, l'AEIC de l'HL és capaç d'estimular l'expressió del gen d'expressió primerenca *c-Fos* en neurones de diverses àrees cerebrals. Altres estudis també han trobat que l'AEIC del FPM a l'HL pot activar l'expressió de *Nurr1*, un altre d'aquest tipus de gens que, al mateix temps, és un factor de transcripció d'altres gens relacionats amb aprenentatge i memòria [38]. *Arc*, un gen efector d'expressió primerenca i relacionat amb la dinàmica de polimerització de la proteïna actina, és considerat com un marcador de processos de plasticitat sinàptica durant la consolidació de la memòria [184]. L'expressió d'aquest gen també es va veure activada per l'AEIC de l'HL a CA1 i al GD de l'HPC [185] i al *stratum oriens* i el *radiatum* de l'àrea CA1 [178]. Aquesta expressió es dona especialment a les regions per on s'estén l'arborització dendrítica de les neurones piramidals a CA1, podent contribuir als canvis morfològics observats en estudis posteriors [11] i considerant-se molt rellevant en processos de plasticitat associats a l'aprenentatge i la memòria [173, 186].

Al treball d'Huguet i col·laboradors, on es mostrava que l'AEIC podia induir l'expressió de c-Fos a l'HPC, es va realitzar una anàlisi de *microarrays* amb posterior comprovació per PCR (de l'anglès *polymerase chain reaction*) per estudiar l'efecte de l'AEIC en l'expressió gènica a l'HPC i es va trobar que l'AEIC modulava l'expressió de 62 gens de l'HPC passats 30 minuts [35]. Gran part de les proteïnes codificades per aquests gens, com per exemple la *Pde1a*, formen part dels senyals de transducció intracel·lular; mentre altres com ara la *Hspa1a* estan relacionades amb l'anti-apoptosi. Deu d'aquests gens han estat prèviament relacionats amb la memòria o la plasticitat neural, incloent *CART*, *Adcyap1*, *Sgk*, *Ret* i *Fos*.

Aquest conjunt de resultats reforcen la hipòtesi que l'AEIC, en les mateixes condicions i paràmetres que els usats per facilitar la memòria, modula l'expressió a l'HPC d'un conjunt de gens implicats en vies de senyalització intracel·lular i relacionats amb aprenentatge i memòria. A més, també s'ha comprovat que el mateix tractament d'AEIC

pot modular alguns mecanismes de plasticitat sinàptica a llarg termini, com explicarem a continuació.

### 2.2.3. Neuroadaptacions i plasticitat sinàptica

L'*arousal* produït per l'AEIC del FPM sembla ser capaç de produir canvis morfològic a llarg termini en les neurones. L'arborització de neurones del CPF, de CA3 i del còrtex motor [8, 170–172] s'ha vist incrementada en animals sotmesos a AEIC. A més, s'han pogut constatar augments en la longitud de les dendrites [187] i en el nombre d'excrecències de les dendrites apicals de CA3, possiblement degut a una facilitació de la transmissió sinàptica a la via de les fibres molsoses [173, 174] de l'HPC. Aquests mateixos autor suggereixen que els canvis morfològics en les neurones piramidals de CA3 podrien estar relacionats amb l'experiència d'aprenentatge associada a l'AEIC, augmentant la capacitat cognitiva i atencional dels animals [8, 152, 170]. Per tant, es van proposar aquestes neurones de CA3 com el principal substrat per la modificació sinàptica associada a la plasticitat de l'HPC [186] i es creu que aquests canvis podrien ser deguts a la inducció de potenciació de llarg termini provocada pel tractament d'AEIC, mantenint-se fins a 60 dies després de finalitzar el tractament [174]. Estudis recents del nostre laboratori han mostrat que l'AEIC post-entrenament no només facilitava l'aprenentatge i la memòria en una tasca de memòria espacial al LAM sinó que addicionalment incrementava la mida i complexitat de l'arborització dendrítica de l'àrea CA1 de l'HPC [11], afegint les neurones d'aquesta àrea de l'HPC com a potencial substrat de l'efecte de l'AEIC sobre l'aprenentatge i la memòria. A més, es va trobar un increment en les fibres molsoses de l'àrea *stratum oriens* de CA2 i CA3 promogut per l'AEIC en una tasca de memòria implícita [188]. En conclusió, l'AEIC sembla capaç de produir canvis estructurals a zones relacionades amb la memòria, que perduren a llarg termini.

### 2.2.4. Neurogènesi

Els efectes de l'AEIC en la modulació de l'expressió gènica i la plasticitat sinàptica no són els únics observats en estudis d'estimulació del FPM. S'han trobat evidències que el tractament amb AEIC pot produir un increment en els nivells de NG al GD de l'HPC. En un estudi en què s'administrava una hora d'AEIC al FPM durant 3 dies consecutius, es va observar un augment significatiu del nombre de cèl·lules del GD [34]. A més, eren neurones que maduraven i posteriorment s'integraven en circuits funcionals, intervenint en els processos relacionats amb l'adquisició d'un aprenentatge espacial al LAM. S'han trobat resultats similars amb estimulació elèctrica aplicada per l'experimentador en altres

regions cerebrals, com l'escorça entorrinal [189], el fòrnix [29], el nucli anterior del tàlem [190–192] i el septum medial [28, 193]. Malgrat que no es coneixen els mecanismes pels quals l'AEIC incrementa la NG, s'ha suggerit que hi ha factors neurotròfics alliberats a l'HPC que hi poden estar implicats [194].

### **3. ESTIMULACIÓ ELÈCTRICA CEREBRAL EN HUMANS: DBS**

#### **3.1 INTRODUCCIÓ**

La DBS és una tècnica que es basa en la inserció estereotàxica d'elèctrodes d'estimulació en estructures intracerebrals específiques, i consisteix en l'aplicació de polsos elèctrics per influir en l'activitat elèctrica de la zona d'implantació o àrea diana. Aquesta estimulació afecta els patrons de descàrrega neuronal de manera focalitzada en les àrees estimulades i es pot expandir cap a altres àrees més allunyades. Des que es va començar a aplicar en humans a finals dels anys 80, les opcions de la DBS crònica s'han anat incrementant per tractar trastorns del moviment com la malaltia de Parkinson, tremolor essencial i distonia [14, 142, 195, 196]. Alguns estudis han mostrat resultats esperançadors aplicant la DBS en diferents regions cerebrals en pacients que no responen als tractaments convencionals, permetent considerar-la com una modalitat de tractament potencialment efectiu per pal·liar els símptomes en trastorns neuropsiquiàtrics com és la depressió major, el TOC, l'epilèpsia del lòbul temporal o la síndrome de Tourette [197].

#### **3.2 DBS PER MODULAR CAPACITATS COGNITIVES**

Com ja hem dit anteriorment, en els seus inicis la DBS en humans s'aplicava únicament per pal·liar símptomes motors, però progressivament ha anat sorgint la preocupació pels símptomes cognitius d'aquesta malaltia. Estudis recents han provat la DBS amb diferents paràmetres per tal de millorar aquests símptomes fins ara no tractats [198, 199]. En pacients afectats de depressió major resistent al tractament farmacològic, la DBS també ha resultat ser efectiva per millorar aspectes cognitius [200] com l'atenció, l'aprenentatge, la memòria, funcions executives i percepció visual.

Un conjunt de trastorns neuropsiquiàtrics susceptibles de ser tractats amb DBS són les demències, la més prevalent és la malaltia d'Alzheimer. Actualment les teràpies farmacològiques són tractaments simptomàtics i inclouen la memantina (N-methyl-D-aspartate receptor antagonist) per Alzheimer sever i alguns inhibidors de l'ACHé per Alzheimer moderat o lleu [201]. Aquests tractaments solen tenir efectes secundaris i no són prou efectius, cosa que ha impulsat la investigació cap a teràpies no

farmacològiques com la DBS per pal·liar els dèficits cognitius causats per aquesta malaltia, principalment els dèficits de memòria.

Així, alguns estudis ja han començat a aplicar la DBS en estructures directament relacionades amb la memòria. Tant el fòrnix com l'escorça entorrinal són estructures connectades amb l'HPC. El nucli basal de Meynert té projeccions importants cap al neocòrtex incloent àrees d'associació superiors, visual primària i secundària, auditiva, i somatosensorial però també cap a l'HPC. S'han pogut constatar efectes beneficiosos quan s'aplicava la DBS al fòrnix [21, 22, 202, 203], al còrtex entorrinal [204] i al nucli basal de Meynert [205, 206]. A la taula 2 es presenta un recull d'estudis on s'ha aplicat la DBS en humans per millorar la memòria.

Estructura	Trastorn	Paràmetres d'estimulació	Tasca de memòria	Efectes	Referència
<b>Fòrnix</b>	Obesitat mòrbida n=1	Bilateral, ona quadrada, 3-5V, 130Hz i 60µs d'amplada del pols, continua durant 3 setmanes	Tests neuropsicològics de memòria explícita i implícita	Millores significatives en el test d'aprenentatge verbal Califòrnia i en el test d'aprenentatge espacial associatiu	Hamani et al. (2008)
	Malaltia d'Alzheimer n=6	Bilateral, ona quadrada, 3.0-3.5V, 130Hz, i 90µs d'amplada del pols, continu durant 12 mesos	ADAS-cog, MMSE, test de memòria explícita, verbal.	Possibles millores i/o alentiment de l'empitjorament cognitiu als 6 i 12 mesos, canvis en el metabolisme de la glucosa	Laxton et al. (2010)
	Malaltia d'Alzheimer n=1	Bilateral, ona quadrada, 2.5V, 130Hz i 210µs d'amplada del pols, continu durant 12 mesos	ADAS-cog, MMSE, test de record selectiu lliure i amb senyals. Tests de memòria explícita	Empitjorament dels resultats cognitius després de 6 mesos, als 12 mesos de DBS crònica s'estabilitzen.	Fontaine et al. (2013)
	Epilèpsia n=11	Bilateral, ona quadrada, 8mA, tren de 5 Hz, 200µs d'amplada del pols, continu durant 4 hores	MMSE, Test de memòria explícita verbal	Millora en el record verbal	Koubeissi et al. (2013)
<b>Còrtex entorrinal</b>	Epilèpsia n=7	Bilateral, ona rectangular, 0.5 a 1.5 mA, 50-130Hz i 300-450µs d'amplada del pols, cicles de 5s on i 5s off	Tasca de memòria virtual, explícita espacial	Millora de la memòria i restabliment de la fase theta	Suthana et al. (2011)
<b>Nucli basal de Meynert</b>	Demència senil en pacients tipus Alzheimer n=1	Unilateral, 3V, 50 Hz i 210µs d'amplada del pols, cicles entre 15s on i 12 minuts off al llarg del dia i de la nit, repetidament durant 9 mesos		Increment en el metabolisme de la glucosa cerebral, no hi ha efectes clínics	Turnbull et al. (1985)
	Malaltia de Parkinson n=1	NBM: bilateral, ona quadrada, 1V, 20Hz i 120µs d'amplada del pols NST: bilateral, ona quadrada, 3.5-4.2V, 130 Hz i 60µs d'amplada del pols	Tests neuropsicològics, p.e. dibuix del rellotge, subtest WAIS de memòria de treball, aprenentatge verbal auditiu, etc.	L'estimulació bilateral combinada produeix millores en l'atenció, concentració, alerta, orientació i espontaneïtat	Freund et al. (2009)
<b>Hipocamp</b>	Epilèpsia n=12	Bilateral, 4-6mA, un únic pols, 1ms d'amplada de pols	Test de reconeixement computeritzat	L'estimulació bilateral s'associa a una disminució marcada en els resultats de memòria	Lacruz et al. (2010)

*Taula 2* Recull d'estudis de DBS en humans per millorar la memòria, la taula està organitzada per estructures d'implantació. Es mostra la *n* de subjectes d'estudi, paràmetres d'estimulació, durada del tractament, tasca de memòria aplicada i l'efecte de la intervenció. NBM: nucli basal de Meynert; NST: nucli subtalàmic; ADAS-cog: Alzheimer's Disease Assessment Scale-cognitive subscale; MMSE: mini-mental state examination; WAIS: Wechsler adult intelligence scale.



### **3.3 DBS DEL FPM I ÀREES RELACIONADES**

El FPM ha estat un *target* important en estudis de DBS en diversos trastorns neuropsiquiàtrics. Donat que aquest feix està relacionat amb la conducta reforçant, també s'han estudiat els seus efectes en pacients amb trastorns de l'estat d'ànim com la depressió [207, 208], però la manca de consens en quins són els circuits implicats en aquests trastorns ha fet que les àrees estimulades per pal·liar-ne els símptomes siguin molt diverses, activant el NAcc, el còrtex cingulat, i l'estriat ventral [17, 209–212]. A continuació es descriuen les principals psicopatologies i trastorns de conducta en què l'administració de DBS al FPM i àrees associades ha resultat efectiva.

#### **3.3.1 DBS del FPM en l'addicció**

En models animals, l'estimulació del *shell* [213] del NAcc ha mostrat efectes en la reducció de símptomes associats a l'abús de substàncies. El mecanisme proposat és l'activació d'interneurons inhibidores que modulen l'activitat del *shell*. Així doncs, en assaigs clínics també s'ha contemplat la DBS com una opció terapèutica per tractar l'abús de substàncies [214, 215] i les principals regions estimulades han estat el nucli subtalàmic i el NAcc, aportant efectes beneficiosos.

#### **3.3.2 DBS del FPM en el TOC**

El TOC, caracteritzat per pensaments intrusius i accions repetitives incontrolables també ha estat tractat de manera efectiva amb DBS. Els resultats de diversos assaigs clínics en humans indiquen que la modulació dels circuits subjacents al TOC, el circuit subcortical frontal que engloba les projeccions dels còrtex cingulat anterior, orbitofrontal i dorsolateral cap al NAcc i que segueix cap al pàl·lid, la substància negra i el tàlem [216] pot produir la millora d'alguns símptomes, probablement degut a l'increment en l'alliberament de DA a l'estriat [217]. Concretament, la DBS del NAcc [218, 219] ha resultat efectiva per millorar els símptomes de pacients amb TOC, així com l'estimulació de l'estriat ventral [220] i el nucli subtalàmic [221].

#### **3.3.3 DBS del FPM en la depressió major**

La depressió major és un trastorn de l'estat d'ànim que produeix un sentiment persistent de tristesa, pèrdua d'interès i, en casos greus, ideació suïcida. En models animals de símptomes depressius, les zones *target* de la DBS han estat diverses, el CPF ventromedial [222], el còrtex prelímbic [223], l'habècula lateral [224], el NAcc [225] i l'ATV [226]. Mentre que en assaigs clínics en humans l'àrea més estimulada és el còrtex

cingulat [227], l'estimulació de l'ATV encara no s'ha provat, malgrat que en estudis en models animals ha mostrat efectes beneficiosos.

En rates, l'estimulació elèctrica de l'ATV va permetre millorar els símptomes depressius fenotípics dels animals i l'efecte es va mantenir almenys durant 4 setmanes [226]. En un estudi en què s'estimulava la branca superior del FPM van trobar efectes ràpids i crònics amb baixa intensitat d'estimulació [228] suggerint que si s'activava elèctricament el FPM s'estimulaven al mateix temps la resta de *targets* provats anteriorment i que pertanyen a la cascada molecular implicada en la malaltia.

Un símptoma típic de la depressió major és l'anhedònia i sembla ser deguda a la desregulació de la via que va del NAcc a l'ATV [229]. Estudis de DBS en ratolins van demostrar que l'activació del FPM produïa activació dels còrtex prelímbic i infralímbic, del NAcc i del tàlem dorsolateral, àrees clau implicades en el circuits neurals de la depressió major. Aquests estudis aporten dades que permetrien obrir una nova via d'investigació per tractar la depressió major mitjançant DBS del FPM. En humans s'ha aplicat la DBS al NAcc per pal·liar els símptomes de la depressió major resistent als tractaments clàssics [208, 209] i s'ha vist que el tractament pot resultar efectiu per millorar la qualitat de vida dels pacients durant un període d'un any de DBS i tenir efectes a llarg termini, fins a 4 anys [17].

Molt recentment, Park i col·laboradors han desenvolupat un protocol d'aplicació de la DBS per tractar l'anorèxia nerviosa mitjançant implantació d'elèctrodes al *shell* medial del NAcc [230], un estudi pioner no publicat de l'Hospital del Mar de Barcelona ja l'ha començat a aplicar amb èxit en alguns pacients. Aquest tractament, però, no pretén incrementar la ingesta de menjar de manera directa sinó incidir en els trastorns associats a la malaltia com són la depressió i l'ansietat.

## **4. AVALUACIÓ DE LA MEMÒRIA EXPLÍCITA**

### **4.1 INTRODUCCIÓ**

La memòria explícita o declarativa suposa emmagatzemar informació conceptual (memòria semàntica) i experiències vitals (memòria episòdica) al cervell [231]. Aquest tipus de memòria es pot adquirir en pocs assaigs i és flexible, ja que es pot expressar en diverses situacions i de maneres diferents a l'aprenentatge original. L'aprenentatge que ens permet orientar-nos en l'espai en seria un exemple.

Les principals estructures implicades en l'adquisició de la memòria explícita són el sistema hipocampal i altres estructures del lòbul temporal medial, però s'emmagatzema definitivament en diferents àrees de l'escorça cerebral constituint-se en memòries de

llarg termini. En un estudi clàssic amb neuroimatge es va veure una activació específica de l'HPC mentre el subjecte recorria els carrers en un joc de realitat virtual [232] indicant una clara participació d'aquesta àrea cerebral en la memòria explícita.

Els primers estudis en animals sobre memòria explícita es van fer en ocells, amb paradigmes d'acumulació de menjar, els animals mostraven la seva capacitat per recordar quan i on havien trobat un aliment en particular [233]. Estudis més moderns es van basar en el paradigma de preferència per la novetat [234, 235]. Altres tipus de paradigmes han permès estudiar la memòria explícita, com per exemple els estudis olfactoris d'Eichenbaum i col·laboradors [236]. També s'han usat diverses tasques de memòria en laberints radials i en T i al laberint aquàtic de Morris, aquest últim ha estat un dels més utilitzats per estudiar la memòria espacial relacional.

Com en altres malalties neurodegeneratives, en pacients amb demència tipus Alzheimer també s'ha trobat que la memòria explícita es veu afectada [237–241], principalment en els estadis inicials. Aquests coneixements han motivat l'estudi d'aquest tipus de memòria en animals per conèixer les bases neuroanatomiques i buscar tractaments efectius extrapolables a humans.

## **4.2 LABERINT AQUÀTIC DE MORRIS**

### **4.2.1 Introducció**

El laberint aquàtic de Morris (LAM) va ser dissenyat l'any 1981 per Richard G. Morris per estudiar i avaluar l'aprenentatge i la memòria espacial en rates de laboratori, i s'ha convertit en un instrument molt usat en neurociència de la conducta. Al llarg dels anys s'han fet diverses adaptacions del laberint i s'ha usat per estudiar els efectes del consum de substàncies d'abús, l'envelliment i les lesions del sistema nerviós en l'aprenentatge i la memòria en rosegadors. Tot i que el procediment bàsic és relativament simple també s'ha usat en estudis complexos de neurobiologia i neurofarmacologia de l'aprenentatge i la memòria espacial, i també en la validació de models animals de trastorns neurocognitius.

El LAM és una piscina circular de 180-200cm de diàmetre i 60-80cm d'alçada, plena d'aigua a una temperatura que oscil·la entre 18 i 27°C en funció del tipus d'animal (rates o ratolins). A l'interior de la piscina s'ubica una plataforma submergida perquè l'animal la localitzi i pugui fugir. Per localitzar-la, el subjecte disposa de senyals contextuais o punts de referència. Els senyals contextuais poden ser molt variats, objectes o petites llums properes a la plataforma, conjunts d'objectes ubicats al voltant de la circumferència de la piscina [242, 243]; i en la majoria dels experiments, altres objectes localitzats a l'habitació on es troba la plataforma.

La proximitat del senyal a la plataforma és un factor important a tenir en compte a l'hora de dissenyar el procediment experimental, sobretot per evitar possibles fenòmens d'emascament quan es treballa amb més d'un senyal contextual.

El LAM pot també usar-se com a tasca no espacial. En el procediment no espacial més típic la plataforma és visible i pot portar un senyal acoblat, de manera que els animals resolen la tasca sense fer ús, necessàriament, de la informació que l'entorn els proporciona. Aquest procediment s'usa principalment per estudiar dèficits visuals provocats per substàncies, o per detectar variables confusióistes que poden afectar al laberint clàssic [244].

#### 4.2.2 Procediment estàndard

El protocol d'entrenament bàsic és el de memòria espacial relacional, amb una plataforma submergida en una ubicació fixa respecte dels senyals contextuais de la sala. En els assaigs d'aprenentatge s'introdueix l'animal a l'aigua de cara a la paret de la piscina des de diferents punts d'entrada Nord (N), Sud (S), Est (E) i Oest (O). Per sobre i al centre de la piscina es troba una càmera de vídeo de circuit tancat connectada a un ordinador amb software específic [245, 246]. Progressivament s'observen latències de fugida més baixes i trajectòries més directes cap a la plataforma. La majoria d'estudis conductuals s'estructuren en tres fases d'aprenentatge: habituació al laberint, adquisició i retenció de la resposta.

A la fase d'**habituació** s'introdueix l'animal a la piscina i se'l deixa nedar lliurement durant 60-120s. S'executen així un o diversos assaigs amb la plataforma en posició submergida però sense els senyals contextuais presents. Així els animals es familiaritzen amb la situació experimental i es poden pal·liar els efectes dels estímuls nous en les respostes emocionals [247]. En finalitzar l'assaig, l'animal és guiat manualment cap a la plataforma submergida on se'l manté durant 15-30s.

A la fase d'**adquisició** s'introdueix l'animal a l'aigua de la mateixa manera que en l'habituació i se'l deixa nedar lliurement durant uns 60-120s perquè busqui la plataforma. En aquests assaigs els senyals que li permeten orientar-se en l'espai hi són presents. Es considera que el subjecte ha trobat la plataforma quan es manté a sobre de la plataforma durant 5 ò 10s. En el cas de no trobar-la, l'animal és guiat manualment per l'experimentador cap a la plataforma, se l'ajuda a pujar si no ho fa per si sol i se'l manté allà durant 15-30s. A continuació, es retira l'animal de la plataforma i se'l deixa descansar uns minuts a la seva gàbia habitual abans d'iniciar el següent assaig. Habitualment, es deixa un interval entre assaigs de 90-120s de durada per descansar. Aquest procediment es repeteix en els diferents assaigs i sessions d'entrenament. La

capacitat de l'animal per trobar la plataforma depèn de l'ús que fa dels senyals que envolten la piscina.

Després d'aquesta fase d'adquisició, que pot durar diversos dies, es fa un **test de retenció** en el qual es retira la plataforma de la piscina. Es sol fer entre 24 i 72h després de l'adquisició i consta d'un únic assaig on es permet nedar a l'animal, habitualment durant 60s i s'enregistren diferents variables. Es considera una prova de preferència espacial en la qual, si l'animal ha après a localitzar la plataforma en base als senyals distals al laberint, mostrarà una trajectòria centrada en l'emplaçament previ de la plataforma.

Adicionalment, es poden afegir altres fases, com l'aprenentatge invers o *reversal*, que té com objectiu avaluar la flexibilitat cognitiva dels animals, modificant la ubicació habitual de la plataforma cap a un altre quadrant de la piscina, normalment al quadrant oposat en relació als mateixos senyals contextuals.

#### 4.2.3 Variables analitzades

La principal variable analitzada al LAM espacial durant la fase d'adquisició és la *latència* (temps que l'animal tarda a trobar i pujar a la plataforma), és una variable fàcilment quantificable i poc sensible als canvis de l'entorn [248].

Per tal de minimitzar l'efecte de factors aliens que poguessin afectar l'execució dels animals al laberint, també s'enregistren altres variables de control. Per exemple, a la fase d'adquisició es mesura 1) la *velocitat*, com a mesura de la capacitat motora dels animals que podria alterar la *latència*, 2) el *temps en parets*, com a mesura de la tigmotaxi, un indicador d'ansietat [249–251] i 3) la *distància recorreguda*, que en una situació normal ha de covariar amb la *latència* i la *velocitat*.

Durant el test de retenció hi ha certs canvis en les variables analitzades ja que en aquest assaig els animals no disposen de la plataforma per fugir. Hi ha una gran diversitat de variables disponibles pel test de retenció, però les més habitualment analitzades són: el *temps al quadrant target*, el *temps a l'annulus del target*, els *creuaments del target* i l'*error de Whishaw*. Aquesta darrera variable indica si els animals segueixen una trajectòria de natació més o menys directa cap a la plataforma; el corredor de Whishaw és una franja virtual d'amplada preestablerta dins de la qual els animals que neden de manera directa cap a la plataforma mostren valors més elevats [252].

#### 4.2.4 Estratègies de natació

L'estudi de les estratègies de natació dels animals al LAM aporta informació valuosa. La idiosincràsia dels animals, la dificultat del procediment i variables ambientals no

controlades poden afectar l'execució dels animals a la tasca. A continuació s'indiquen les possibles estratègies de natació descrites.

Durant els assaigs d'entrenament les rates poden usar principalment 3 tipus d'estratègia per arribar a la plataforma [253]. Poden aprendre una seqüència de moviments que els portarà fins a la plataforma (estratègia pràxica); poden aproximar-se a la plataforma usant senyals proximals (estratègia tàxica), o poden navegar cap a la plataforma usant la informació sobre la localització de la plataforma proporcionada per la configuració espacial de senyals distals (estratègia espacial o mapeig). A més de visuals, els senyals poden ser també olfactivs. Les rates Sprague-Dawley són capaces de seguir traces d'olor per localitzar la plataforma en un LAM [254]. S'ha demostrat que un animal podria aplicar tant estratègies pràxiques com senyals espacials per localitzar la plataforma inclús quan les posicions de sortida de l'animal fossin aleatòries [255].

Recentment, s'ha considerat una classificació diferent —encara que compatible amb l'anterior—, amb dos tipus d'estratègies principals: una de tipus espacial (al·locèntrica) i una no espacial (egocèntrica). Un animal que aplica una estratègia al·locèntrica pot nedar directament cap a la plataforma, fer una focalització directa cap a la plataforma o fer una cerca directa a partir de la ubicació que fa el propi subjecte. En canvi, els animals que apliquen una estratègia egocèntrica naden en cercles, es mouen de manera dispersa fent un escaneig, naden a prop de les parets fent tigmotaxi o fan una cerca aleatòria [256]. Les estratègies descrites anteriorment són dirigides a trobar la plataforma, no obstant, en animals amb dificultats d'aprenentatge i en models d'Alzheimer poden aparèixer estratègies o conductes aberrants de natació no dirigides, com són la tigmotaxi, la flotació passiva o nedar en espiral [257].

#### **4.2.5 Substrat nerviós implicat**

L'HPC és una estructura clarament implicada en el processament de la informació espacial i contextual. Els estudis en rates han mostrat que l'HPC conté les anomenades *cèl·lules de lloc* que s'activen especialment quan l'animal està en un lloc i ambient concrets [258, 259]. La troballa d'aquestes *cèl·lules de lloc* va donar lloc a la teoria del mapa cognitiu [260], considerant l'HPC com l'estructura clau a través de la qual es formaria un mapa cognitiu per permetre a l'individu moure's en l'entorn, fent una representació espacial valorant les distàncies i relacions entre estímuls. Estudis en humans amb un simulador virtual del LAM [261] que tenien lesions a l'HPC, també han mostrat la implicació d'aquesta estructura en l'orientació espacial.

Els estudis de memòria al LAM resulten molt útils per valorar els efectes de les lesions de l'HPC [261, 262]. Les rates amb lesions hipocampals presenten dificultats en

l'adquisició i la retenció de la tasca amb plataforma submergida però no amb plataforma visible. A més, poden trobar la plataforma si està associada a un senyal visible sempre a la mateixa distància i en la mateixa direcció [262]. Els estudis de lesió també han aportat molta informació en relació a les estructures implicades en la memòria explícita espacial relacional. Animals amb lesions del fòrnix-fímbria presenten dificultats a la tasca de cerca al·locèntrica però poden aprendre a localitzar la plataforma si és visible [263]. El bloqueig dopaminèrgic del NAcc [264] o el cerebel [265] provoca dificultats al LAM i les lesions del nucli caudat han demostrat que aquesta estructura de l'estriat està implicada en el processament dels senyals espacials egocèntrics i no dels al·locèntrics [266].

També s'ha constatat la implicació d'altres estructures en l'aprenentatge espacial, les cèl·lules de direccionament del cap que es troben al còrtex parietal [267] estarien relacionades amb el processament de senyals proximals mentre que l'HPC n'estaria amb els distals [268]. El CPF és una altra estructura que s'ha proposat com a implicada en el processament d'informació espacial, sembla ser que els animals amb lesions en aquesta escorça tenen dificultats en l'adquisició de la tasca espacial al LAM [269] i en la planificació de la seqüència de moviments necessària per trobar la plataforma amagada [269, 270].

## **5. AVALUACIÓ DE LA MEMÒRIA IMPLÍCITA**

### **5.1 INTRODUCCIÓ**

La memòria implícita, també anomenada procedimental o no declarativa, és un tipus de memòria no conscient que suposa canvis en la realització d'una tasca com a conseqüència d'una experiència prèvia [271]. Nedar, anar en bicicleta o fer tasques manuals com cordar-se les sabates no requereixen atenció continuada ni tampoc un esforç conscient. En proves de memòria implícita no és necessari que el subjecte sigui conscient d'estar recordant un esdeveniment concret, es prenen mesures indirectes (p.e. canvis en la velocitat d'execució d'una tasca) o altres mesures conductuals per tal de valorar els resultats [271].

El condicionament clàssic i l'aprenentatge no associatiu (habitució i sensibilització) són formes de memòria implícita filogenèticament molt antigues presents en invertebrats [272]. En animals més desenvolupats s'ha estudiat el condicionament clàssic de respostes motores i el condicionament del tancament de la parpella [273] però un dels principals paradigmes de memòria implícita estudiats és el condicionament de la por, que implica memòria emocional i depèn bàsicament de l'amígdala [274].

En el primer estudi del bloc II d'aquesta tesi vam usar l'EV2 com a tasca per avaluar els efectes de l'AEIC sobre la memòria implícita, ja que ha estat àmpliament usada al nostre laboratori i existeix un model replicat de facilitació de l'AEIC en aquesta tasca. A més de la seva importància adaptativa, la memòria implícita també es veu afectada en diverses patologies neurodegeneratives com la malaltia d'Alzheimer [275, 276] i Parkinson [277–279]. Una altra tasca que vam utilitzar en la present tesi doctoral per estudiar la memòria implícita és la discriminació visual simultània, aplicada en un LAM no espacial on s'avalua la capacitat dels animals per discriminar entre dos estímuls i realitzar un aprenentatge associatiu.

## **5.2 EVITACIÓ ACTIVA DE DOS SENTITS**

### **5.2.1 Introducció**

La conducta d'evitació activa ha despertat molt interès en els teòrics del camp de la conducta i l'aprenentatge. Ja a inicis dels anys 40 es van començar a realitzar estudis sobre condicionament d'evitació, i actualment es considera molt rellevant perquè relaciona emocions i memòria, i per la implicació de l'amígdala en el seu procés d'aprenentatge [280]. En les tasques d'evitació activa, l'animal ha de realitzar una resposta específica, habitualment córrer, per evitar un xoc elèctric. Es poden distingir entre dos tipus de tasques d'evitació activa, d'un sentit i de dos sentits. A la tasca d'evitació activa d'un sentit, l'animal evita el xoc corrent des d'un lloc on pot aparèixer el xoc cap a un altra lloc que sempre és segur. La tasca de dos sentits (EV2) se sol dur a terme a la *shuttle-box* i, per evitar el xoc, l'animal ha de tornar al lloc del qual prèviament havia fugit. L'EV2 es considera més complexa que l'evitació passiva o la d'un sentit implicant un major nombre de regions cerebrals [281].

La *shuttle-box* clàssica consisteix en una caixa amb dos compartiments separats per una barrera, per sobre de la qual els subjectes poden passar d'un compartiment a l'altre. S'han fet adaptacions que, enlloc d'una barrera, tenen una porta o no hi ha cap tipus de separació entre compartiments. La *shuttle-box* s'ubica en una caixa d'insonorització i té unes dimensions aproximades de 60x20x30cm. Està equipada amb un llum i/o un altaveu que es poden utilitzar per proporcionar els senyals d'avís (llum o so) que actuaran com a estimul condicionat (EC), permetent a l'animal evitar el xoc o estimul incondicionat (EI), les barres metàl·liques ubicades al terra de la gàbia produeixen la descàrrega elèctrica (xoc) [282].



### 5.2.2 Procediment estàndard

A la tasca d'EV2, l'animal ha d'aprendre a fer una resposta per evitar un estímul aversiu. La presentació de l'estímul aversiu (xoc) sol anar precedida per un senyal d'avís (llum o so) que indica el moment en què s'ha de realitzar la resposta. Inicialment, el subjecte s'escapa de l'estimulació aversiva, però les associacions repetides entre el senyal d'avís (EC) i l'estímul aversiu (EI) permeten que respongui al senyal i pugui evitar l'estímul aversiu quan encara no ha aparegut. L'animal ha d'aprendre a canviar de compartiment després de l'aparició del senyal d'avís i just abans de l'aparició del xoc elèctric a les potes. El xoc pot aparèixer a qualsevol dels dos compartiments, però sempre en el que es troba situat l'animal en finalitzar el senyal d'avís, quedant reforçada la resposta de canviar de compartiment [282].

El protocol sol implicar 3 fases, una primera fase d'**habitució** en què es permet a l'animal deambular i explorar l'interior de la *shuttle-box* durant un temps preestablert per l'experimentador, sense la presència ni de l'EC ni de l'EI. Alguns autors apliquen protocols més elaborats per habituar els animals a les característiques de l'aparell, aquesta pre-habitució pot durar fins a 10 minuts i se sol aplicar 2 dies consecutius prèviament a l'adquisició [283].

La segona fase o d'**adquisició** és de més llarga durada i consisteix en un nombre fix d'emparellaments EC-EI, en els quals l'EC és un to i/o una llum de curta durada (generalment uns 3s). Tan bon punt l'EC desapareix, s'administra un EI (xoc) que pot variar en intensitat (entre 0.5 i 2mA) fins que l'animal travessa la línia mitja o fins un temps màxim (normalment d'entre 10 i 30s de durada). Si l'animal creua cap a l'altra costat de la gàbia mentre està present l'EC (evitació activa), el xoc no apareix: això actuaria com un reforç. Cada sessió s'inicia amb un assaig previ d'habitució d'entre 3 i 5 minuts d'exploració lliure de la gàbia, sense cap estímul, amb un interval entre assaigs que pot variar entre 10 i 50s. El protocol d'interval entre assaigs ha de ser aleatori per assegurar que l'única associació que s'estableix sigui entre l'EC i l'EI sense altres elements predictius com la regularitat d'aparició de l'EC o un compartiment determinat de la gàbia. Les sessions d'adquisició de llarga durada, amb un alt nombre d'assaigs generalment milloren l'execució de la tasca.

La **retenció** és la tercera fase, sol ser una única sessió amb les mateixes característiques que els assaigs d'adquisició per tal d'avaluar el nivell de record de la resposta condicionada. L'interval de temps entre la fase d'adquisició i la de retenció dependrà del procediment prèviament estipulat pels experimentadors, segons si es vol estudiar memòria a més curt o més llarg termini.

### 5.2.3 Variables analitzades

La variable d'estudi a la fase d'adquisició és el *nombre d'evitacions* o nombre d'assaigs en els que els animals eviten el xoc elèctric canviant de compartiment. Aquesta variable indica el nivell d'adquisició de la tasca quan ja han après a fer l'associació entre EC i EI. Tant a la fase d'habitució, com a la d'adquisició i al test de retenció, també s'enregistra la variable *nombre de creuaments*, en aquest cas sense la presència de cap estímul, com a variable de mesura de l'activitat motora dels subjectes.

A més de les indicades anteriorment, també es pot quantificar el nombre de *fugides* (creuaments durant l'EI) com a resposta al xoc elèctric; habitualment els animals cometen més fugides a l'inici i, a mesura que van establint associacions, van reduint-les per incrementar les respostes d'evitació. Sovint és útil enregistrar la *latència de resposta* tant en les respostes d'evitació o resposta correcta com a cada assaig erroni, tant si realitzen fugida com si es queden en *freezing* (manca de moviment per por).

Altres variables addicionals que es poden enregistrar s'obtenen mitjançant la gravació amb una càmera de vídeo. Per exemple, el nombre de reaccions a l'EC (*rearing, turning, freezing*, moviments dins del compartiment o vocalitzacions).

La resposta de fugida durant la presentació de l'EI es pot analitzar qualitativament i es diferencia en *direccional* (l'animal necessita el contacte amb la paret per desplaçar-se) o *no direccional* [283]. El tipus i nombre de reaccions a l'EC es poden dividir en 3 grups 1) reaccions de *freezing*, 2) respostes preparatòries excloent els casos en què la resposta preparatòria va seguida de la reacció d'evitació i 3) reacció d'atenció cap a l'EC, evidenciada per una dissipació del *freezing*, iniciació de respostes preparatòries o interrupció d'altres activitats prèvies [284].

### 5.2.4 Substrat nerviós implicat

Al llarg dels anys s'ha pogut delimitar de manera acurada el substrat neural de les respostes defensives implicades en l'EV2. La principal estructura cerebral implicada és l'amígdala, amb rols dissociats dels diferents nuclis que la componen.

L'amígdala lateral (LA) rep la informació sensorial dels ECs des del còrtex i el tàlem. Aquesta informació es processa a través de l'amígdala basolateral (BLA) i s'uneix a les projeccions de l'amígdala central (CeA) per anar cap als nuclis efectors del tronc de l'encèfal. Algunes regions diana de la CeA són responsables de la conducta de *freezing* i altres reaccions defensives innates davant d'amenaces apreses [285–288]. Per altra banda, els ECs aversius presents a la tasca d'EV2 també poden evocar conductes defensives, com ara la fugida i l'evitació, que permeten als subjectes incidir en l'impacte

rebut per les amenaces ambientals [289, 290]. Aquestes conductes evocades pels ECs només depenen de la LA i la BLA i no requereixen la participació de la CeA [291, 292]. L'estriat dorsal s'ha proposat com l'estructura on es produiria l'associació entre l'estímul reforçador i la resposta d'evitació [293] i sembla ser que també estaria implicat en la conducta d'EV2 com han demostrat diversos estudis [294–296], depenent dels nivells de DA presents en l'estriat [297]. Pel que fa a l'estriat ventral, les projeccions d'informació des de la BLA cap al NAcc serien necessàries per les respostes conductuals en l'EV2 [298] com ja s'havia proposat prèviament [299]. No obstant, les lesions d'aquest nucli produïrien una millora en l'adquisició i retenció de la tasca d'EV2 [300], indicant una major codificació de l'associació estímul-resposta en l'estriat dorsal.

### **5.3 DISCRIMINACIÓ VISUAL SIMULTÀNIA (DVS) AL LAM**

#### **5.3.1 Introducció**

La tasca de discriminació visual al LAM també va ser desenvolupada per Richard G. Morris, és una tasca no espacial i de memòria implícita destinada a avaluar la capacitat de les rates per discriminar estímuls visuals [245]. A la configuració original, es posaven dos senyals contextuals al voltant de la piscina amb patrons visuals diferents, un dels quals estava associat a la plataforma de fugida (senyal correcte) i l'altre no (senyal incorrecte), els animals havien d'aprendre a aproximar-se a la plataforma basant-se en el patró del senyal associat a aquesta i no en la seva localització espacial. Les característiques d'aquesta variant del LAM són similars a les del LAM de tipus espacial i presenta els mateixos avantatges, ja que no requereix que els animals estiguin privats per tenir motivació per resoldre la tasca, ni es veu influenciada per estímuls olfactoris. A més, permet analitzar els nivells d'ansietat dels animals i les estratègies de natació [27]. Al llarg del temps, diversos investigadors han modificat la configuració del laberint aquàtic de discriminació visual original de Morris [301–304] per tal d'avaluar la DVS en rosegadors. Alguns estudis han usat plafons externs a la piscina amb diferents patrons, un dels quals sempre està associat a la plataforma [27, 305, 306].

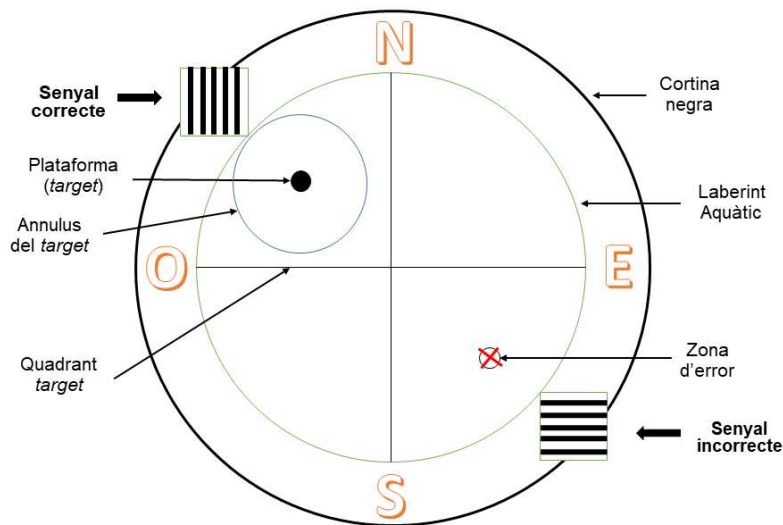
#### **5.3.2 Procediment estàndard**

A la tasca de DVS es presenten els senyals al mateix temps i la ubicació de cadascun d'ells es modifica a cada assaig, de manera que l'animal ha d'aprendre a associar el senyal amb la plataforma segons el patró visual del senyal. Aquesta configuració del LAM implica un control acurat de la resta d'estímuls de la sala, amb la disposició d'una cortina al voltant de la piscina per impedir que els animals tinguin cap altra senyal extern diferent dels disposats *ad hoc*, que pugui emmascarar els resultats o facilitar la tasca. A

més, cal aplicar un protocol de rotació de la ubicació dels senyals que sigui pseudoaleatori (veure Annex 1).

La resta de procediments es realitza de manera idèntica a l'aplicat al LAM de tipus espacial descrit a l'apartat 4.2.2, distribuït igualment en les fases d'habitució, adquisició i retenció. Addicionalment es pot afegir una fase de *reversal*. A la tasca de DVS, el *reversal* implica invertir l'associació inicial establerta entre el senyal i la plataforma, el que prèviament havia estat el senyal correcte associat a la plataforma passa a ser el senyal associat a l'error i viceversa. A la figura 6 es mostra una configuració de la tasca de DVS amb plafons de línies horitzontals i verticals blanques i negres.

En un estudi pioner del nostre laboratori, es va aplicar una configuració del LAM amb dos plafons quadrats, cadascun amb un patró de línies diferent. Un dels senyals amb línies verticals i l'altre amb línies horitzontals [27]. Per tal d'evitar el risc que els animals adquirissin un aprenentatge espacial i associessin una configuració espacial específica dels dos senyals i la plataforma, en aquella versió de memòria implícita es modificava la ubicació dels senyals i la plataforma a cada assaig. A la prova de retenció, l'animal s'introduïa a la piscina amb els senyals visuals però sense la plataforma per tal d'avaluar l'adquisició durant les sessions d'aprenentatge.



**Fig. 6 Configuració del laberint aquàtic de Morris per a una tasca de discriminació visual simultània de memòria implícita.** Es mostren els punts cardinals d'entrada, el senyal 1 (correcte) associat a la plataforma i el senyal 2 (incorrecte) no associat.

### 5.3.3 Variable analitzades

La principal variable d'estudi de la tasca de DVS, per valorar el nivell d'aprenentatge a les sessions d'adquisició, és la *latència*. En aquesta versió es pot analitzar una segona variable d'estudi important, el *nombre d'errors*, ja que els animals tenen un 50% de

probabilitats de trobar la plataforma a partir dels senyals presents a l'entorn. Aquesta variable, no només ens permet valorar el nivell d'aprenentatge de l'associació sinó també la capacitat de discriminació visual dels patrons visuals presents en els senyals contextuais. Sembla ser que en aquest tipus de tasca usant senyals amb línies verticals i horitzontals, la *latència* no seria un indicador suficient per detectar l'aprenentatge en animals amb lesions a l'estriat [303].

La resta de variables analitzades al LAM espacial també són susceptibles de ser analitzades a la tasca de DVS, amb especial rellevància de l'*error de Whishaw*, que indicaria una correcta associació entre el senyal correcte i la plataforma.

#### **5.3.4 Estratègies de natació**

Amb la present configuració del LAM, els animals han de formar una associació entre el senyal correcte i la plataforma per trobar-la i resoldre la tasca; però la distància física entre aquest senyal i la plataforma pot dificultar la tasca [301], de manera que els animals poden arribar a desenvolupar diferents estratègies per tal d'assolir el seu objectiu. Whishaw i Petrie van trobar que els animals aplicaven dues estratègies, 1) dirigint-se cap al senyal incorrecte i modificant la trajectòria cap al senyal correcte per trobar la plataforma i 2) buscar la plataforma a la zona associada al senyal correcte i en no trobar-la desistir en la cerca i seguir nedant de manera erràtica.

En un estudi recent del nostre laboratori [27] es van identificar dos tipus de trajectòries dels animals. Quan els animals havien après a associar el senyal correcte amb la plataforma aplicaven una estratègia directa. En canvi, aquells animals que no arribaven a fer l'associació senyal correcte-plataforma aplicaven una estratègia d'assaig-error de manera que tenien un 50% de possibilitats de trobar la plataforma en el primer intent però eren susceptibles de cometre més errors que aquells que aplicaven una estratègia directa.

#### **5.3.5 Substrat nerviós implicat**

El CPF sembla ser una estructura implicada en el processament de la tasca de discriminació visual al LAM. Aquesta estructura està relacionada amb els processos d'atenció, a més, les dificultats en la inversió de l'aprenentatge i el fet de cometre errors perseveratius seria degut a una disfunció del CPF. Les demandes d'atenció de la tasca resulten en un alliberament d'ACh en el CPF medial [307, 308]. En aquest sentit, Hagan i col·laboradors van mostrar que el bloqueig dels receptors muscarínics colinèrgics dificultaven la tasca de discriminació visual especialment en la capacitat dels animals per triar un dels senyals, produint una major perseveració en cometre errors [309].

Resultats similars es van veure al prosencèfal basal, una implicació insuficient del sistema colinèrgic d'aquesta zona impedia l'execució de la tasca de DVS [310], possiblement a causa de les demandes d'atenció involucrades en aquesta tasca.



### **III. HIPÒTESI I OBJECTIUS**

---





## 1. HIPÒTESI GENERAL

L'AEIC del FPM a nivell de l'HL és capaç de facilitar l'aprenentatge i la memòria —tant implícita com explícita— en rates. Les dades obtingudes fins al moment ens permeten plantejar la hipòtesi que l'estimulació del FPM mitjançant AEIC afavoriria mecanismes de plasticitat sinàptica i/o neurogènesi similars als produïts pel propi aprenentatge, en estructures implicades en aquests processos cognitius o en la seva modulació.

En humans, la DBS administrada en regions relacionades amb l'aprenentatge i la memòria també s'ha mostrat efectiva per pal·liar el deteriorament mnèsic, compartint alguns mecanismes de plasticitat activats per l'AEIC. En general, les condicions d'administració de la DBS en humans són metodològicament diferents a les utilitzades en els models animals amb AEIC. Per tant, si aquests plantejaments són certs, hauríem d'esperar que, tant l'administració de l'AEIC al FPM en condicions similars a les de la clínica d'humans, com l'administració de la DBS també al FPM, resultessin capaces de facilitar la memòria en la rata.

## 2. OBJECTIUS

### 2.1 Objectiu general

L'objectiu general d'aquesta tesi doctoral ha estat estudiar l'efecte de l'AEIC del FPM a nivell de l'HL sobre la facilitació de l'aprenentatge i la memòria, variant algunes de les condicions d'administració del tractament fins al moment més utilitzades en models animals, amb la intenció de fer-les més anàlogues a les usades en els tractaments de DBS a la clínica d'humans.

### 2.2 Objectius específics

#### A. Condicions d'aplicació de l'AEIC

1. Estudiar els efectes de l'AEIC amb ona quadrada sobre una tasca de discriminació visual simultània, buscant els valors del corrent estimulant (freqüència, durada del pols i durada del tren) que resultin eficaços per facilitar la memòria.
2. Estudiar els efectes d'un tractament d'AEIC administrat de manera no-contingent amb l'entrenament, sobre dos tipus de tasques de memòria diferents, l'evitació activa de dos sentits (EV2, de memòria implícita) i l'aprenentatge espacial al laberint aquàtic de Morris (LAM, de memòria explícita).
3. Estudiar l'eficàcia d'una administració d'AEIC de llarga durada sobre un aprenentatge espacial d'alta dificultat.

4. Comparar els efectes de l'estimulació elèctrica cerebral del FPM, quan és autoadministrada (AEIC) i quan és administrada per l'experimentador (administració remota).

**B. Mecanismes implicats en l'efecte facilitador de l'AEIC sobre la memòria**

5. Avaluar la capacitat de l'AEIC per promoure la neurogènesi i la seva integració funcional al gir dentat de l'hipocamp.

6. Estudiar els efectes de l'estimulació del FPM, sigui autoadministrada o administrada per l'experimentador, sobre l'activació neuronal (expressió de c-Fos) en diferents àrees cerebrals relacionades amb la conducta motora, l'*arousal*, el reforç i la memòria.

7. Avaluar els efectes de l'AEIC sobre l'activitat de l'AChE en àrees colinèrgiques relacionades amb l'aprenentatge i la memòria.

#### **IV. TREBALL EXPERIMENTAL**

---



## **BLOC I**

---



## 1. PLANTEJAMENT GENERAL

L'AEIC aplicada post-entrenament ha demostrat ser capaç de facilitar tant l'adquisició com la retenció de la memòria quan s'administra amb ona sinusoidal [5–7, 11]. Actualment, la DBS a la clínica d'humans [21, 202, 204] i l'estimulació elèctrica cerebral en laboratoris d'experimentació animal [28, 29, 155, 311, 312], destinada a facilitar processos de memòria, s'utilitza majoritàriament amb corrent d'ona quadrada. Però en l'únic estudi del nostre laboratori en el que es va utilitzar una ona quadrada monofàsica amb l'objectiu de facilitar la memòria, no es van trobar els efectes de facilitació amb la mateixa consistència i regularitat que s'havia vist amb ona sinusoidal [9].

Per tant, l'objectiu general d'aquest bloc d'experiments va ser fer un estudi d'administració d'un tractament d'AEIC amb ona quadrada, cercant la configuració de paràmetres d'estimulació capaç de produir un efecte facilitador de la memòria, de característiques similars als observats al nostre laboratori amb AEIC d'ona sinusoidal. Desgraciadament, no vam poder partir dels paràmetres utilitzats a l'estudi de Ruiz-Medina [9], donat que un estudi posterior (no publicat) va trobar que l'AEIC aplicada amb aquells paràmetres d'ona produïa lesions al teixit neural. Així doncs, per tal d'assolir el nostre objectiu vam triar uns paràmetres específics, basant-nos en la bibliografia existent i en la configuració de l'ona sinusoidal administrada al nostre laboratori.

Les variables que vam modificar van ser 1) la freqüència, 2) la durada dels polsos de l'ona i 3) la durada dels trens. En els Experiments I i II vam aplicar uns paràmetres específics intentant reproduir les configuracions aplicades en altres treballs amb corrent d'ona quadrada, amb estimulació d'alta freqüència i polsos de curta durada. L'objectiu va ser obtenir els efectes esperats i minimitzar, al mateix temps, els efectes adversos sobre el teixit. En els Experiments III i IV vam buscar aquells paràmetres que configuressin una ona quadrada més similar a la usada en experiments previs del nostre laboratori amb ona sinusoidal, amb estimulació de baixa freqüència i polsos de més llarga durada. A la taula 3 es fa una comparativa dels diferents paràmetres aplicats en els experiments successius d'aquest bloc.



	<i>Experiment 1</i> (n=7)	<i>Experiment 2</i> (n=6)	<i>Experiment 3</i> (n=11)	<i>Experiment 4</i> (n=10)	<i>Garcia-Brito, 2018</i>
<i>Tipus d'ona</i>	quadrada	quadrada	quadrada	quadrada	sinusoidal
<i>Freqüència (Hz)</i>	100	200	33	50	50
<i>Durada del pols (milisegons)</i>	0.1	0.5	30	20	-
<i>Durada del tren (milisegons)</i>	300	300	300	200	300
<i>Nombre de polsos bifàsics x tren</i>	30	60	10	10	15
<i>Rang d'intensitats (microAmpers)</i>	350 a 800	140 a 200	65 a 150	50 a 250	20 a 250

**Taula 3** Descripció de les característiques de l'ona aplicada a cada experiment i els diferents paràmetres de l'ona i del tren d'estimulació. La columna ombrejada mostra els paràmetres d'AEIC aplicats en un experiment idèntic però amb corrent elèctric d'ona sinusoidal [27].

Per altra banda, els estudis d'AEIC post-entrenament per facilitar processos d'aprenentatge i memòria explícita s'han dut a terme amb tasques realitzades al LAM espacial o al laberint en T; per exemple, l'estudi de Ruiz-Medina [9] amb AEIC d'ona quadrada es va realitzar en un LAM espacial. És per aquest motiu que vam voler utilitzar un procediment comparable, amb el mateix laberint però adaptant-lo a una tasca de memòria implícita, la DVS.

En general, per veure efectes de l'AEIC sobre la memòria implícita s'han usat tasques d'aprenentatge aversiu i d'evitació, però recentment, al nostre laboratori es va realitzar un estudi pioner on s'analitzaven els efectes de l'AEIC en una tasca de memòria implícita de DVS al LAM [27]. Aquell treball va mostrar efectes de facilitació de l'aprenentatge i la memòria, administrant el tractament post-entrenament i amb corrent d'ona sinusoidal. Per tant, vam intentar replicar aquells resultats amb el mateix tipus de tasca i procediment però aplicant el corrent elèctric amb ona quadrada, modificant solament la variable *tipus d'ona* i els seus paràmetres específics per intentar fer-lo més comparable a les característiques usades en la DBS.

## **2. EXPERIMENT I**

### **2.1 Introducció**

L'objectiu d'aquest primer experiment va ser establir uns paràmetres d'ona quadrada que permetessin trobar un efecte facilitador del tractament amb AEIC. La tria dels paràmetres d'estimulació adequats és complexa, cal activar una àrea específica del cervell per obtenir els efectes esperats minimitzant els efectes adversos, però hi ha molts graus de llibertat donat que es poden fer moltes combinacions de durada del pols, freqüència, durada del tren i interval entre polsos. Existeix també la dificultat de determinar amb exactitud quines neurones són activades i quines inhibides mitjançant l'estimulació elèctrica cerebral i fins a quin punt s'expandeix a àrees contigües [313].

La DBS amb polsos de curta durada sembla incrementar l'efectivitat dels tractaments, amb un bon equilibri entre efectes beneficiosos i efectes adversos [314], també és coneguda la participació dels astròcits en els efectes amb estimulació d'alta freqüència, contribuint a la potenciació a llarg termini i, per tant, als efectes duradors de la DBS. Diversos estudis on s'administrava DBS d'alta freqüència amb polsos de curta durada van mostrar-se efectius per tractar la depressió major [228, 315–319]. Aquests efectes podrien estar associat a un alliberament fàsic de DA que milloraria alguns símptomes de la depressió major, com s'ha vist amb l'administració de DBS al FPM amb polsos de curta durada (0.08ms) i alta freqüència (120Hz) [81]. Per altra banda, estudis en malalts d'Alzheimer van mostrar millores en la memòria si se'ls aplicava DBS al fòrnix amb uns paràmetres d'ona similars (0.09ms i 130Hz) [21, 22]. Així mateix, un estudi paramètric amb un model animal d'Alzheimer va trobar que la DBS era més efectiva amb una configuració d'ona amb polsos de 0.1ms i 100Hz [30].

Prenent aquests estudis en consideració, en aquest primer experiment vam aplicar una estimulació elèctrica amb ona quadrada, càrrega equilibrada (bifàsica), polsos de curta durada (0.1ms) i d'alta freqüència (100Hz); paràmetres que ja s'havien mostrat efectius per obtenir la conducta d'AEIC i que no provocaven lesions en el teixit neural [148].

### **2.2 Material i procediment**

#### **2.2.1 Benestar animal**

El procediment experimental d'aquest primer treball, així com la resta d'experiments que componen aquesta tesi es van dur a terme d'acord amb les directives del Consell de la Comunitat Europea per la cura i ús d'animals de laboratori amb l'autorització del Departament d'Agricultura, Ramaderia i Pesca de la Generalitat de Catalunya amb número de protocol 4465. Tots els procediments es van realitzar seguint les bones

pràctiques de laboratori (GLP), garantint el benestar i l'estat de salut general dels subjectes experimentals d'acord amb la directiva de la CEE i directrius que especifica la llei publicada al DOGC 24-7.8.1997.

### 2.2.2 Subjectes

Es van utilitzar un total de 18 rates (*Rattus norvegicus*) albines mascles de la soca Wistar procedents del nostre laboratori, de 92.64 dies (DE=1.27) d'edat i un pes mitjà de 351.21g (DE=19.91) a l'inici de l'experiment. Tres dies abans de la cirurgia estereotàxica els subjectes es van aïllar i mantenir en gàbies individuals de plàstic de mida homologada (50x22x14cm), cobertes amb una reixa metàl·lica i amb un llit d'encenalls. Els animals es van mantenir en condicions controlades i constants de temperatura (20-22°C) i humitat (40-70%) sota un cicle de 12 hores de llum (8-20h) i 12 hores de fosc (20-8h) controlat artificialment. Durant tot l'experiment els subjectes van seguir un règim alimentari (Rat-chow pellets, Scientific Animal Food & Engineering, Augy, France) i d'aigua *ad libitum*. El treball experimental es va dur a terme diàriament durant la primera meitat del cicle de llum. Es va seguir un protocol diari de manipulació estandarditzat (*handling*) dels animals de 5-10 minuts de durada, tant prèviament a la cirurgia estereotàxica com 72h després de la mateixa i immediatament abans de cada sessió d'entrenament. Amb aquesta manipulació es pretenia reduir la reactivitat emocional dels animals durant la manipulació experimental.

### 2.2.3 Cirurgia estereotàxica

Els animals van ser sotmesos a anestèsia general amb Clorhidrat de Ketamina (150mg/kg, i.p. Imalgène® Merial, Lyon, France) i Xilacina (0.08 mg/kg i.p. Rompun® 23 mg/ml). A continuació se'ls va implantar un elèctrode monopolar d'acer inoxidable de 150µm de diàmetre a l'HL, en les fibres del FPM. La implantació es va fer crònica i unilateral (hemisferi dret). Les coordenades estereotàxiques utilitzades van ser AP -1.8mm posterior a bregma, ML +2.0mm lateral a la línia medial sagital i DV -8.5mm de profunditat a partir de la superfície cranial [320] (Fig.7). La durada de la intervenció de cadascun dels animals va ser aproximadament de 50 minuts. Es van seguir els procediments convencionals de cirurgia asèptica utilitzant un aparell estereotàxic digital adaptat per ser usat en rates (David Kopf Instruments, USA, model 1504). L'elèctrode d'estimulació estava soldat a un connector de material plàstic que es va fixar en la posició d'implantació amb resina acrílica autopolimeritzable (Vertex Self-curing, Dentimex, Nederland) sobre 3 cargols ancorats a la superfície del crani. L'elèctrode de

referència va consistir en un fil de coure soldat a un dels 3 cargols i un dels borns del connector de plàstic.

Al realitzar la incisió i els punts de sutura, es va administrar de manera tòpica anestèsia local amb lidocaïna. Durant la intervenció es va mantenir estable la temperatura corporal dels subjectes mitjançant un coixinet tèrmic, així mateix, se'ls van mantenir els ulls hidratats durant la intervenció i al finalitzar, mitjançant aplicació de gel lubricant ocular d'ús veterinari Lubrithal (Dechra, Barcelona, España).

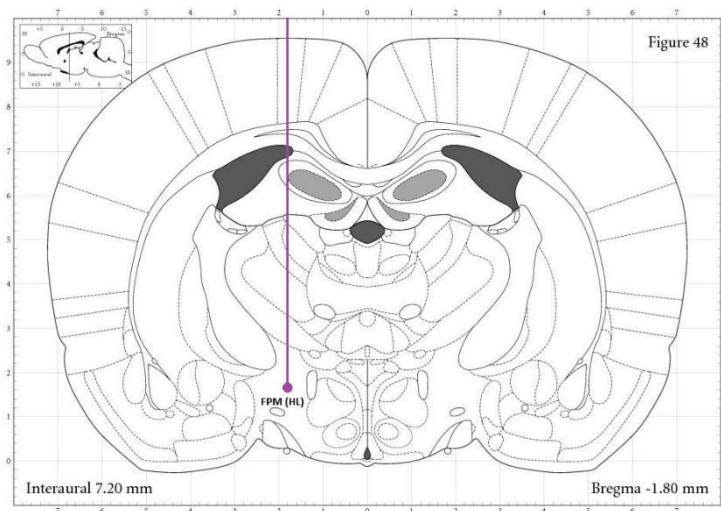


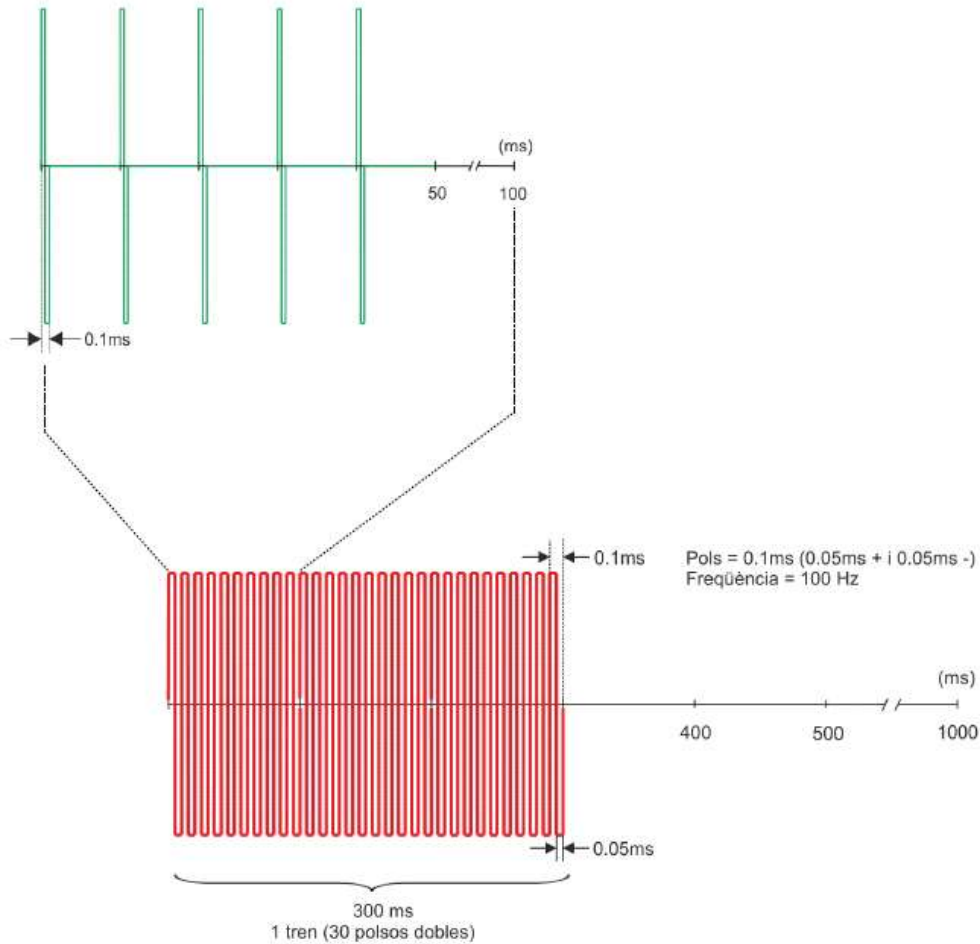
Fig. 7 Tall coronal del cervell de la rata. S'indica la trajectòria de pas i implantació de l'elèctrode d'AEIC al FPM, a l'alçada de l'HL. Adaptat de l'atles estereotàxic de Paxinos i Watson (6a edició).

## 2.2.4 Aparells

### a) Aparells d'AEIC

La conducta d'AEIC es va dur a terme en una caixa operant *Skinner* convencional (25x20x20cm) formada per una paret de plàstic transparent (davantera) i tres de metacrilat opaques (Campden Instruments, Ltd.). La palanca d'AEIC de 2x2cm es trobava situada en una de les parets laterals a una alçada de 3cm sobre el nivell del terra de la caixa.

L'equip d'estimulació va consistir en un generador de corrent elèctric estimulant d'ona quadrada amb un mòdul amplificador de sortida elèctricament aïllat (Cibertec CS-20). Com a mesura pel control visual del corrent administrat als subjectes, es va utilitzar un oscil·loscopi Hameg (HM 412-5). La configuració del corrent elèctric va consistir en trens d'estimulació de 300ms de durada, cada tren estava format per 30 polsos bifàsics d'ona quadrada, un pols positiu seguit d'un pols negatiu, de 0.1ms de durada cada pols doble i 100Hz de freqüència (Fig.8). Tots els paràmetres del corrent estimulant, excepte la intensitat (veure taula 3), es van mantenir fixos durant tot l'experiment.

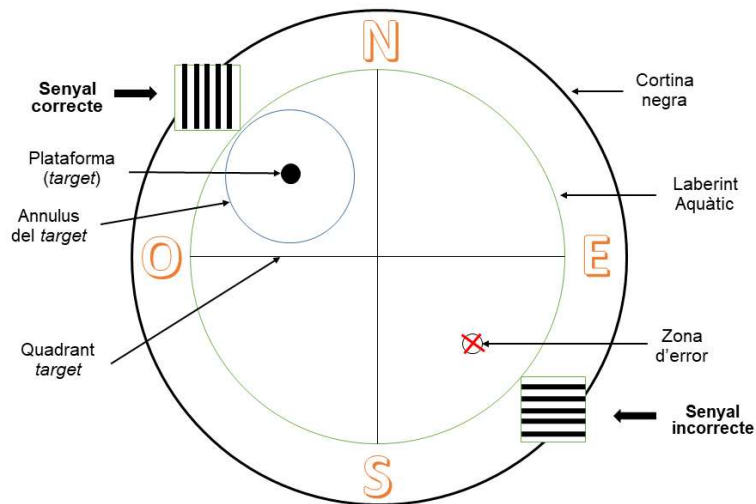


**Fig. 8 Paràmetres del corrent elèctric d'ona quadrada aplicats a l'Experiment I.** En vermell es mostra un tren complet de 300ms amb el nombre total de polsos, en verd es detalla la durada i distribució real (polsos de 0.1ms amb un interval entre polsos de 0.9ms) en una fracció de 50ms.

### b) LAM

La tasca de DVS es va realitzar en un LAM. Aquest aparell va consistir en una piscina circular elevada de 2m de diàmetre i 60cm d'alçada, plena d'aigua fins a una alçada de 45cm. La temperatura de l'aigua es va mantenir a  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ . La piscina estava situada al centre d'una sala en semipenombra, sobre una plataforma metàl·lica de 40cm d'alçada i envoltada de cortines negres penjades des d'un fals sostre fins a la base de la piscina, formant un recinte de 2.4m de diàmetre. Per aquest experiment, vam implementar una versió adaptada de la tasca de dues plataformes de Packard i McGaugh [303] amb dos senyals contextuais, que es van penjar del fals sostre amb dos fils de *nylon*® imperceptibles. Aquests fils van permetre mantenir els senyals en suspensió durant les sessions d'entrenament just al centre de la zona associada al quadrant virtual de la piscina, 45cm per sobre del nivell de l'aigua. Els dos senyals van consistir en panells de  $40\text{cm}^2$  amb patrons de línies blanques i negres, un d'ells amb línies verticals i l'altre amb línies horitzontals. Tal com es pot observar a la figura 9, el senyal correcte estava

associat a la plataforma (*target*) i el senyal incorrecte a la zona d'error, és a dir, on no hi havia la plataforma. Per l'aprenentatge de la tasca de DVS (sessions d'adquisició) es va situar una plataforma de Plexiglas (11cm de diàmetre) submergida 1cm per sota de la superfície de l'aigua, al centre d'un dels quatre quadrants en què es va subdividir la piscina a partir de dues línies imaginàries que es creuaven al punt central d'aquesta.



**Fig. 9 Representació de la configuració del LAM utilitzada per la tasca de DVS.** La zona d'error està associada al senyal incorrecte (línies horitzontals), marcada en la imatge amb una creu vermella. La plataforma submergida (*target*) representa l'execució correcta i està associada al senyal correcte (línies verticals).

Degut a les característiques dels aparells, l'espai de treball i propòsit de l'experiment, es van fer diverses modificacions al model original de Packard i McGaugh [303]. En el seu model, els senyals eren pilotes de goma amb línies blanques i negres properes a cadascuna de les dues plataformes. En el nostre cas, una configuració d'aquest tipus suposava una dificultat pràctica, ja que el nostre sistema de *videotracking* estava preparat per tal d'activar la gravació sempre que un objecte en moviment (p.e. una rata) es trobés a l'àrea interior de la piscina. Per tant, vam situar els senyals a l'exterior del perímetre de la piscina, immediatament davant de la plataforma, assumint una línia perpendicular des de la tangent de la corba més propera de la piscina. Les cortines negres van permetre una focalització total en els dos senyals rellevants per la tasca. Damunt del fals sostre, 175cm sobre el centre de la piscina es va situar una càmera de vídeo (Smart Video Tracking System, Versió 2.5, Panlab) amb una lent d'angle ample. Les gravacions dels trajectes de natació dels animals es van enregistrar en un ordinador ubicat a la mateixa sala.

### 2.2.5 Conducta d'AEIC

#### a) Assignació a grups experimentals

Després de 7 dies de recuperació de la cirurgia estereotàxica, els subjectes van ser distribuïts aleatòriament en 2 grups experimentals, un dels grups va rebre el tractament d'AEIC post-entrenament (AEIC, n=9) i l'altre no el va rebre (SHAM, n=9).

#### b) Modelament de la conducta d'AEIC

En els animals assignats al grup de tractament, es va modelar la conducta d'AEIC per tal d'adquirir una resposta continuada de prémer la palanca. Per assolir aquest objectiu es va realitzar un modelament per aproximacions successives, de manera que l'experimentador aplicava un tren d'estimulació cada vegada que l'animal s'aproximava a la palanca, amb l'objectiu final de que arribés a prémer la palanca per si sol per autoadministrar-se el tractament. Una vegada es va haver instaurat la conducta d'AEIC sense la intervenció de l'experimentador, es va procedir a determinar quina era la intensitat mínima de corrent amb què l'animal mantenia una resposta estable. A partir d'aquí, es va deixar que l'animal s'autoadministrés fins a 500 trens de corrent estimulant per tal de garantir un bon aprenentatge de la resposta.

#### c) Cerca de la intensitat òptima (CIO)

A continuació, tots els subjectes van realitzar una sessió de CIO amb l'objectiu de determinar la intensitat del corrent elèctric estimulant que produïa la major taxa de resposta. Aquesta intensitat, anomenada òptima (IO), va ser la utilitzada a la fase de tractament d'AEIC. La CIO es va iniciar a la intensitat mínima que generava resposta d'AEIC i es va mantenir durant 2 minuts, aplicant un increment de 10 $\mu$ A cada 2 minuts. A mida que s'incrementava la intensitat, la taxa de resposta augmentava fins un punt en que s'estancava o decreixia. Quan s'enregistrava un decrement de la taxa de resposta, la CIO es donava per finalitzada.

#### d) Tractament amb AEIC

Immediatament després de finalitzar cada sessió d'adquisició de la tasca de DVS (descrita al punt 2.2.6), els subjectes del grup AEIC van rebre el tractament d'AEIC a la caixa de *Skinner*. El tractament va consistir en 2500 trens de corrent estimulant a la IO establerta durant la sessió de CIO. Els subjectes del grup SHAM també els vam situar en una caixa de *Skinner* durant 45 minuts (temps mitjà de durada del tractament d'AEIC) després de cada sessió d'adquisició, però sense rebre tractament.

### **2.2.6 Procediment de la tasca de DVS**

#### **a) Adquisició de l'aprenentatge**

Tres dies després de les sessions de modelament i CIO, totes les rates van ser entrenades per la tasca de DVS. L'adquisició d'aquesta tasca va consistir en 5 sessions (1 sessió diària) de 6 assaigs cadascuna. La durada de l'interval entre assaigs va ser de 120s. Cada sessió es va iniciar des d'una de quatre posicions possibles, N, E, S i O, seguint un programa pseudoaleatori i cada assaig va consistir en un trajecte de natació des de l'extrem de la piscina fins a la plataforma. Quan la rata no trobava la plataforma en els 90s que durava l'assaig, era guiada manualment perquè hi pugés. Passats 15s la rata es retirava de la piscina. Quan trobava la plataforma per si mateixa, igualment es deixava durant 15s per tal de facilitar l'associació del senyal correcte amb la ubicació de la plataforma. Cada vegada que l'animal entrava a l'àrea associada al senyal incorrecte s'enregistrava un error. La posició dels dos senyals es va manipular de tal manera que cada 10 assaigs el senyal correcte fos més a prop, més lluny o a la mateixa distància que el senyal incorrecte en relació al punt d'inici. Així, el senyal correcte es va canviar de posició després de cada assaig entre els quadrants restants. El protocol de localització dels senyals i la plataforma que es va seguir per les sessions d'adquisició i test de retenció es mostra a l'annex1.

#### **b) Test de retenció**

Per obtenir evidències de la retenció de l'aprenentatge, vam sotmetre a cada rata a un únic assaig de 60s de durada, 72 hores després de la darrera sessió d'adquisició. Aquest assaig va consistir en introduir l'animal a la piscina des del punt d'inici E, amb els dos senyals presents però sense la plataforma, i enregistrar-ne la conducta. Vam analitzar si el subjecte tenia preferència per alguna àrea en concret (correcta o incorrecta) o si, pel contrari, es desplaçava de manera aleatòria per la piscina. Un cop finalitzat el test de retenció, i amb l'animal encara a l'interior de la piscina, es col·locava la plataforma, es guiava l'animal perquè hi pugés i es retirava de la piscina. A continuació es mostra un esquema del disseny experimental i el procediment conductual que es va utilitzar en el present experiment i els següents d'aquest bloc (Experiments II, III i IV) (Fig.10).



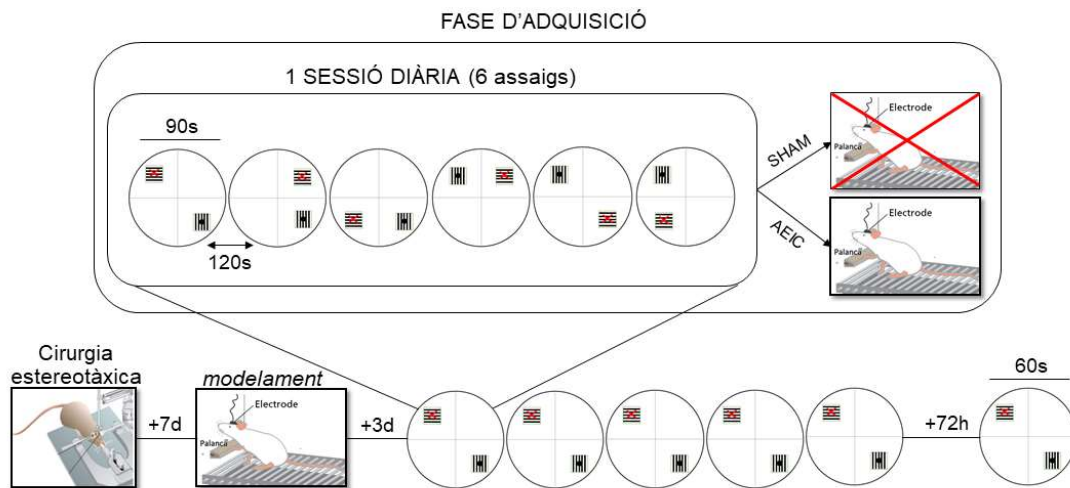


Fig. 10 Diagrama del procediment experimental dels Experiments I a IV. Només es mostra una de les sis possibles configuracions de localització de la plataforma i els senyals en els quadrants. El test de retenció es va realitzar amb els senyals presents però sense la plataforma. Les imatges de la part superior indiquen els grups, AEIC que rep tractament i SHAM que no el rep. Il·lustracions adaptades d'A. Mackey.

### 2.2.7 Histologia

Per valorar histològicament la implantació dels elèctrodes, en acabar l'experiment els animals es van sacrificar mitjançant perfusió transcardíaca amb un buffer fosfat 0.1M (PB; pH=7.4) amb 4% de paraformaldehid. Els cervells es van extreure i es van deixar en postfixació durant 2 hores, canviant-los a continuació a una solució crioprotectora. Quatre dies després es van congelar i tallar en un criòstat (Cryocut 1800 amb micròtom 2020, Jung) a 40µm. Els teixits es van tenyir amb *violeta de cresil* i les seccions coronals es van examinar al microscopi per determinar la localització de l'elèctrode.

### 2.2.8 Anàlisi estadística

Les anàlisis principals es van dur a terme considerant la variable independent *tractament* com a qualitativa (amb dues categories) i les variables dependents com a quantitatives. Aquestes últimes eren (1) *latència*: temps que els subjectes necessitaven per trobar i pujar a la plataforma (el valor màxim era 90s), i (2) *nombre d'errors*: nombre d'entrades a l'àrea associada al senyal incorrecte. Les comparacions entre grups en les sessions d'adquisició es van fer amb un model lineal general (MLG) de mesures repetides amb l'objectiu d'estudiar la *latència*, el *nombre d'errors* i les variables de control percentatge de *temps en parets* (mesura de tigmotaxi), *distància* (distància total nedada en cm) i *velocitat* (en cm/s) al llarg de les 5 sessions de la fase d'adquisició. Per l'anàlisi del test de retenció es van realitzar proves *t-test* de mostres independents per comparar l'execució dels subjectes al total de l'assaig (60s) i per la primera meitat de l'assaig (30s) en relació a les variables *nombre d'errors*, *temps al quadrant target* (percentatge de

temps al quadrant on es localitzava la plataforma durant l'adquisició) TQ30 i TQ60, *creuaments del target* (nombre de vegades que la rata passava pel punt on es localitzava la plataforma durant l'adquisició) CT30 i CT60, *temps a l'annulus del target* (percentatge de temps en una zona virtual circular, concèntrica al voltant de la plataforma) TA30 i TA60, *distància al target* (distància mitjana des de la ubicació de l'animal a la plataforma, al llarg de la sessió) DT30 i DT60, *error de Wishaw* (desviació respecte del trajecte directe cap a la plataforma) EW30 i EW60, així com les variables de control esmentades prèviament per les sessions d'adquisició. Es va fer una test *chi-quadrat* per determinar si els grups presentaven diferències en les estratègies de natació. Addicionalment, es va dur a terme una anàlisi de correlacions bivariades *Rho de Spearman* per estudiar la relació entre els paràmetres de l'AEIC i la conducta dels animals a la tasca de DVS. El nivell de significació per tots els tests es va establir en  $\alpha=0.05$  i tot el processament de dades es va realitzar mitjançant el paquet estadístic SPSS v23 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA).

## 2.3 Resultats

### 2.3.1 Subjectes

Es va dur a terme un control regular del pes dels subjectes com a indicador de canvis de salut que podrien haver afectat l'execució de la tasca. L'anàlisi de la variància va mostrar que els grups partien de pesos similars a l'inici de l'experiment i no es van veure diferències entre grups en l'evolució del pes al llarg de l'experiment. Es van excloure un total de quatre subjectes. Concretament, una rata va presentar estereotípies molt marcades i, tot i haver fet el modelament de la conducta no va ser possible iniciar el tractament d'AEIC post-entrenament de la primera sessió. Un altre subjecte va presentar problemes oftalmològics que li impedien dur a terme la tasca de discriminació visual, un altre va perdre l'elèctrode durant la cinquena sessió de tractament d'AEIC i un altre el vam retirar de l'experiment per fallades tècniques en el sistema de *videotracking* que podrien haver esbiaixat els resultats. La mostra final va constar de 14 subjectes (SHAM:  $n=7$ , AEIC:  $n=7$ ).

### 2.3.2 Paràmetres d'AEIC

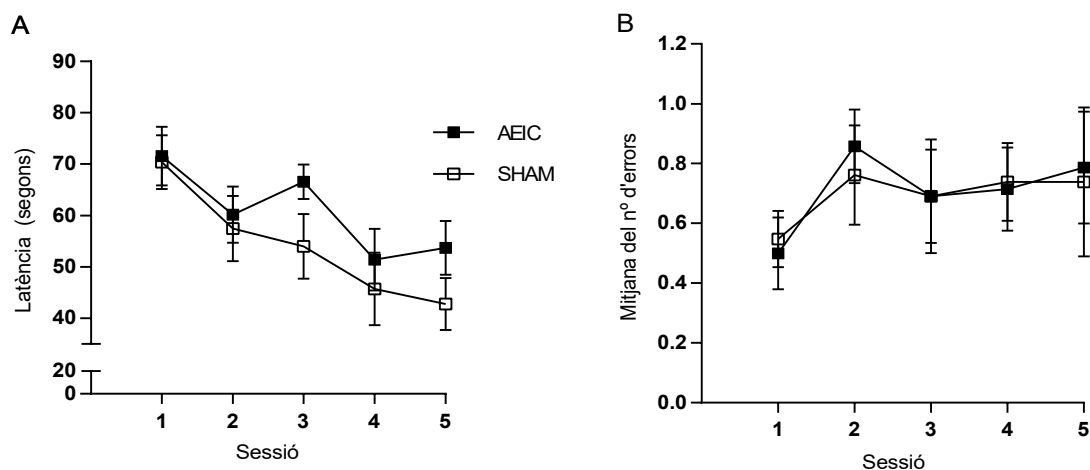
A la taula 4 es descriuen els rangs, valors mitjans i les desviacions estàndard de les variables del tractament amb AEIC, així com algunes observacions de la conducta dels animals durant el tractament.

Intensitat d'estimulació ( $\mu\text{A}$ )	Durada del tractament (minuts)	Efectes conductuals
Rang: 350 a 800	Rang: 35 a 85	Convulsions (n=1)
Mitjana: 535.71 (197.303)	Mitjana: 64.57 (20.239)	Sobreactivació (n=3)

**Taula 4 Paràmetres i efectes conductuals de les sessions d'AEIC.** Es representen els valors mitjans ( $\pm\text{DE}$ ) dels paràmetres d'AEIC del subjectes que han rebut tractament i els efectes sobre la conducta associats al tractament. Entre parèntesi es mostra el nombre de subjectes que han mostrat la conducta.

### 2.3.3 Sessions d'adquisició de la tasca de DVS

Com a indicador de l'evolució de l'aprenentatge, a la Fig.11A es mostren les *latències* dels grups AEIC i SHAM al llarg de les cinc sessions d'adquisició. L'estudi estadístic va mostrar una evolució decreixent significativa tant del grup AEIC com del SHAM al llarg de les sessions [ $F_{1,12}=17.397$ ,  $P=.001$ ]. Aquesta evolució no va dependre del grup, ja que la interacció GRUP x SESSIÓ no va resultar significativa [ $F_{4,48}=0.386$ ,  $P=.818$ ]. L'anàlisi d'efectes simples va mostrar que no hi havia diferències entre grups en cap de les sessions d'adquisició.

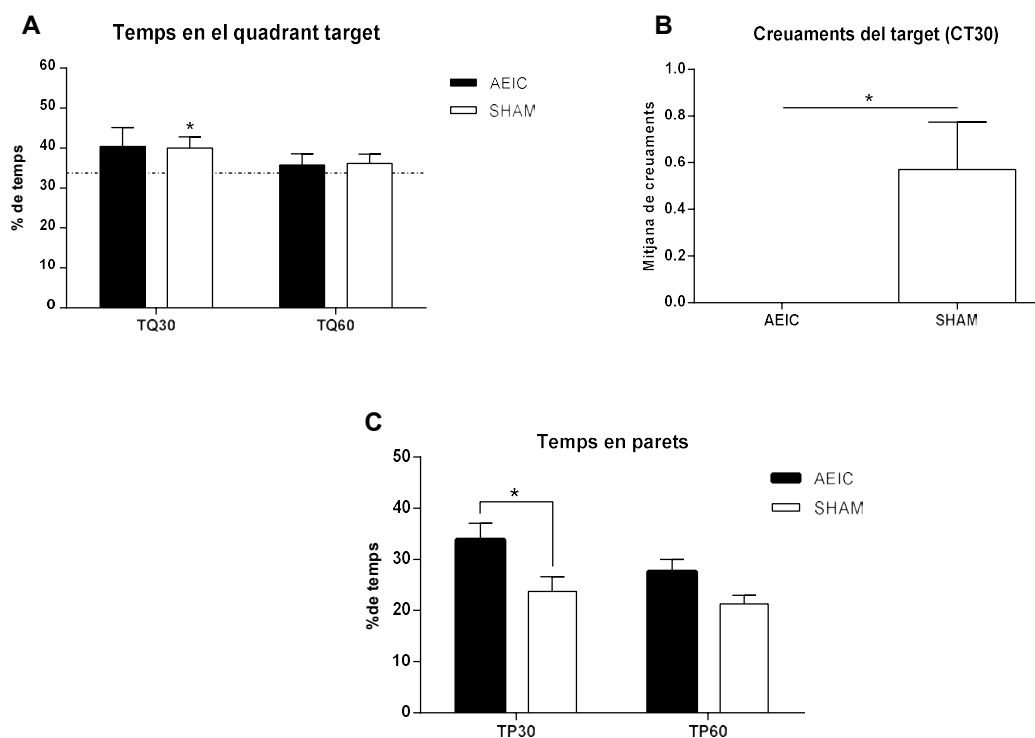


**Fig. 11 Efectes de l'AEIC en les sessions d'adquisició de la tasca de DVS.** (A) Mitjana de les latències ( $\pm\text{SE}$ ) per les 5 sessions de la fase d'adquisició. (B) Mitjana del nombre d'errors ( $\pm\text{SE}$ ) comesos durant les sessions d'adquisició.

Tampoc vam trobar diferències entre els grups AEIC i SHAM en la mitjana del nombre d'errors comesos a les sessions d'adquisició, el factor GRUP i la interacció GRUP x SESSIÓ no van ser significatius ( $[F_{1,12}=0.019$ ,  $P=.892$ ];  $[F_{4,48}=0.064$ ,  $P=.992$ ], respectivament), així com el factor intragrup SESSIÓ [ $F_{4,48}=0.922$ ,  $P=.459$ ] (Fig.11B). En relació a les variables de control, no es van observar diferències estadísticament significatives en les variables *distància*, *velocitat*, ni *percentatge de temps en parets*.

### 2.3.4 Test de retenció

Les proves *t-test* de la sessió de retenció no van mostrar diferències significatives entre els grups AEIC i SHAM en el percentatge de *temps al quadrant target* [ $t_{12}=0.122$ ,  $P=.905$ ], ni en els *creuaments del target* [ $t_{12}=1.732$ ,  $P=.109$ ], considerant la totalitat del temps de la sessió. A la primera meitat del test, els subjectes SHAM estaven més *temps al quadrant target* del que seria esperat per atzar [ $t_6=2.541$ ,  $P=.044$ ] (Fig.12A) i van fer significativament més *creuaments del target* que els del grup AEIC [ $t_{12}=2.828$ ,  $P=.030$ ] (Fig.12B). Per altra banda, vam trobar diferències en la variable de control *temps en parets*, en els primers 30 segons del test de retenció els subjectes del grup AEIC van fer significativament més tigmotaxi que els SHAM [ $t_{12}=-2.344$ ,  $P=.037$ ] (Fig.12C).



**Fig. 12 Efectes de l'AEIC al test de retenció de la tasca de DVS.** (A) TQ30 i TQ60 ( $\pm$ SE), (B) CT30 ( $\pm$ SE). (C) TP30 i TP60 ( $\pm$ SE). Abreviatures: TQ, percentatge de temps al quadrant *target*; CT, nombre de creuaments del target; TP, percentatge de temps nedant prop de les parets. La línia discontinua de la gràfica A representa el nivell d'atzar. \* $P<0.05$

### 2.3.5 Trajectòries de natació

Una anàlisi qualitativa de les estratègies de natació que els animals aplicaven per trobar la plataforma va mostrar que alguns subjectes triaven una estratègia de natació directa (Fig.13A) des del punt de sortida cap al senyal associat a la plataforma, mentre que altres aplicaven una estratègia d'assaig-error (Fig.13B) triant un dels dos senyals indistintament i anant cap a l'altre en segona opció. El test *chi-quadrat* no va mostrar

diferències entre grups en quant a les estratègies ( $\chi^2_{2,12} = 2,444, P=0.295$ ) però sí una preferència global dels animals per l'estratègia assaig-error. La taula de la figura 13C mostra els percentatge de subjectes per grup que van triar una estratègia o l'altra.

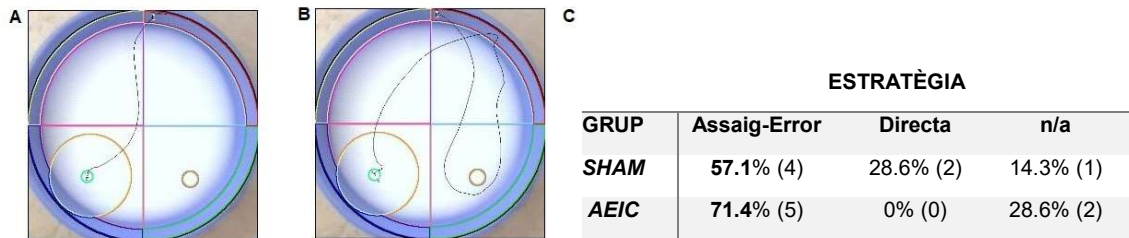


Fig.13 Estratègies de natació durant l'adquisició de la tasca de DVS. Imatges d'una estratègia directa i d'una estratègia assaig-error. El quadrant inferior esquerra es correspon amb la ubicació de la plataforma; el cercle concèntric extern és l'annulus del target i el cercle intern és el target (plataforma). (A) animal SHAM; (B) animal AEIC; (C) percentatge d'animals per grup i estratègia de natació. n/a: no aplica. La freqüència es mostra entre parèntesi a continuació dels percentatges.

### 2.3.6 Anàlisi de correlacions

Els valors de la intensitat d'estimulació, necessària per obtenir la conducta d'AEIC, i de la durada del tractament en aquest experiment es mostren a la taula 4 de l'apartat 2.3.2. L'estudi de correlacions va posar de manifest una correlació negativa entre aquests paràmetres i la conducta dels animals al test de retenció. En particular, tant la intensitat d'estimulació elèctrica (Fig.14A) com la durada del tractament (Fig.14B) van correlacionar significativament amb el percentatge de temps al quadrant target ([ $r_s = -.0879^{**}, P = .009$ ]; [ $r_s = -.0775^*, P = .041$ ], respectivament).

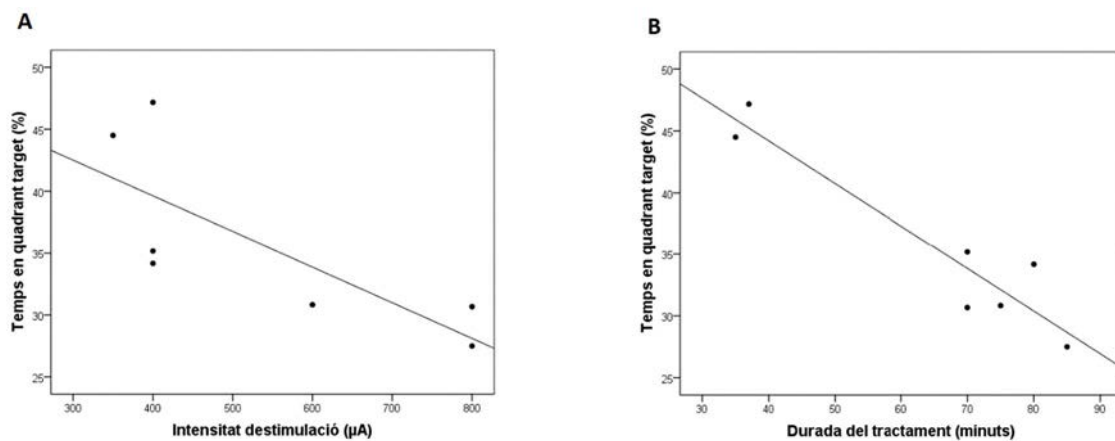


Fig. 14 Anàlisi correlacional entre variables d'AEIC i conducta. Les gràfiques mostren les correlacions significatives entre les variables del tractament amb AEIC (intensitat d'estimulació i durada del tractament) i la variable conductual temps al quadrant target del test de retenció.

### 2.3.7 Histologia

La valoració histològica de la implantació dels elèctrodes va mostrar que estaven localitzats entre les coordenades AP -1.72 mm i -2.52 mm en referència a bregma. Es va observar gliosi en el teixit on l'extrem distal de l'elèctrode exercia l'estimulació, però no es va trobar cap lesió que pogués ser críticament responsable dels resultats obtinguts.

### 2.4 Discussió

Els resultats del present estudi no van mostrar efectes de l'AEIC en l'aprenentatge durant la fase d'adquisició. Ambdós grups van aprendre la tasca de DVS per igual i tampoc vam trobar diferències en el nombre d'errors comesos, com es va veure en un estudi previ amb el mateix disseny i procediment experimental administrant AEIC d'ona sinusoidal [27]. Una anàlisi qualitativa de les trajectòries de natació dels subjectes en finalitzar la fase d'adquisició ens va aportar dades interessants per entendre aquesta manca de diferències, podria ser que els animals haguessin tingut dificultats per discriminar entre ambdós senyals o bé que haguessin triat per atzar una estratègia menys efectiva. Un nombre més elevat de subjectes va implementar una estratègia assaig-error per trobar la plataforma respecte de l'estratègia directa, això hauria pogut dificultar l'assoliment de la tasca requerint més temps per trobar la plataforma. Aquestes dades concorden parcialment amb l'estudi de Garcia-Brito i col·laboradors [27] on els subjectes del grup SHAM també van triar majoritàriament l'estratègia assaig-error, en aquell estudi el tractament semblava facilitar que els animals triessin una estratègia directa.

Les variables analitzades al test de retenció tampoc van mostrar facilitació de la memòria al grup autoestimulat, inclús arribant a aparèixer una possible interferència del tractament en l'adquisició i retenció de l'aprenentatge de la tasca de DVS. Així mateix, els resultats de les correlacions entre els paràmetres d'estimulació i la conducta van mostrar que una major intensitat d'estimulació podria estar relacionada amb una pitjor execució dels subjectes al test de retenció, aquesta dada juntament amb la millor execució en aquesta sessió per part del subjectes SHAM respecte del grup AEIC indicarien una interferència del tractament en la memòria, probablement relacionada amb una intensitat massa elevada del corrent estimulant. En un estudi d'AEIC del FPM amb ona quadrada monofàsica es van trobar efectes positius sobre la memòria amb una intensitat mitjana de 127 $\mu$ A [9] i, en general, els efectes facilitadors de l'estimulació elèctrica cerebral en estudis de memòria s'han trobat amb intensitats no superiors a 250 $\mu$ A de mitjana [7, 26, 28, 29, 155, 189, 321]. En aquest sentit, s'ha vist que els efectes

de l'estimulació elèctrica cerebral en la memòria depenen de la densitat del corrent, és a dir, de la combinació de la freqüència i la intensitat. Una alta freqüència requereix intensitats menors perquè l'estimulació sigui efectiva [30]. Intensitats d'estimulació elevades tenen efectes inhibitoris i s'administren per tractar símptomes motors en models animals [322]. Per sobre de 300µA no s'han mostrat efectives per millorar les capacitats cognitives en models animals de símptomes depressius [323]. El motiu pel qual les intensitats elevades no resultarien efectives no queda clar, però, tenint en compte els mecanismes de la DBS àmpliament acceptats [324, 325] és probable que un corrent d'intensitat elevada podria modular vies neuronals diferents o expandir-se cap a estructures anatòmiques adjacents i produir efectes inhibitoris. La taula 3 de l'apartat 1 mostra una comparativa entre els paràmetres d'AEIC on es poden observar els valors d'intensitat anormalment elevats en el present experiment.

Experiments previs no publicats del nostre laboratori [148] van mostrar que els subjectes que rebien un tractament d'AEIC amb ona quadrada, amb els mateixos paràmetres que els del present experiment, no presentaven signes d'*arousal* perifèric com els observats en animals autoestimulats amb ona sinusoidal. Això indicaria diferències importants en l'efecte de l'AEIC d'ona quadrada amb aquests paràmetres, probablement involucrant altres àrees cerebrals i no produint un efecte tant reforçant com amb ona sinusoidal.

Una altra explicació plausible i compatible amb l'anterior del perquè l'AEIC pot interferir en la tasca de DVS al LAM estaria relacionada amb l'ansietat, un dels principals símptomes de l'estrès agut. En el present experiment, vam veure com l'AEIC causava major tigmotaxi i menor nombre de creuaments del *target*, per tant, creiem que el tractament hauria tingut uns efectes ansiogènics que podrien haver dificultat la tasca associativa de DVS. Els nostres resultats concorden amb els de Warner i col·laboradors [326], en els seus experiments van trobar que els animals exposats a un estrès agut presentaven pitjor execució en una tasca espacial al LAM, probablement degut a una afectació hipocampal, a dèficits de memòria deguts a l'estrès [327] o al fet d'haver triat una estratègia menys eficient [328]. En rosegadors, l'estrès agut sembla activar l'eix hipotàlem-pituïtària-adrenal fent que s'alliberin glucocorticoides com la corticosterona (hormona de l'estrès). L'estrès agut produeix un increment de corticosterona en sang [329] i tant l'estrès agut com l'administració de glucocorticoides afecten la memòria espacial [330]. La tasca de DVS és una tasca de memòria implícita i no espacial, no obstant, el fet de produir-se un aprenentatge associatiu entre estímuls implica l'activació de l'HPC. Per tant, la DVS pot veure's afectada per l'ansietat de la mateixa manera que una tasca espacial.

En conclusió, l'AEIC amb els paràmetres de corrent elèctric aplicats en aquest experiment no va semblar efectiva per facilitar els processos d'aprenentatge i memòria avaluats amb la tasca de DVS. El fet que es necessités una intensitat d'estimulació molt elevada per obtenir la conducta d'AEIC podria haver interferit en la retenció de la tasca apresada. Per tant, en l'Experiment II d'aquest primer bloc vam buscar uns paràmetres del corrent elèctric estimulant que ens permetessin reduir la intensitat d'estimulació necessària per obtenir la conducta d'AEIC.





### **3. EXPERIMENT II**

#### **3.1 Introducció**

L'AEIC post-entrenament administrada en el primer experiment d'aquest bloc, no va produir un efecte facilitador de la tasca de DVS, fins i tot semblava interferir en la seva retenció. Els subjectes del grup AEIC van tendir a fer latències superiors respecte dels SHAM i van cometre el mateix nombre d'errors. A partir dels resultats obtinguts vam concloure que una intensitat d'estimulació massa elevada podria haver dificultat l'aprenentatge i interferit amb la memòria en el test de retenció. Per aquest motiu, vam realitzar aquest segon experiment amb uns paràmetres d'estimulació elèctrica que permetessin obtenir la conducta d'AEIC amb una intensitat d'estimulació més baixa. Així doncs, vam augmentar la freqüència i la durada del pols.

#### **3.2 Material i procediment**

En aquest segon experiment es van utilitzar un total de 14 rates de la soca Wistar de 94.31 dies (DE=3.47) d'edat i un pes mitjà de 355.85g (DE=18.22) a l'inici de l'experiment. Tot allò referent a ètica i benestar animal, tipus i procedència dels animals, procediments quirúrgics i coordenades d'implantació dels elèctrodes, adquisició de la conducta d'AEIC, aparells, anàlisi estadística de les dades, modelament, assignació a grups experimentals, tractament d'AEIC (excepte els paràmetres del corrent elèctric), adquisició de l'aprenentatge, test de retenció i anàlisi histològica es va realitzar de manera idèntica a l'Experiment I. Els Experiments I i II del bloc I es van solapar parcialment en el temps, permetent-nos usar els mateixos subjectes del grup SHAM per ambdós experiments.

#### **Paràmetres del corrent elèctric**

D'acord amb el nostre objectiu vam aplicar uns paràmetres que permetessin obtenir la conducta d'AEIC amb intensitats més baixes que en l'experiment anterior. Concretament, vam augmentar la durada i freqüència dels polsos de manera que cada estimulació consistia en un tren de 300ms a una freqüència de 200Hz, format per 60 polsos dobles d'ona quadrada (1 pols positiu seguit d'1 pols negatiu) de 0.5ms de durada cada pols doble (Fig.15). Tots els paràmetres del corrent estimulant, excepte la intensitat es van mantenir fixos al llarg de tot l'experiment.

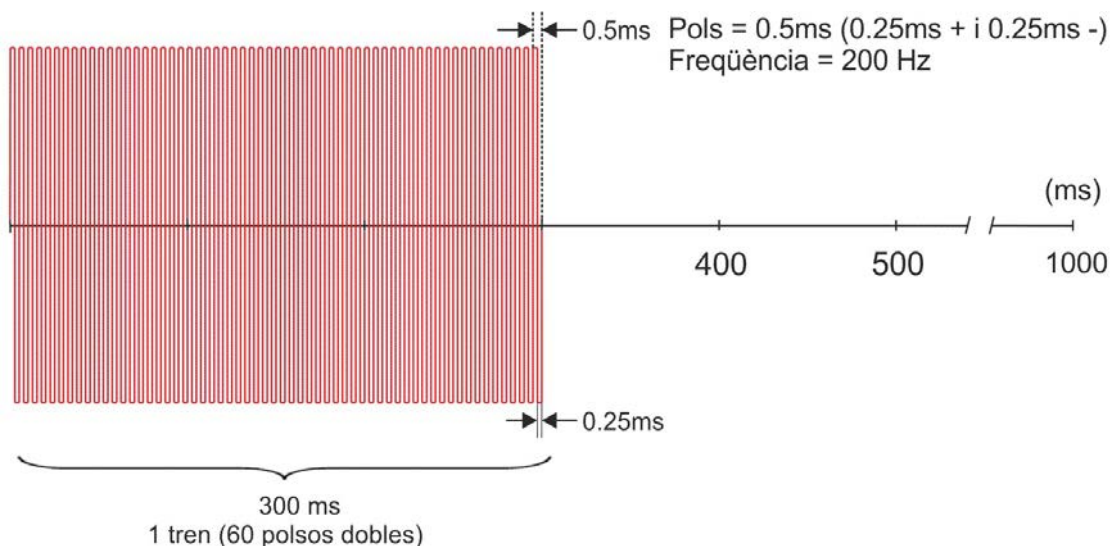


Fig. 15 Paràmetres del corrent elèctric amb ona quadrada de l'Experiment II. Tren d'AEIC complet de 300ms amb la distribució real dels polsos en 1s.

### 3.3 Resultats

#### 3.3.1 Subjectes

Un control regular del pes dels subjectes va permetre controlar els canvis en la salut que podrien haver afectat l'aprenentatge. L'anàlisi *t-test* de comparació de mitjanes va indicar que els grups partien de pesos estadísticament iguals a l'inici de l'experiment. En canvi, vam trobar diferències de pes entre l'inici i el final de l'experiment, les rates del grup AEIC havien guanyat significativament més pes que les del grup SHAM [ $t_{11}=-9.801$ ,  $P<.0001$ ]. Al llarg de l'estudi es va excloure un subjecte que presentava problemes oftalmològics que li impedien dur a terme la tasca de discriminació visual. La mostra final va constar de 13 subjectes (SHAM:  $n=7$ , AEIC:  $n=6$ ).

#### 3.3.2 Paràmetres d'AEIC

A la taula 5 es descriuen els rangs, valors mitjans i les desviacions estàndard de les variables d'AEIC, així com algunes observacions de la conducta dels animals durant el tractament.

Intensitat d'estimulació ( $\mu\text{A}$ )	Durada del tractament (minuts)	Efectes conductuals
Rang: 140 a 200	Rang: 50 a 150	Aturades ( $n=4$ )
Mitjana: 173.3 (23.381)	Mitjana: 90.67 (38.852)	Sobreactivació ( $n=1$ )

Taula 5 Paràmetres i efectes conductuals de les sessions d'AEIC. Es representen els valors mitjans ( $\pm\text{DE}$ ) dels paràmetres d'AEIC del subjectes que van rebre tractament i els efectes sobre la conducta associats al tractament. Entre parèntesi es mostra el nombre de subjectes que van mostrar la conducta.

### 3.3.3 Sessions d'adquisició de la tasca de DVS

L'estudi de l'evolució de les *latències* com a índex de l'aprenentatge (MLG de mesures repetides) va mostrar una tendència lineal decreixent al llarg de les 5 sessions d'adquisició [ $F_{1,11}=16.771$ ,  $P=.002$ ], similar pels dos grups experimentals [factor interacció GRUP x SESSIÓ n.s.]. Com s'observa a la Fig.16A, ambdós grups van presentar un nivell d'aprenentatge similar al llarg de les sessions. L'anàlisi d'efectes simples va mostrar que no hi havia diferències entre les latències dels dos grups en cap de les sessions. Pel que fa al *nombre d'errors* comesos en les sessions d'adquisició, malgrat que ni el factor GRUP [ $F_{1,11}=1.255$ ,  $P=.286$ ] ni la interacció GRUP x SESSIÓ [ $F_{1,11}=0.679$ ,  $P=.427$ ] van resultar significatius, es va veure un efecte del GRUP considerant les 4 primeres sessions [ $F_{1,11}=5.007$ ,  $P=.047$ ] (Fig.16B), en el sentit que el grup AEIC cometia menys errors que el SHAM. En relació a les variables de control, tampoc es van trobar diferències estadísticament significatives en la *distància* mitjana recorreguda i la *velocitat* de natació, però els subjectes del grup AEIC van tendir a passar més *temps en parets* que els del grup SHAM [ $F_{1,11}=4.275$ ,  $P=.063$ ] (Fig.16C).

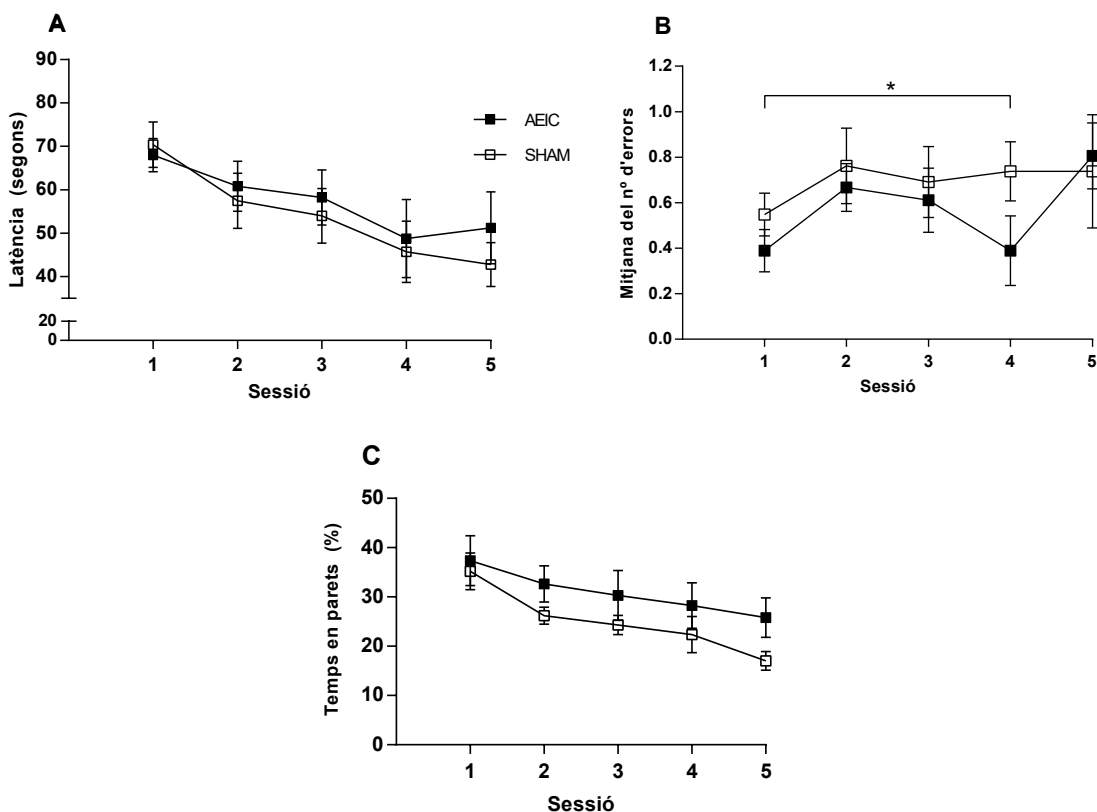


Fig. 16 Efectes de l'AEIC en les sessions d'adquisició. (A) *latència* mitjana ( $\pm$ SE) per les 5 sessions, (B) mitjana del *nombre d'errors* ( $\pm$ SE) comesos durant les sessions i (C) percentatge de *temps en parets* com a mesura de tigmotaxi. La significació del factor GRUP es mostra en un parèntesi horitzontal. \* $P<.05$ .

### 3.3.4 Test de retenció

Els resultats de les anàlisis *t-test* de la sessió de retenció no van mostrar diferències significatives entre els grups AEIC i SHAM en el *temps al quadrant target* [ $t_{11}=0.755$ ,  $P=.466$ ], ni en els *creuaments del target* [ $t_{11}=0.186$ ,  $P=.855$ ]. En canvi, contràriament a l'esperat i considerant la primera meitat del test retenció, els subjectes SHAM van tendir a estar més *temps al quadrant target* [ $t_{11}=2.145$ ,  $P=.055$ ] i s'hi van estar significativament més temps del que seria esperat per atzar [ $t_6=2.541$ ,  $P=.044$ ] (Fig.17A). També van estar significativament més *temps a l'annulus del target* [ $t_{11}=2.428$ ,  $P=.034$ ] que els del grup AEIC (Fig.17B).

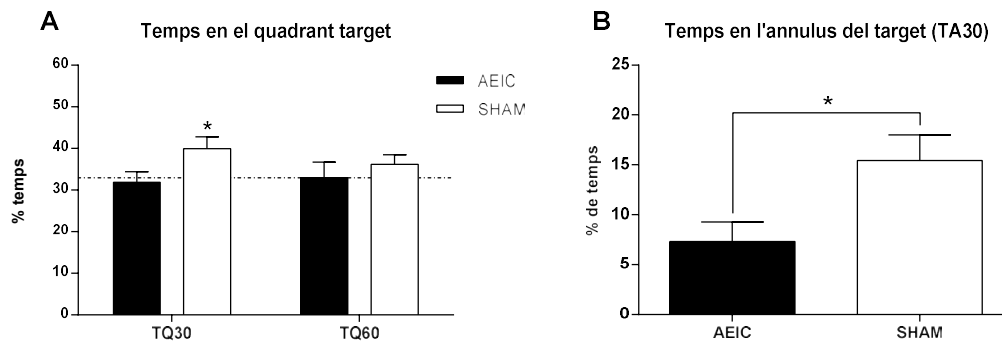


Fig. 17 Efectes de l'AEIC al test de retenció de la tasca de DVS. (A) TQ30 i TQ60 ( $\pm$ SE), (B) TA30 ( $\pm$ SE). Abreviatures: TQ, percentatge de *temps al quadrant target*; TA, percentatge de *temps en l'annulus del target*. La línia discontinua de la gràfica A representa el nivell d'atzar. \* $P<0.05$

### 3.3.5 Trajectòries de natació

Tal com vam veure a l'Experiment I, l'anàlisi qualitativa de les estratègies de natació va posar de manifest que alguns subjectes triaven una estratègia de natació directa (Fig.18A), mentre que altres aplicaven una estratègia d'assaig-error (Fig.18B). Un test de *chi-quadrat* no va mostrar diferències entre grups pel que fa a les estratègies ( $X^2_{2,11}=2.270$ ,  $P=.321$ ). La taula de la figura 18C mostra el percentatge de subjectes per grup que triaven una estratègia o l'altra. En el global dels dos grups l'estratègia assaig-error va ser la triada majoritàriament.

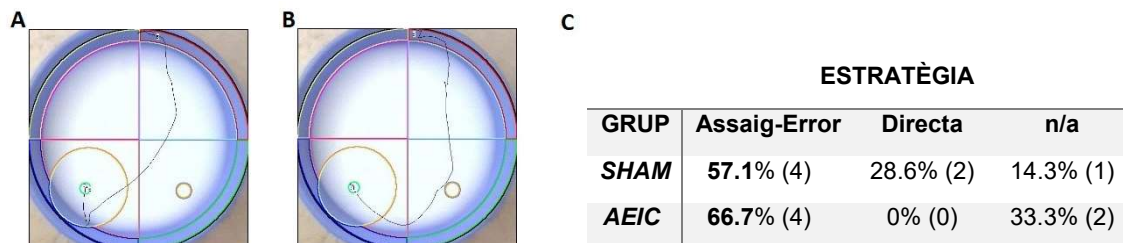


Fig. 18 Estratègies de natació durant l'adquisició de la tasca de DVS. Imatges d'una estratègia directa i d'una estratègia assaig-error. El quadrant inferior esquerra es correspon amb la ubicació de la plataforma; el cercle concèntric extern és l'annulus del target i el cercle intern és el target (plataforma). (A) animal SHAM; (B) animal AEIC; (C) percentatge d'animals per grup i estratègia de natació. n/a: no aplica. La freqüència es mostra entre parèntesi a continuació dels percentatges.

### 3.3.6 Anàlisi de correlacions

La intensitat d'estimulació necessària per obtenir la conducta d'AEIC en aquest segon experiment i la durada del tractament es descriuen a l'apartat 3.2.2. L'estudi correlacional entre aquests paràmetres d'estimulació i la conducta dels animals a la tasca de DVS va mostrar una alta correlació positiva i significativa entre la *durada del tractament* i el *temps al quadrant target* del test de retenció [ $r_s=0.943^{**}$ ,  $P=.005$ ] (Fig. 19). No es van trobar correlacions significatives destacables entre la intensitat del tractament i la resta de variables d'estudi i de control.

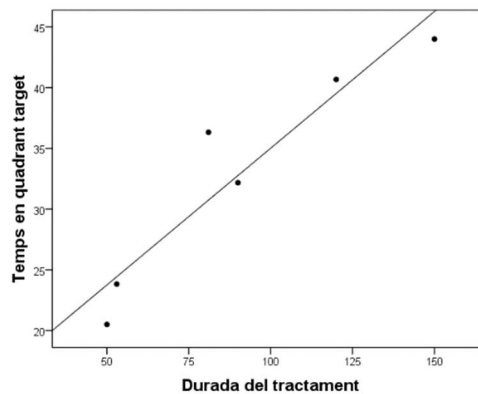


Fig. 19 **Estudi de correlacions entre variables d'AEIC i conducta.** Representació gràfica de la *durada del tractament* i el seu correlat amb el percentatge de *temps al quadrant target* al test de retenció.

### 3.3.7 Histologia

La valoració histològica de la implantació dels elèctrodes va mostrar que estaven localitzats entre les coordenades AP -1.92 mm i -2.76 mm en referència a bregma, d'acord amb l'atles estereotàxic [320]. No es va observar cap lesió en aquest teixit ni en estructures adjacents.

### 3.4 Discussió

En aquest segon experiment, l'AEIC no va semblar haver estat eficaç per facilitar l'aprenentatge durant les sessions d'adquisició si tenim en compte les latències. Per aquesta variable, els resultats van ser molt similars a l'experiment anterior. No obstant, vam trobar que en les quatre primeres sessions d'adquisició hi havia una evolució significativa dels animals autoestimulats a cometre menys errors que els SHAM. Aquests resultats concorden parcialment amb els de Garcia-Brito i col·laboradors [27], en el seu treball van trobar diferències entre grups en el nombre d'errors comesos durant l'adquisició de l'aprenentatge. Així mateix, en un estudi de DVS al LAM en què es lesionava el nucli caudat de les rates tampoc es van observar diferències entre grups

amb lesió i *sham* en les latències per trobar la plataforma, sinó en el nombre d'errors [303]. Una possible explicació del perquè aquests efectes en l'adquisició no es van manifestar a la retenció podria ser l'aparició d'un estat d'estrès agut o ansietat en els animals. Els subjectes del grup AEIC semblaven presentar respostes conductuals d'ansietat, ja que van mostrar una tendència a fer més tigmotaxi que els SHAM. El possible efecte ansiogènic del tractament hauria dificultat el record de la tasca apresada com es va observar al test de retenció, semblava que els subjectes SHAM recordaven millor que els autoestimulats la ubicació aproximada de la plataforma.

Una variable a destacar en aquest estudi va ser la diferència significativa en l'evolució dels pesos dels animals al llarg de l'experiment. Tal com ja van introduir diversos estudis pioners d'estimulació elèctrica cerebral, l'estimulació del FPM a nivell de l'HL no només està relacionada amb el reforç sinó també amb respostes homeostàtiques d'ingesta d'aliments [331]. En estudis de lesions electrolítiques de l'HL es va veure que les lesions suprimien la conducta de menjar [53] mentre que l'estimulació elèctrica d'aquesta àrea desencadenava una ingesta voraç en rates [331, 332] i altres espècies [55, 333, 334], inclús en humans [335]. Un estudi recent de DBS al NAcc per tractar pacients amb TOC [336] va trobar que 5 dels 18 pacients havien experimentat un augment de pes significatiu des de l'inici del tractament. És possible que l'AEIC, amb la configuració de paràmetres del present treball, hagués produït un increment en la ingesta d'aliment i conseqüentment en el pes dels animals autoestimulats, però no ho podem afirmar de manera categòrica ja que no vam fer un control exhaustiu de les quantitats d'aliment ingerit al llarg del procés experimental.

Per altra banda, alguns estudis neurofisiològics van indicar que la implantació d'un elèctrode a l'HL podia produir respostes diferents en funció de la zona específica d'implantació (central o perifèrica) en aquest nucli. Els subjectes estimulats en una zona més perifèrica van presentar conducta d'ingesta i major motivació que aquells estimulats en una zona més central [337], suggerint que les vies activades per la conducta d'ingesta estaven anatòmicament dissociades de les del reforç. Malgrat que les vies considerades responsables de l'AEIC semblen ser diferents a les activades per l'administració remota de l'estimulació elèctrica cerebral [338] també es van trobar efectes d'augment de la ingesta i conseqüent augment de pes en animals autoestimulats [339]. Si l'augment de pes corporal dels animals que van rebre AEIC era degut a la ingesta, i si aquest augment estava relacionat amb al lloc d'implantació de l'elèctrode o els paràmetres d'ona aplicats, no queda clar. Probablement la hipòtesi més plausible sigui que els paràmetres d'ona del corrent elèctric estimulador estiguin implicats en aquest efecte, ja que en la majoria de treballs amb AEIC del FPM no es van reportar aquestes diferències entre grups en

el pes corporal, tant si el tractament s'aplicava amb ona quadrada [9] com sinusoidal [6, 12, 27, 133, 136].

La DBS d'alta freqüència (>100Hz) es va mostrar efectiva per millorar la memòria en models animals d'Alzheimer [156, 157], facilitant la memòria de reconeixement i restablint els dèficits de memòria espacial depenent de l'HPC. Un tractament de DBS d'alta freqüència al fòrnix també va resultar efectiu en models animals de dany cerebral traumàtic [158] per facilitar els dèficits d'aprenentatge i memòria associats, per tant, en aquest experiment vam seguir aplicant una AEIC d'alta freqüència com en l'experiment anterior. Tal com ens havíem plantejat a l'inici d'aquest experiment, incrementant la freqüència vam poder reduir la intensitat d'estimulació necessària per tal que els subjectes realitzessin la conducta d'AEIC. Tot i així, no vam obtenir els resultats previstos, probablement per un efecte diferent a l'esperat sobre vies neurals relacionades amb la ingesta, o bé per un efecte ansiogènic del tractament.

L'administració de DBS al fòrnix a 100 i 50Hz de freqüència d'estimulació es va mostrar efectiva per facilitar la memòria en models animals de la malaltia d'Alzheimer [30], i quan s'administrava al còrtex entorrinal a 50Hz produïa una millora en la memòria espacial [204]. A més, els estudis que van aplicar DBS del FPM o àrees directament relacionades amb el sistema del reforç utilitzaven freqüències de 130Hz [200, 321]. Un estudi de DBS administrada al FPM en un model animal de depressió, a una freqüència de 130Hz [316], ja va trobar efectes ansiogènics del tractament. Així doncs, i si tenim en compte que la freqüència de 200Hz és bastant superior a les utilitzades en els experiments comentats anteriorment, creiem que el corrent d'alta freqüència administrat en el present experiment podria haver estat responsable dels efectes d'ansietat observats en els animals autoestimulats, i de la manca d'efectes de facilitació de la memòria.

Així doncs, per l'Experiment III vam modificar els paràmetres del corrent elèctric administrat, mantenint la durada dels trens però canviant a un paradigma d'estimulació de baixa freqüència amb polsos de llarga durada, amb l'objectiu d'assimilar-lo a l'administrat al nostre laboratori amb corrent d'ona sinusoidal. Al mateix temps, amb aquests paràmetres d'ona, també buscàvem obtenir la conducta d'AEIC amb una intensitat d'estimulació moderada.





## **4. EXPERIMENT III**

### **4.1. Introducció**

Malgrat els canvis de configuració dels paràmetres del corrent per l'AEIC aplicats a l'experiment anterior, tampoc vam trobar efectes facilitadors del tractament en l'adquisició de l'aprenentatge ni en la seva retenció. Els subjectes que van rebre AEIC van presentar certa tendència a cometre menys errors que els SHAM però igualment vam trobar indicis d'una interferència de l'AEIC en la retenció de la tasca de DVS. Donat que pels dos experiments previs havíem aplicat uns paràmetres d'ona d'alta freqüència amb polsos de curta durada, en aquest, vam decidir aplicar polsos de més llarga durada i reduir la freqüència d'estimulació per tal de trobar efectes de facilitació de la memòria. Per fer aquests canvis, ens vam basar en experiment del nostre laboratori que havien trobat efectes amb ona sinusoidal de 50Hz de freqüència i polsos d'una durada aproximada de 20-30ms [9, 11, 12, 64, 133]. Altres estudis també van trobar efectes positius sobre la memòria amb freqüències inclús més baixes (7.7Hz) [155, 340]. Així, vam aplicar unes condicions d'AEIC, amb corrent de baixa freqüència i polsos de llarga durada però mantenint la mateixa durada del tren que permetessin igualment obtenir la conducta d'AEIC amb una intensitat d'estimulació moderada.

### **4.2 Material i procediment**

En aquest tercer experiment vam utilitzar un total de 23 rates de la soca Wistar, de 92.32 dies (DE=2.67) d'edat i un pes mitjà de 344.05g (DE=17.47) a l'inici de l'experiment. Tot allò referent a ètica i benestar animal, tipus i procedència dels animals, procediments quirúrgics i coordenades d'implantació dels elèctrodes, adquisició de la conducta, aparells, anàlisi estadística de les dades, modelament, assignació a grups experimentals, tractament d'AEIC (excepte els paràmetres del corrent elèctric), adquisició de l'aprenentatge, test de retenció i anàlisi histològica es van realitzar de manera idèntica als experiments anteriors.

#### **Paràmetres del corrent elèctric**

D'acord amb el nostre objectiu, la configuració dels paràmetres del corrent elèctric del present experiment va quedar de la següent manera: cada estimulació era un tren de 300ms de durada, a una freqüència de 33Hz, format per 10 polsos bifàsics d'ona quadrada (1pols positiu seguit d'1 pols negatiu) de 30ms de durada cada pols doble (Fig.20). Tots els paràmetres del corrent estimulant excepte la intensitat es van mantenir fixos al llarg de l'experiment.

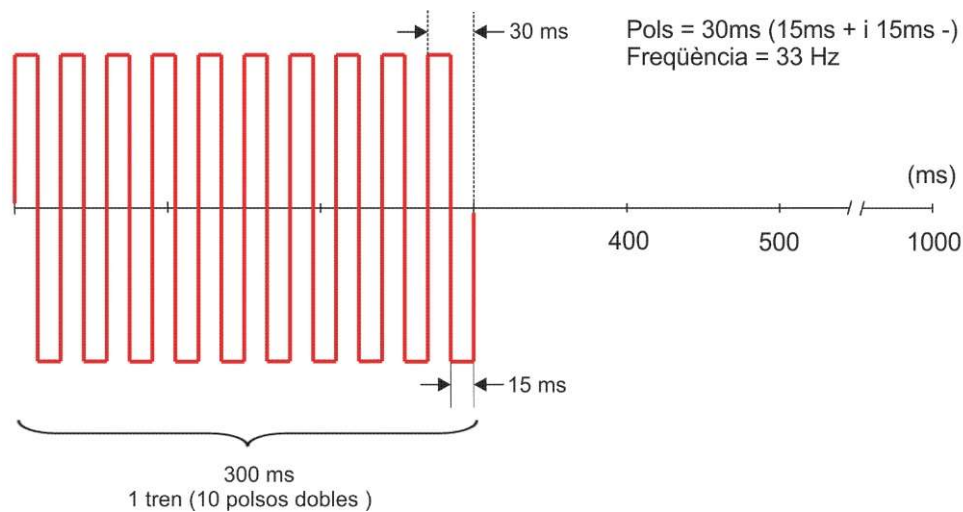


Fig. 20 Paràmetres del corrent elèctric amb ona quadrada de l'Experiment III. Representació gràfica d'un tren d'AEIC complet de 300ms amb la distribució real dels polsos en 1s.

### 4.3 Resultats

#### 4.3.1 Subjectes

L'anàlisi estadística va indicar que els grups partien de pesos similars a l'inici de l'estudi i no vam trobar diferències significatives entre els grups en l'evolució del pes corporal al llarg de les diferents fases experimentals. En el decurs de l'experiment vam excloure 4 subjectes que presentaven estereotípies molt marcades que els impedièren modelar i/o executar la conducta d'AEIC. La mostra final va constar de 19 subjectes (SHAM: n=8, AEIC: n=11).

#### 4.3.2 Paràmetres d'AEIC

La taula 6 mostra els rangs, valors mitjans i les desviacions estàndard de les variables d'AEIC, així com algunes observacions de la conducta dels animals durant el tractament.

Intensitat d'estimulació ( $\mu\text{A}$ )	Durada del tractament (minuts)	Efectes conductuals
Rang: 65 a 150	Rang: 25 a 88	Aturades (n=3)
Mitjana: 106.82 (24.421)	Mitjana: 53.09 (19.455)	Convulsions (n=2)
		Estereotípies (n=4)

Taula 6 Paràmetres i efectes conductuals de les sessions d'AEIC. Es representen els valors mitjans ( $\pm$ DE) dels paràmetres d'AEIC del subjectes que van rebre tractament i els efectes sobre la conducta associats al tractament. Entre parèntesi es mostra el nombre de subjectes que van mostrar la conducta.

### 4.3.3 Sessions d'adquisició de la tasca de DVS

L'estudi de mesures repetides de l'evolució de les latències, com a índex d'aprenentatge, va mostrar una tendència lineal decreixent dels grups al llarg de les 5 sessions d'adquisició [ $F_{1,17}=12.427$ ,  $P=.003$ ]. Aquesta evolució no va dependre del grup (factor interacció GRUP x SESSIÓ n.s.) i, com s'observa a la Fig.21A, ambdós grups van presentar un nivell d'aprenentatge similar al llarg de les sessions. El factor SESSIÓ va resultar significatiu [ $F_{4,68}=5.203$ ,  $P=.001$ ] però no es van trobar diferències en el factor GRUP [ $F_{1,17}=0.612$ ,  $P=.445$ ]. L'anàlisi d'efectes simples va mostrar diferències estadísticament significatives entre les latències dels dos grups en la primera sessió d'adquisició ( $P=.002$ ). No hi van haver diferències entre grups en la mitjana del *nombre d'errors* comesos a les sessions d'adquisició, els factor GRUP i SESSIÓ [ $F_{1,17}=0.149$ ,  $P=.704$ ;  $F_{4,68}=0.707$ ,  $P=.590$  respectivament], i la interacció GRUP x SESSIÓ [ $F_{4,68}=0.488$ ,  $P=.744$ ] no van resultar significatius (Fig.21B).

En relació a les variables de control, no vam trobar diferències significatives en el *temps en parets* i la *distància* mitjana recorreguda. Per la *velocitat* de natació, el factor SESSIÓ era significatiu [ $F_{4,68}=3.930$ ,  $P=0.006$ ], però no ho van ser el GRUP ni la interacció GRUP x SESSIÓ [ $F_{1,17}=1.426$ ,  $P=.249$ ;  $F_{4,68}=1.820$ ,  $P=.135$  respectivament]. L'anàlisi d'efectes simples va mostrar diferències significatives a la tercera sessió ( $P=.037$ ) (Fig.21C).

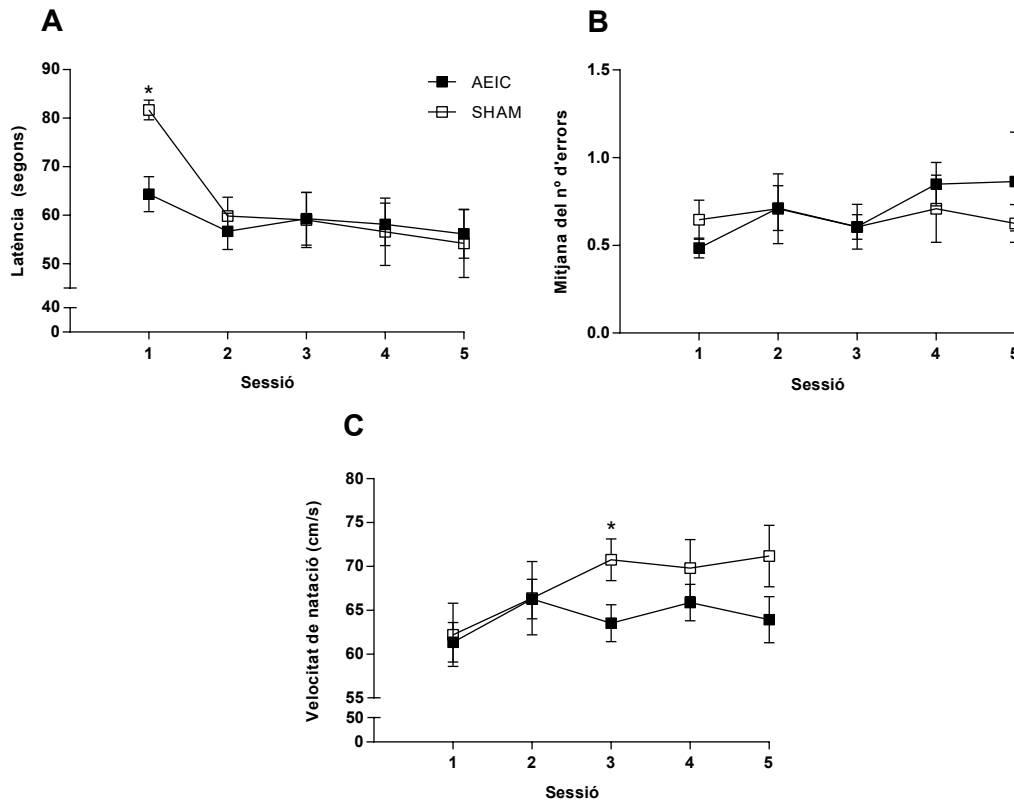
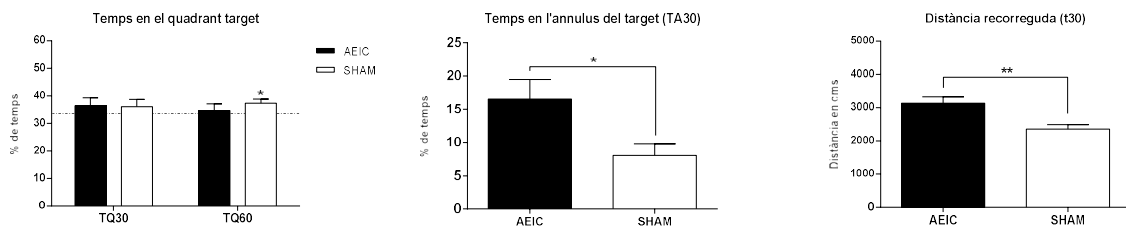


Fig. 21 Efectes de l'AEIC en les sessions d'adquisició de l'aprenentatge. (A) Mitjana de latències ( $\pm$ SE) a les 5 sessions d'adquisició. (B) Mitjana del nombre d'errors ( $\pm$ SE) comesos durant les sessions per cada grup i sessió. (C) Velocitat mitjana de natació per cada grup i sessió. \* $P<0.05$

### 4.3.4 Test de retenció

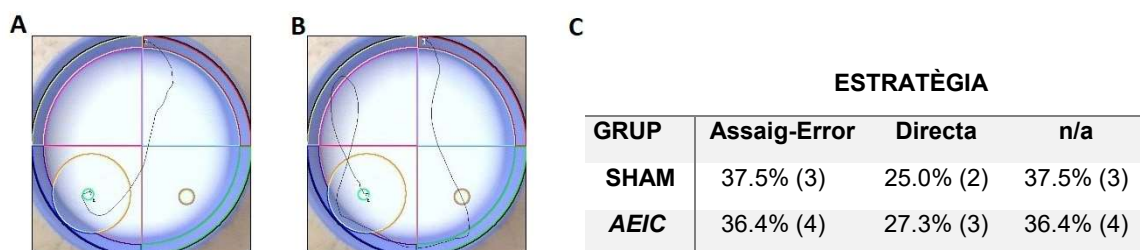
Els resultats de les proves *t-test* de la sessió de retenció no van mostrar diferències significatives entre els grups en el *temps al quadrant target*, tant per la sessió global [ $t_{17}=0.839$ ,  $P=.413$ ] com per la primera meitat [ $t_{17}=-0.099$ ,  $P=.922$ ]. En canvi, contràriament a l'esperat i considerant el test de retenció en global, els subjectes SHAM van estar més *temps al quadrant target* respecte de l'atzar [ $t_7=2.742$ ,  $P=.029$ ] (Fig.22A) indicant que aquest grup recordava on era la plataforma i el grup AEIC no. El subjectes del grup AEIC van estar significativament més *temps a l'annulus del target* que els subjectes SHAM, durant els primers 30 segons del test de retenció [ $t_{19}=-2.235$ ,  $P=.039$ ] (Fig.22B) i van recórrer significativament més distància que els SHAM [ $t_{17}=-2.360$ ,  $P=.032$ ] en els primers 30 segons del test [ $t_{19}=-3.073$ ,  $P=.007$ ] (Fig.22C). En la resta de variables d'estudi i control no vam trobar diferències significatives entre grups.



**Fig. 22 Efectes de l'AEIC sobre la memòria al test de retenció.** (A) TQ30 i TQ60: percentatge de *temps al quadrant target* a la primera meitat del test i global ( $\pm$ SE); (B) TA30: percentatge de *temps a l'annulus del target* a la primera meitat del test ( $\pm$ SE); (C) *Distància* recorreguda a la primera meitat del test de retenció ( $\pm$ SE). La línia discontinua de la gràfica A representa el nivell d'atzar. \* $P<0.05$ . \*\* $P<0.01$

### 4.3.5 Trajectòries de natació

A diferència dels experiments previs, l'anàlisi qualitativa de les estratègies de natació no va indicar una preferència per una estratègia directa (Fig.23A) o una estratègia d'assaig-error (Fig.23B). El test de *chi-quadrat* no va posar de manifest diferències entre grups pel que fa a les estratègies observades ( $\chi^2_{2,17}=0.012$ ,  $P=.994$ ). La taula de la figura 23C mostra els percentatge de subjectes per grup que van triar una estratègia o l'altra.



**Fig. 23 Estratègies de natació durant la fase d'adquisició.** Imatges d'una estratègia directa (A) i d'una estratègia assaig-error (B). El quadrant inferior esquerra correspon amb la ubicació de la plataforma; el cercle concèntric extern és l'*annulus del target* i el cercle intern és el *target* (plataforma). (A) animal del grup AEIC; (B) animal del grup SHAM; (C) percentatge d'animals per grup i estratègia de natació. n/a: no aplica. La freqüència es mostra entre parèntesi a continuació dels percentatges.

### 4.3.6 Histologia

La valoració histològica de la implantació dels elèctrodes va mostrar que es localitzaven entre les coordenades AP -1.56 mm i -3.24 mm en referència a bregma, d'acord amb l'atles estereotàxic [320]. No es va observar cap lesió al teixit.

### 4.3.7 Anàlisi de correlacions

La intensitat d'estimulació necessària per obtenir la conducta d'AEIC en aquest tercer experiment i la durada del tractament es descriuen a l'apartat 4.3.2. L'estudi correlacional entre la *durada del tractament* i el percentatge de *temps al quadrant target* al test de retenció va mostrar una alta correlació positiva i significativa. Aquestes correlacions es van trobar tant pel global del test [ $r_s = .886^{**}$ ,  $P < .0001$ ] (Fig.24A) com per la primera meitat [ $r_s = .919^{**}$ ,  $P < .0001$ ] (Fig.24B).

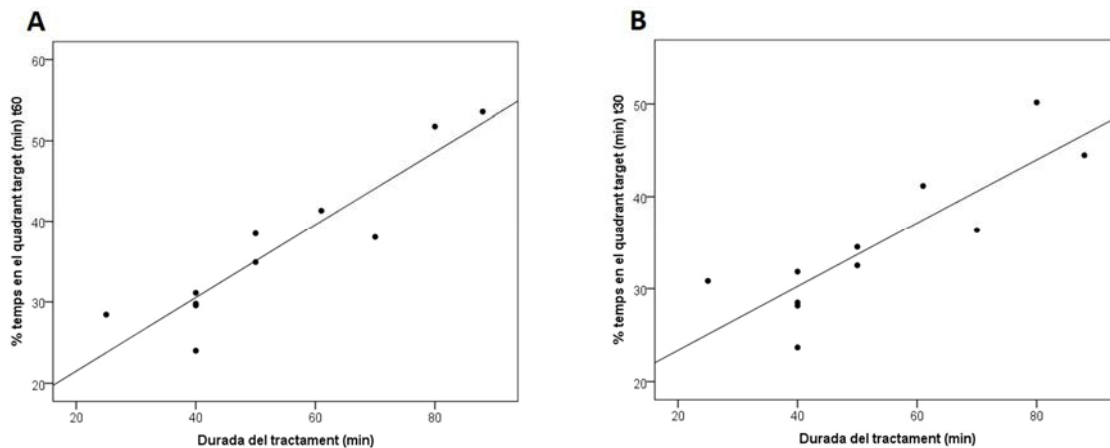


Fig. 24 Representació gràfica de correlacions entre variables d'AEIC i conducta. Correlació entre la *durada del tractament* amb AEIC i el percentatge de temps que els animals estaven al quadrant *target* durant el test de retenció. (A) test de retenció global (t60); (B) primera meitat del test de retenció (t30).

## 4.4 Discussió

En aquest tercer experiment tampoc vam veure efectes del tractament en l'adquisició de la tasca de DVS; tots els animals, tant del grup AEIC com SHAM van aprendre per igual. A diferència del que vam veure a l'experiment anterior, en aquest no es van observar diferències en el nombre d'errors al llarg de les sessions d'adquisició. Per altra banda, els animals autoestimulats van nedar més lentament que els SHAM, això podria indicar certs efectes ansiolítics del tractament a diferència del que havíem vist en els experiments anteriors, o bé, podria ser degut al fet que els animals autoestimulats ja havien començat la fase d'adquisició presentant latències significativament inferiors a les del grup SHAM, és a dir, sabien on era la plataforma i per aquest motiu presentaven

nivells menors d'ansietat. Al test de retenció els subjectes del grup AEIC van passar més temps a l'*annulus* del *target* i van nedar més distància que els SHAM. Les diferències en la *distància* recorreguda podrien ser degudes a l'efecte de l'AEIC sobre l'activitat motora per un *arousal* anormalment incrementat, o bé, a una major motivació per trobar la plataforma. Aquesta última opció sembla la més plausible, ja que un major temps en l'*annulus* indicaria major record de la ubicació de la plataforma, per tant, els animals haurien buscat amb més interès que els que no ho recordaven tan bé. A més, considerar que els animals autoestimulats presentaven un *arousal* anormalment elevat no encaixaria amb els resultats de la fase d'adquisició, on vam veure que aquests animals nedaven més lentament que els SHAM malgrat no mostrar diferències en l'aprenentatge. No obstant, no podem considerar que al test de retenció trobéssim efectes de l'AEIC en la memòria perquè els resultats de l'estudi del temps al quadrant *target* van indicar que els animals del grup AEIC no recordaven on era plataforma mentre que els del grup SHAM sí que ho recordaven, considerant el global del test de retenció. A diferència del que havíem observat als Experiments I i II, en el present treball vam veure que tant els subjectes AEIC com els SHAM havien implementat per igual les estratègies assaig-error i directa, aquesta dada podria indicar que l'AEIC ja no tenia efectes ansiogènics en els animals. A favor d'aquesta hipòtesi, podem dir que a més de no mostrar preferència per una o altra estratègia, els animals d'ambdós grups no van mostrar diferències en la conducta de tigmotaxi i els autoestimulats van nedar més lentament durant la fase d'adquisició.

L'estudi de correlacions ens va mostrar que els subjectes que tardaven més a finalitzar el tractament van estar significativament més temps al quadrant *target* durant la sessió de retenció que els que van fer el tractament de manera més ràpida i continuada. Aquests resultats concorden amb els obtinguts en l'experiment anterior indicant un possible efecte de la durada del tractament sobre la retenció. No obstant, i tal com vam veure també a l'experiment anterior, l'estudi del temps que els animals estaven al quadrant *target* va indicar que els que havien rebut AEIC no recordaven la ubicació de la plataforma.

L'AEIC, tot i haver mostrat ser capaç de produir canvis plàstics al cervell similars als produïts per l'aprenentatge [8, 37, 171, 172, 187], també pot produir efectes no desitjats com per exemple convulsions generalitzades o focalitzades [341] i moviments estereotípics [65, 342, 343]. En el present experiment alguns animals van presentar estereotípies motores que els van impedir desenvolupar la conducta d'AEIC. En el moment de rebre l'estimulació elèctrica desplaçaven el cap i les extremitats anteriors cap al costat contralateral a la implantació de l'elèctrode, impeding-los prémer la palanca

i/o formar una associació entre l'estimulació i la palanca. No obstant, fora de la gàbia de *Skinner* on van rebre l'AEIC els animals van mostrar una conducta normal i un estat de salut general òptim. És molt probable que, tot i haver reduït la freqüència dels polsos elèctrics, una durada excessiva d'aquests hagués estat la causa dels efectes adversos observats en alguns animals.

Els estudis paramètrics de DBS on es modifica la durada dels polsos de l'ona elèctrica s'han realitzat majoritàriament en pacients amb Parkinson per tractar tremolors i problemes motors [140, 344, 345] i en altres trastorns neurològics amb afectació motora [346, 347]. Una dada a destacar és que quan s'incrementa l'amplada del pols es requereix menys intensitat per activar un volum similar de teixit però, paral·lelament, poden incrementar-se els efectes perjudicials de la DBS [348]. Per exemple, una estimulació elèctrica amb polsos de 60 $\mu$ s de durada pot reduir les convulsions en pacients amb epilèpsia, però només si es deixa un interval mínim de 60s entre polsos, en canvi, si l'estimulació és contínua pot provocar convulsions [349].

Donat que els treballs de DBS destinats a pal·liar símptomes motors activen àrees cerebrals diferents, els paràmetres d'ona efectius són difícilment comparables amb els que són efectius en altres trastorns neuropsiquiàtrics. Els estudis en que es va trobar que la DBS era capaç de millorar símptomes motors, la durada dels polsos es trobava en un rang entre 60 i 120 $\mu$ s [140, 344, 345], mentre que per tractar el TOC de manera efectiva els polsos solien ser de més llarga durada (210 $\mu$ s) [220]. Inclús el tractament de la depressió major va requerir polsos més llargs per millorar l'estat d'ànim quan s'estimulava el còrtex cingulat subcallós, amb una durada del pols entre 270 i 450 $\mu$ s [350].

Les estereotípies observades en alguns animals del present experiment que van rebre AEIC podrien ser degudes a una expansió del corrent cap a àrees motores adjacents. La càpsula interna és anatòmicament molt propera al FPM, formant part del tracte corticospinal que transmet informació descendent des del còrtex motor primari (CM1) cap a les neurones motores caudals ubicades a la banya ventral de la medulla espinal [351]. De fet, en un estudi d'estimulació del FPM a l'ATV ja es van trobar efectes d'activació neuronal amb polsos de curta durada (20-60 $\mu$ s) i a mida que s'incrementava la durada (fins a 120 $\mu$ s) es reduïen i desapareixien els efectes [352].

Una limitació important per poder validar els resultats d'aquest estudi és que els grups experimentals no van iniciar la fase d'adquisició en les mateixes condicions, els animals del grup AEIC van fer latències significativament menors que els del grup SHAM a la primera sessió d'adquisició. Aquestes diferències van desaparèixer a partir de la segona



sessió i podrien ser degudes al fet que els animals del grup AEIC van rebre estimulació elèctrica durant les sessions de modelament i CIO prèvies a l'inici de la fase d'adquisició, a diferència dels subjectes del grup SHAM que no les van rebre. No obstant, en els dos estudis anteriors d'aquest bloc la fase de modelament i CIO es va realitzar de manera idèntica i no es va observar aquest efecte.

En resum, aquest tercer experiment del bloc I va mostrar que els paràmetres de l'AEIC administrada no semblaven ser efectius per facilitar la retenció de la tasca de DVS al LAM. A més, ens vam trobar amb tres limitacions, 1) el tractament podria haver produït efectes adversos sobre el sistema motor, 2) els animals van partir de latències significativament diferents a l'inici de l'experiment i 3) els resultats del test de retenció van ser contradictoris. Per tant, no podem concloure que els subjectes que van rebre l'AEIC presentessin retenció de l'aprenentatge adquirit durant la fase d'adquisició. Addicionalment, vam trobar una correlació positiva entre la durada del tractament i la retenció de la tasca, però no podem afirmar que un tractament administrat de manera més ràpida o més lenta pot influir en la retenció de l'aprenentatge. Caldria fer nous estudis paramètrics controlant la durada del tractament per obtenir més informació de la relació d'aquesta variable amb els efectes de l'AEIC sobre la memòria, per exemple, aplicant un interval de temps de corrent 0 entre polsos. Al mateix temps, aplicar aquest interval probablement permetria reduir els possible efectes adversos dels polsos de llarga durada administrats de manera continuada.

## 5. EXPERIMENT IV

### 5.1 Introducció

Tot i els canvis de configuració dels paràmetres del corrent elèctric de l'AEIC realitzats a l'experiment anterior, no vam trobar facilitació en l'adquisició de l'aprenentatge ni en la retenció. Només el grup SHAM es va estar un percentatge de temps superior a l'atzar al quadrant *target* durant el test de retenció. A més, el tractament hauria pogut produir efectes adversos en els animals i dificultar l'execució de la tasca. Per tant, l'objectiu d'aquest quart experiment va ser configurar un corrent elèctric amb característiques encara més similars a les de l'AEIC d'ona sinusoidal aplicada habitualment al nostre laboratori, que ja havia mostrat efectes de facilitació de l'aprenentatge i la memòria. Al mateix temps, vam procurar evitar els efectes adversos de l'estimulació.

### 5.2 Material i procediment

En aquest quart experiment vam utilitzar un total de 18 rates de la soca Wistar, de 91.12 dies (DE=1.80) d'edat i un pes mitjà de 347.65g (DE=25.91) a l'inici de l'estudi. Tot allò referent a ètica i benestar animal, tipus i procedència dels animals, procediments quirúrgics i coordenades d'implantació dels elèctrodes, adquisició de la conducta d'AEIC, aparells, anàlisi estadística de les dades, modelament, assignació a grups experimentals, tractament d'AEIC (excepte els paràmetres del corrent elèctric), adquisició de l'aprenentatge, test de retenció i anàlisi histològica es van realitzar de manera idèntica als experiments previs. Els Experiments III i IV d'aquest bloc es van solapar parcialment en el temps permetent-nos usar els mateixos subjectes del grup SHAM per ambdós treballs.

#### Paràmetres del corrent elèctric

Per configurar els paràmetres d'ona del corrent elèctric vam reduir la durada dels polsos i augmentar la freqüència d'estimulació respecte de l'experiment anterior. Per evitar efectes no desitjats o danys en el teixit neural, vam reduir la durada dels trens de 300ms a 200ms, de manera que cada estimulació consistia en un tren de 200ms, a 50Hz de freqüència, format per 10 polsos dobles d'ona quadrada (1 pols positiu seguit d'1 pols negatiu) de 20ms de durada cada pols doble (Fig.25). Excepte la intensitat, tots els paràmetres del corrent estimulant es van mantenir fixos al llarg de l'experiment.

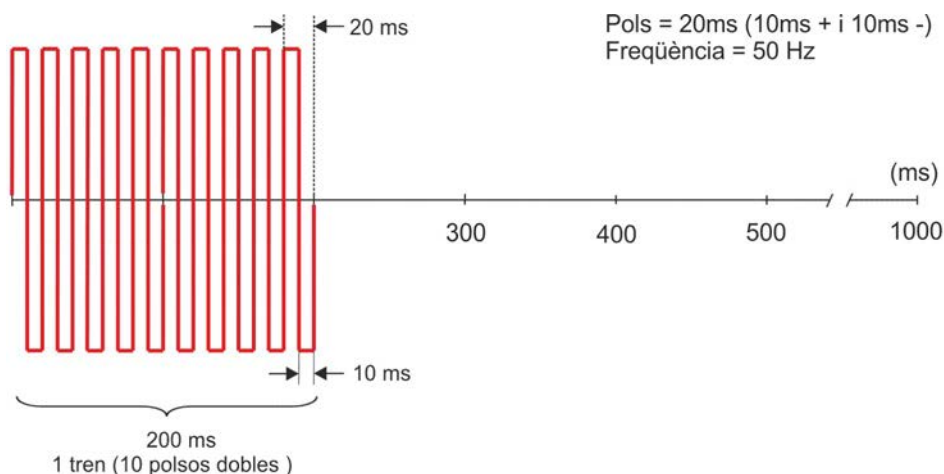


Fig. 25 Paràmetres del corrent elèctric amb ona rectangular de l'Experiment IV. Representació gràfica d'un tren d'AEIC complet de 200ms de durada amb la distribució real dels polsos en 1s.

### 5.3 Resultats

#### 5.3.1 Subjectes

L'anàlisi estadística va mostrar que els grups partien de pesos similars a l'inici de l'experiment i no vam trobar diferències entre els grups en l'evolució del pes al llarg de les diferents fases experimentals. Es va excloure de l'experiment un subjecte del grup SHAM degut a una pèrdua de pes progressiva que podria haver afectat els resultats. La mostra final va constar de 17 subjectes (SHAM: n=8, AEIC: n=9).

#### 5.3.2 Paràmetres d'AEIC

La taula 7 mostra els rangs, valors mitjans i les desviacions estàndard de les variables d'AEIC, així com algunes observacions de la conducta dels animals durant el tractament.

Intensitat d'estimulació ( $\mu\text{A}$ )	Durada del tractament (minuts)	Efectes conductuals
Rang: 50 a 250	Rang: 30 a 51	Aturades (n=3)
Mitjana: 112.22 (60.782)	Mitjana: 37.67 (8.544)	Sobreactivació (n=2)
		Convulsions (n=4)

Taula 7 Paràmetres i efectes conductuals de les sessions d'AEIC. Es representen els valors mitjans ( $\pm\text{DE}$ ) dels paràmetres d'AEIC del subjectes que van rebre tractament i els efectes sobre la conducta associats al tractament. Entre parèntesi es mostra el nombre de subjectes que van mostrar la conducta.

#### 5.3.3 Sessions d'adquisició de la tasca de DVS

L'anàlisi de mesures repetides de l'evolució de les latències, com a índex d'aprenentatge, va mostrar una tendència lineal decreixent dels dos grups al llarg de les 5 sessions d'adquisició [ $F_{1,15}=30.367$ ,  $P<.0001$ ]. Aquesta evolució no va dependre del grup (factor interacció GRUP x SESSIÓ n.s.) de manera que, com s'observa a la figura

26A, ambdós grups van presentar un nivell d'aprenentatge similar al llarg de les sessions. L'anàlisi d'efectes simples no va mostrar diferències entre les latències dels dos grups en cap de les sessions. Tampoc hi havia diferències entre els grups AEIC i SHAM en la mitjana del *nombre d'errors* comesos a les sessions d'adquisició (Fig.26B) donat que, ni el factor GRUP ni la interacció GRUP x SESSIÓ van resultar significatius [ $F_{1,15}=0.212$ ,  $P=.652$ ;  $F_{4,60}=0.577$ ,  $P=.680$  respectivament]. En relació a les variables de control, tampoc es van trobar diferències estadísticament significatives en la *distància* mitjana recorreguda, *velocitat* de natació i *temps en parets*.

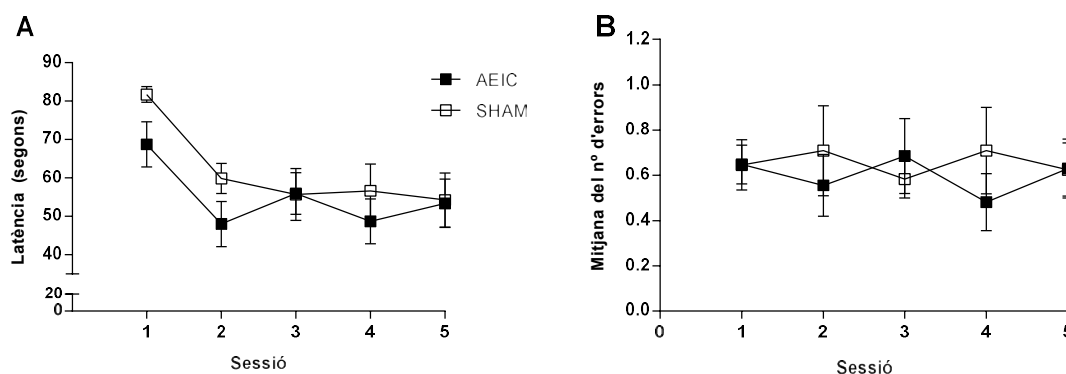
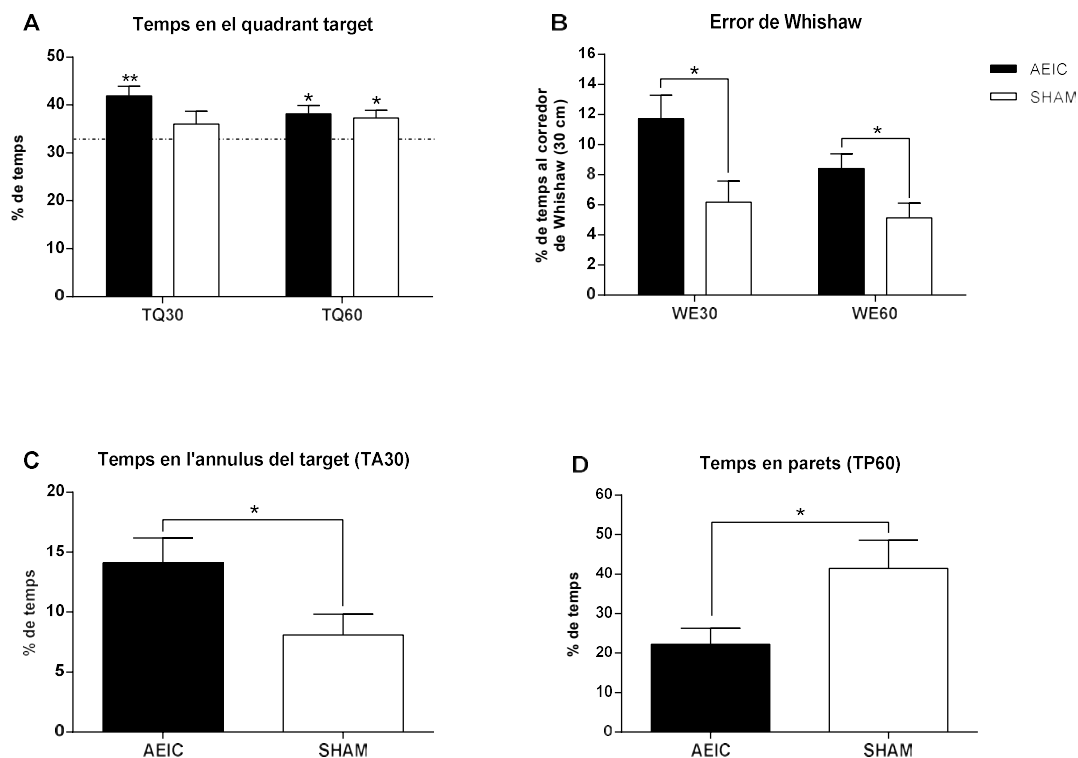


Fig. 26 **Efectes de l'AEIC en les sessions d'adquisició.** (A) Mitjana de les latències ( $\pm$ SE) i (B) mitjana del *nombre d'errors* ( $\pm$ SE) comesos durant les cinc sessions d'adquisició.

### 5.3.4 Test de retenció

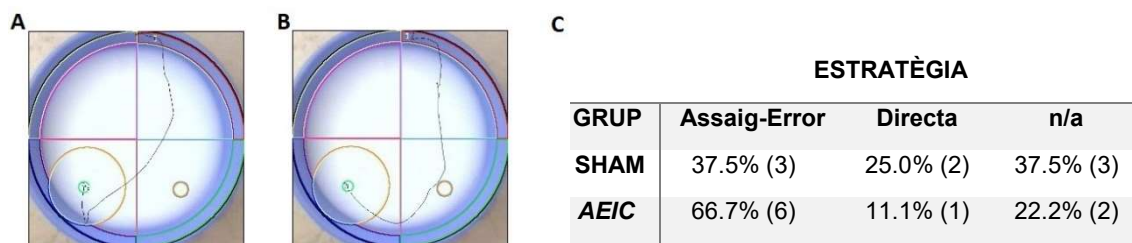
Tot i que no es van observar diferències significatives entre grups en el *temps al quadrant target*, una anàlisi de comparació de mitjanes va indicar que el temps que el grup AEIC estava al quadrant *target* era superior al que hi hauria estat per atzar, tant a la primera meitat del test (TQ30) com al global (TQ60) [ $t_8=4.399$ ,  $P=.002$ ;  $t_8=3.077$ ,  $P=.015$ , respectivament]. En canvi, pel grup SHAM aquest efecte només es va veure al global del test [ $t_8=2.742$ ,  $P=.029$ ] (Fig.27A). Els resultats de les proves *t-test* van mostrar diferències significatives entre els grups AEIC i SHAM en l'*error de Whishaw* al global de la sessió (EW60) [ $t_{17}=-2.360$ ,  $P=.032$ ] i als primers 30 segons (EW30) [ $t_{17}=-2.586$ ,  $P=.021$ ]. Els subjectes que van rebre tractament feien una cerca més acurada que els del grup SHAM (Fig.27B). Així mateix, pel grup AEIC el temps mitjà que van passar a l'*annulus* del *target* durant els primers 30 segons del test de retenció (TA30) va ser significativament superior al del grup SHAM [ $t_{17}=-2.198$ ,  $P=.044$ ] (Fig.27C). També vam trobar diferències entre grups a la variable de control *temps en parets* (TP60), els subjectes del grup AEIC van fer menys tigmotaxi que els del grup SHAM [ $t_{17}=2.411$ ,  $P=.029$ ] (Fig.27D). A la resta de variables d'estudi i control no es van trobar diferències entre grups.



**Fig. 27 Efectes de l'AEIC sobre la memòria al test de retenció.** (A) Percentatge de temps al quadrant target, primers 30 segons i global del test ( $\pm$ SE); (B) Error de Wishaw, primers 30 segons i global del test ( $\pm$ SE); (C) Percentatge de temps a l'annulus del target, primers 30 segons del test ( $\pm$ SE); (D) Percentatge de temps en parets en el global del test ( $\pm$ SE). Abreviatures: TQ, Temps al quadrant target; WE, error de Wishaw; TA, temps a l'annulus del target; TP, temps en parets. La línia discontinua de la gràfica A indica el nivell d'atzar. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$

### 5.3.5 Trajectòries de natació

L'anàlisi qualitativa de les trajectòries de natació va mostrar que alguns subjectes triaven una estratègia de natació directa (Fig.28A) mentre que altres aplicaven una estratègia d'assaig-error (Fig.28B). Un test de *chi-quadrat* no va mostrar diferències entre grups pel que fa a les estratègies ( $X^2_{2,15}=1.480$ ;  $P=.477$ ). La taula de la figura 28C mostra els percentatge de subjectes per grup que triaven una estratègia o l'altra.



**Fig. 28 Estratègies de natació durant l'adquisició.** Imatges d'una estratègia directa i d'una estratègia assaig-error. El quadrant inferior esquerra es correspon amb la ubicació de la plataforma, el cercle concèntric extern és l'annulus del target i el cercle intern és el target (plataforma). (A) animal SHAM; (B) animal AEIC; (C) percentatge d'animals per grup i estratègia de natació. n/a: no aplica. La freqüència es mostra entre parèntesi a continuació dels percentatges.

### 5.3.6 Histologia

La valoració histològica de la implantació dels elèctrodes va mostrar que tots ells es localitzaven entre les coordenades AP -1.80 mm i -3.12 mm en referència a bregma d'acord amb l'atles estereotàxic [320]. No es va observar cap lesió en el teixit ni en estructures adjacents.

### 5.3.7 Anàlisi de correlacions

La intensitat d'estimulació necessària per obtenir la conducta d'AEIC en aquest quart experiment i la durada del tractament es descriuen a l'apartat 5.3.2. L'estudi correlacional entre aquests paràmetres d'estimulació i la conducta dels animals a la tasca de DVS va mostrar una correlació positiva i significativa entre la *durada del tractament* i el percentatge de *temps al quadrant target* durant el test de retenció [ $r_s=0.761^*$ ,  $P=.017$ ] (Fig.29).

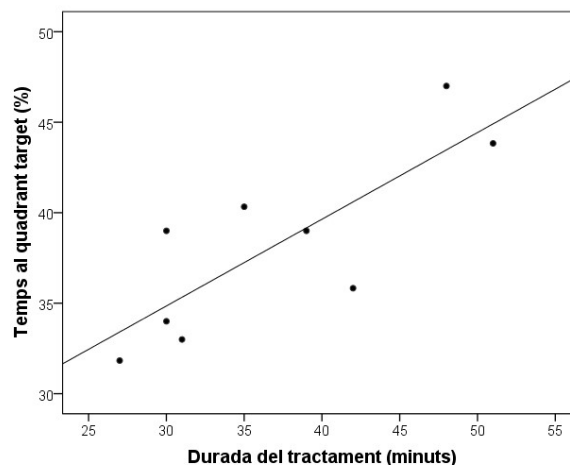


Fig. 29 **Estudi de correlacions entre paràmetres d'AEIC i conducta.** Gràfica de correlació entre la durada de tractament amb AEIC i el percentatge de temps al quadrant *target* al test de retenció.

## 5.4 Discussió

En aquest quart i últim experiment del primer bloc no vam veure efectes del tractament en l'adquisició de la tasca de DVS. Tots els animals, tant del grup AEIC com SHAM van aprendre la tasca per igual. Tampoc es van observar diferències en el nombre d'errors al llarg de les sessions d'adquisició. En canvi, els animals que van rebre AEIC van mostrar un grau de record millor al test de retenció, evidenciant de nou els efectes facilitadors de l'AEIC a la tasca de DVS al LAM [27]. Els nostres resultats concorden amb els de Garcia-Brito [353] en què es realitzava un experiment idèntic però aplicant AEIC amb ona sinusoidal, en aquell cas, tampoc es van veure efectes del tractament en l'adquisició però sí al test de retenció.

A diferència dels Experiments I i II, en aquest experiment i l'anterior (Experiments III i IV) l'anàlisi qualitativa de les trajectòries de natació semblava indicar que els animals d'ambdós grups eren capaços d'implementar una o altra estratègia, per tant no sembla que el fet d'haver rebut o no tractament hagués pogut influir en la tria d'una estratègia en concret, a diferència del que van trobar Garcia-Brito i col·laboradors en un experiment idèntic però amb AEIC d'ona sinusoidal [27]. Al grup AEIC hi havia un nombre major d'animals que hauria mostrat una estratègia assaig-error respecte del grup SHAM, aquesta dada podria explicar el perquè no vam trobar diferències entre els grups a la fase d'adquisició però sí a la de retenció. El tractament podria haver estat efectiu, però la tria equivocada d'una estratègia menys eficient hauria dificultat la localització de la plataforma fent que no s'observessin les diferències fins a la fase de retenció.

Tal com ja havíem vist als experiments previs II i III, en el present experiment vam tornar a trobar una correlació positiva entre la durada de la sessió d'AEIC i el temps que els animals estaven al quadrant *target* durant el test de retenció. Aquests resultats indicarien que els animals que es van autoadministrar l'estimulació de manera més lenta van tenir més facilitat per recordar la ubicació de la plataforma a la fase de retenció. És probable que el fet d'autoadministrar-se l'estimulació més lentament deixi un marge de temps suficient per l'activació i expressió dels mecanismes de plasticitat implicats a nivell cel·lular, com l'activació de gens d'expressió primerenca que facilitarien la consolidació de la memòria.

En conclusió, en el present experiment l'AEIC va mostrar un efecte de facilitació de la memòria a la tasca de DVS al LAM. No obstant, aquest efecte només es va veure al test de retenció i no a les sessions d'adquisició, probablement degut a que alguns subjectes haurien triar una estratègia de cerca assaig-error que podria haver augmentat la latència per trobar la plataforma. A més, els animals que es van administrar l'AEIC de manera més lenta semblaven tenir millor record de la ubicació de la plataforma al test de retenció.

## **BLOC II**

---





## 1. EXPERIMENT V

### 1.1 Introducció

El moment d'administració de l'AEIC en relació a l'entrenament és una variable important que determina no només l'eficàcia del tractament, sinó quin procés o aspecte cognitiu pot estar afectant. L'AEIC s'ha mostrat efectiva per facilitar la memòria en rates quan s'administra post-entrenament i de forma contingent a l'adquisició de l'aprenentatge [5–7, 11], suggerint un paper modulador en la consolidació de la memòria. Ara bé, també s'ha constatat la seva capacitat per potenciar la memòria quan s'aplica pre-entrenament, tant immediatament abans de les sessions [132, 152] com de forma aïllada, sense que hi hagi contingència o continuïtat temporal entre l'AEIC i l'entrenament a la tasca d'aprenentatge [165]. Essent així, vam hipotetitzar que l'activació neuronal generada per l'AEIC podria actuar, no únicament reforçant les connexions sinàptiques establertes prèviament durant l'adquisició d'una tasca de memòria, sinó també com a tractament preparatori capaç de potenciar la plasticitat dels circuits neuronals implicats en diferents tipus de tasques. Les persones en tractament amb DBS reben l'estimulació alhora que adquireixen diferents tipus d'aprenentatges a la seva vida quotidiana, tant implícits com explícits. Així doncs, l'objectiu general d'aquest experiment va ser estudiar si un paradigma de tractament amb AEIC distribuït al llarg del dia i no contingent amb l'entrenament, més similar a com s'aplica la DBS a la clínica, seria capaç de facilitar l'aprenentatge i la memòria. Per a respondre a aquest objectiu, ens vam proposar investigar si tres sessions d'AEIC administrades en diferents moments del dia durant cinc dies consecutius podien facilitar l'adquisició de dues tasques de memòria. Aquestes tasques eren 1) l'EV2, on s'avaluava memòria implícita, associativa i emocional, i 2) un aprenentatge espacial relacional de memòria explícita al LAM. L'entrenament es va realitzar de manera intercalada entre les sessions d'AEIC i sense que hi hagués una relació de contingència AEIC-entrenament.

### 1.2 Material i procediment

#### 1.2.1 Subjectes

Es van utilitzar un total de 26 rates (*Rattus norvegicus*) albines mascles de la soca Wistar procedents del nostre laboratori, de 90.42 dies (DE=6.31) d'edat i un pes mitjà de 409.96g (DE=45.78) a l'inici de l'experiment. Tot allò referent a ètica i benestar animal, tipus i procedència dels animals experimentals, alimentació, condicions ambientals i manipulació dels animals es va realitzar de manera idèntica als experiments del bloc I.

### 1.2.2 Cirurgia estereotàxica

La intervenció quirúrgica d'implantació de l'elèctrode per obtenir la conducta d'AEIC es va realitzar de manera idèntica als experiments del bloc I (veure l'apartat 2.2.3 de l'Experiment I). En aquest cas vam procedir a canviar les coordenades d'implantació a fi de minimitzar els possibles efectes sobre el sistema motor observats en alguns subjectes en experiments previs. Les coordenades estereotàxiques utilitzades van ser AP -2.3mm posterior a bregma, ML +1.8mm lateral a la línia medial sagital (hemisferi dret) i DV -8.8mm de profunditat a partir de la superfície cranial [320].

### 1.2.3 Aparells

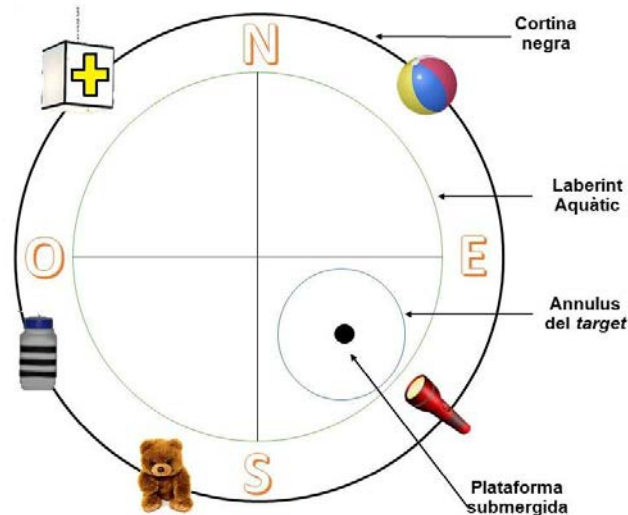
#### a) Aparells d'AEIC

La conducta d'AEIC dels animals es va dur a terme en una caixa operant *Skinner* idèntica a la utilitzada en els experiments anteriors (veure l'apartat a del punt 2.2.4 de l'Experiment I). En el present experiment vam utilitzar un generador de corrent elèctric d'ona sinusoidal connectat a un oscil·loscopi Hameg (HM 412-5) per tal de controlar la intensitat del corrent administrat als subjectes. L'estimulació elèctrica cerebral va consistir en l'administració de trens d'ona sinusoidal de 300ms de durada, formats per 15 polsos bifàsics a una freqüència de 50Hz. El rang d'intensitats d'estimulació es trobava entre 45 i 100 $\mu$ A. Tots els paràmetres del corrent estimulant, excepte la intensitat, es van mantenir fixos al llarg de l'experiment.

#### b) LAM

La tasca d'aprenentatge espacial es va dur a terme en un LAM idèntic a l'utilitzat als experiments del bloc I (veure l'apartat b del punt 2.2.4 de l'Experiment I), però en aquest cas vam canviar la distribució dels senyals contextuals i la posició de la plataforma per tal d'adequar-lo a una tasca d'aprenentatge relacional de tipus espacial. Els senyals estaven ubicats a l'exterior i al voltant de la piscina, distribuïts en l'espai i suspesos del fals sostre amb fils de nylon® a 45cm per sobre del nivell de l'aigua. Van consistir en 1) una pilota de platja amb segments verticals alterns de color blau, blanc, groc i taronja de 50cm de diàmetre; 2) una ampolla blanca amb línies negres horitzontals de 30x10x10cm; 3) un os de peluix de color marró de 50cm d'alt; 4) una caixa blanca amb forma de creu grega amb llum a l'interior i coberta amb una pantalla de paper i 5) una llum indirecta que enfocava a la cortina externa a la piscina, tal com es mostra a la figura 30 on es pot veure la distribució dels estímuls. La plataforma es va situar al centre del quadrant sud-est i es va mantenir constant en aquesta ubicació al llarg de tots els

assaigs i sessions. La ubicació dels senyals en l'espai tampoc es va modificar. La resta de característiques de l'aparell, plataforma, càmera de vídeo i enregistrament de la conducta dels animals eren idèntics als usats en els experiments del bloc I.



**Fig. 30 Representació de la configuració del LAM utilitzada per la tasca de memòria espacial (vista superior).** Els senyals contextuals (làmpada de llum indirecta, llum tènue en creu, ampolla, os i pilota) es trobaven situats a l'interior del recinte de la piscina, suspesos del fals sostre i distribuïts en l'espai.

### c) Shuttle-box

La tasca d'EV2 es va dur a terme en dues gàbies *shuttle-box* automatitzades idèntiques de 50cm llarg x 24cm ample x 25cm alt (Shuttle Flex Fusion, AccuScan Instruments Inc. Columbus, Ohio, USA). Les gàbies estaven ubicades a l'interior de caixes aïllants, il·luminades amb un llum fluorescent de 10w col·locat a la paret posterior (27cm per sobre del terra) i disposaven d'un extractor per facilitar la ventilació. Els dos compartiments de la gàbia no tenien cap separació física entre ells. El terra de la gàbia estava format per un enreixat electrificat amb corrent altern a través del qual s'administrava el xoc elèctric (EI) a les potes dels animals. Al sostre de cada gàbia hi havia instal·lats dos altaveus que emetien un so regulable en intensitat i freqüència que actuava com a EC, a més també disposava d'una llum que s'activava al mateix temps que el so. Tant els ECs com l'EI s'activaven de manera preestablerta per l'experimentador. Tot el procediment va ser controlat i enregistrat per un *software* Fusion (Omnitech Electronics Inc.) a través d'un ordinador ubicat a la mateixa sala.

### 1.2.4 Conducta d'AEIC

L'assignació dels subjectes als grups experimentals, modelament de la conducta d'AEIC i CIO es van realitzar de manera idèntica als experiments del bloc I (veure punt 2.2.5 de l'Experiment I). A diferència dels experiments anteriors, en aquest cas els subjectes del grup AEIC es van autoadministrar un tractament d'estimulació elèctrica, consistent en 2000 trens de corrent estimulant a la intensitat òptima prèviament establerta a la mateixa caixa de *Skinner* on havien realitzat el modelament. Aquest tractament es va administrar tres cops al dia, a les 8.00h, les 13.00h i les 18.00h. Els subjectes del grups SHAM es van quedar en una caixa *Skinner* durant 45 minuts (temps mitjà de durada del tractament d'AEIC) sense rebre estimulació, mentre els subjectes del grups AEIC rebien el tractament.

### 1.2.5 Procediment de la tasca d'EV2

#### a) Habitució

Tres dies abans de l'inici de la primera sessió d'adquisició tots els animals van ser sotmesos a una sessió d'habitució de 5 minuts de durada a la *shuttle-box*. Aquesta sessió es va fer 3 hores després del modelament i la CIO per tal de deixar un període de descans. En aquesta sessió els animals podien deambular lliurement per l'interior de la gàbia i explorar els dos compartiments. L'objectiu de l'habitució prèvia a l'adquisició va ser disminuir la interferència que l'exposició a estímuls nous pot produir en l'aprenentatge posterior [354].

#### b) Adquisició de l'aprenentatge

L'adquisició del condicionament d'EV2 va constar d'un total de 10 assaigs diaris durant 5 dies consecutius. Amb l'objectiu d'avaluar la memòria implícita, en aquest experiment vam aplicar un paradigma de demora estàndard, en el qual l'EI apareixia immediatament després de l'EC. L'EC era una combinació de so i llum de 3s de durada. El so era d'1kHz de freqüència i 50 dB d'intensitat, el llum era vermell i de 150 lux d'intensitat. Com a EI es va aplicar un xoc elèctric de 0.6mA d'intensitat (corrent altern) 3s després de l'inici dels ECs i durant un màxim de 10s.

L'assaig es va iniciar amb l'aparició dels ECs. Si l'animal canviava de compartiment durant els 3s que duraven els ECs evitava que aparegués el xoc (resposta d'evitació) i s'iniciava l'interval entre assaigs de  $60 \pm 10$ s. Si l'animal no feia una resposta d'evitació apareixia l'EI (xoc elèctric), i si canviava de compartiment durant la presentació de l'EI, es considerava una resposta de fugida. Els assaigs en què l'animal no va fer cap

resposta ni d'evitació ni de fugida, l'EI va desaparèixer passats 10s i va començar a comptar l'interval entre assaigs.

### **c) Test de retenció**

Els animals d'ambdós grups van ser sotmesos a una sessió de les mateixes característiques que una sessió d'adquisició, 72h després de l'última sessió d'adquisició.

## **1.2.6 Procediment de la tasca de memòria espacial**

### **a) Habitució**

El mateix dia en que es va realitzar el modelament i la CIO, i després d'un període mínim de 3 hores de descans, tots els subjectes van realitzar una sessió d'habitució al LAM durant 90s a fi de reduir l'estrès i facilitar l'adaptació a l'entorn on es realitzaria l'aprenentatge.

### **b) Adquisició de l'aprenentatge**

Tres dies després de les sessions de modelament i CIO, va començar la fase d'adquisició de la tasca espacial al LAM. El protocol d'entrenament va consistir en 5 sessions, una sessió diària de 4 assaigs cadascuna. L'interval entre assaigs va ser de 120s. A cada assaig, vam introduir l'animal des d'un dels quatre punts d'entrada a la piscina (N,S,E i O). Si transcorreguts els 90s que durava l'assaig no havia trobat la plataforma, el guiàvem per aproximar-lo i facilitar que hi pugés. Un cop l'animal era a sobre de la plataforma, el deixàvem durant 15s per facilitar l'associació entre el senyal i la ubicació de la plataforma, i a continuació el retiràvem de la piscina.

### **c) Test de retenció**

Per obtenir evidències de la retenció de l'aprenentatge, vam sotmetre a cada rata a un únic assaig de 60s de durada, 72h després de la darrera sessió d'adquisició. Aquest assaig va consistir a introduir l'animal a la piscina des del punt d'inici E amb tots els senyals presents, però sense la plataforma, i enregistrar-ne la conducta. Es va analitzar si el subjecte tenia preferència per alguna àrea en concret o si, pel contrari, es desplaçava de manera aleatòria per la piscina. Un cop finalitzat el test de retenció i amb l'animal encara a l'interior de la piscina, es va col·locar la plataforma, es va guiar l'animal perquè hi pugés i l'hi vam deixar durant 15s per tal de generar una associació entre la

nova ubicació de la plataforma i els senyals contextuals. A continuació el vam treure i el vam tornar a la seva gàbia d'aïllament.

### 1.2.7 Protocol experimental

Intercalades entre les 3 sessions diàries d'AEIC, es van realitzar les sessions d'adquisició de cada tasca (EV2 a la *shuttle-box* i espacial al LAM). Les proves es van dur a terme diàriament en un ordre altern matí (11.00h) / tarda (16.00h) per compensar la influència de l'ordre de realització de les tasques en els resultats d'aprenentatge. Així mateix, l'inici setmanal també es va alternar de manera que si la setmana 1 s'iniciava amb la tasca d'EV2 al matí, la setmana 2 s'iniciava amb la tasca espacial al matí i a la inversa. La figura 31 mostra amb detall el procediment de les diferents tasques i la seva distribució en el temps.

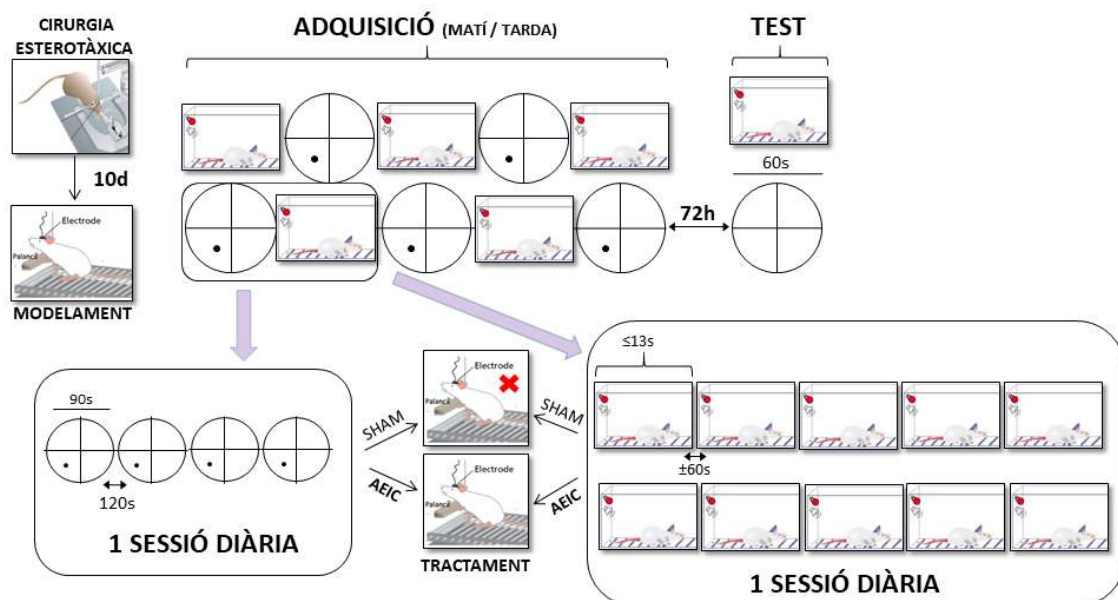


Fig. 31 Diagrama del procediment experimental de l'Experiment V. Es mostra la distribució de les proves d'aprenentatge (EV2 i espacial), durades i intervals entre assaigs. Il·lustracions adaptades d'A. Mackey.

### 1.2.8 Histologia

Per valorar histològicament la implantació dels elèctrodes, en acabar l'experiment els animals es van sacrificar mitjançant perfusió transcardíaca amb un buffer fosfat 0.1M (PB; pH=7.4) amb 4% de paraformaldehid. Els cervells es van extreure i es van deixar en postfixació durant 2 hores, canviant-los a continuació a una solució crioprotectora. Quatre dies després es van congelar i posteriorment es van tallar en un criòstat (Cryocut 1800 amb micròtom 2020, Jung) a 40µm. Els teixits es van tenyir amb *violeta de cresil* i es van examinar al microscopi per determinar la localització de l'elèctrode.

### 1.2.9 Anàlisi estadística

Les anàlisis principals es van dur a terme considerant la variable independent *tractament* com a qualitativa (amb dues categories) i les variables dependents com a quantitatives. En l'adquisició i el test de retenció de la tasca d'**EV2**, les variables dependents analitzades van ser 1) *evitacions* (respostes condicionades d'evitació activa, nombre d'assaigs en què les rates van evitar rebre l'EI), 2) *no respostes* (nombre de vegades que les rates van suportar el xoc elèctric sense fugir), 3) *latència* de resposta (temps que van trigar a fugir o evitar l'EI des de l'inici de l'EC), 4) *creuaments entre assaigs* (nombre de vegades que les rates van canviar de compartiment entre els diferents assaigs de la sessió) i 5) *creuaments durant l'assaig* (nombre de vegades que van canviar de compartiment mentre durava un assaig). Addicionalment, també es van enregistrar i analitzar els creuaments realitzats a la sessió d'habitució, prèvia a la fase d'adquisició, per valorar l'activitat motora basal dels animals. Per les anàlisis de les sessions d'adquisició es van aplicar anàlisis multivariants de la variància (model lineal general (MLG) de mesures repetides) i una anàlisi de contrast polinomial per explorar si hi havia una tendència lineal o quadràtica al llarg de les sessions d'adquisició. Per la sessió d'habitució i el test de retenció es van realitzar anàlisis *t-test* per mostres independents.

A la fase d'adquisició de la tasca de **memòria espacial** la principal variable d'estudi analitzada va ser la *latència*. Les comparacions entre grups de les sessions d'adquisició es van fer usant anàlisis multivariants de la variància (model lineal general de mesures repetides) amb l'objectiu d'analitzar les variables d'estudi enumerades anteriorment i les de control *temps en parets*, *distància* i *velocitat*. Addicionalment, es va realitzar una anàlisi de contrast polinomial per determinar si l'execució de la tasca seguia una tendència lineal o quadràtica. Pel test de retenció, es van aplicar anàlisis *t-test* de mostres independents per comparar l'execució dels grups de subjectes en relació a les variables d'estudi *temps al quadrant target*, *creuaments del target*, *temps a l'annulus del target* i *error de Whishaw*; també per les variables de control *velocitat*, *distància* i *temps en parets*. Per la sessió d'habitució al LAM també es va realitzar una anàlisi *t-test* per mostres independents per analitzar les variables de control esmentades anteriorment. El nivell de significació per tots els tests es va establir en  $\alpha=0.05$  i tot el processament de dades es va realitzar mitjançant el paquet estadístic SPSS v23 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA).



## 1.3 Resultats

### 1.3.1 Subjectes

Al llarg de l'experiment vam realitzar un control regular del pes dels animals. L'anàlisi *t-test* de comparació de mitjanes va mostrar que els grups partien de pesos significativament iguals a l'inici de l'experiment [ $t_{23}=0.644$ ,  $P=.526$ ] mentre que al final de l'experiment les mitjanes de pes de cada grup tendien a ser significativament diferents [ $t_{23}=1.926$ ,  $P=.067$ ]. Una anàlisi de les diferències de pes entre l'inici i el final de l'experiment va indicar que els grups eren estadísticament diferents [ $t_{23}=2.673$ ,  $P=.015$ ], les rates del grup SHAM havien guanyat pes al llarg de l'experiment mentre que les del grup AEIC s'havien mantingut en pesos similars. Es va excloure de l'experiment un subjecte del grup SHAM degut a la manca de dades estadístiques del test de retenció. La mostra final va constar de 25 subjectes (SHAM:  $n=12$ , AEIC:  $n=13$ ).

### 1.3.2 EV2

#### 1.3.2.1 Sessions d'habitució i adquisició

Una anàlisi *t-test* de mostres independents va evidenciar que els subjectes d'ambdós grups presentaven el mateix nivell d'activitat motora a la sessió d'habitució prèvia a l'inici de l'experiment [ $t_{23}=-0.239$ ,  $P=.813$ ].

La figura 32 mostra la mitjana d'*evitacions* per ambdós grups. L'estudi de contrastos polinomials de la variable *evitacions* va mostrar una tendència lineal ascendent i significativa de l'aprenentatge dels dos grups [ $F_{1,23}=40.709$ ,  $P<.0001$ ], però independent del grup, ja que la interacció GRUP x SESSIÓ no va resultar significativa [ $F_{4,92}=0.416$ ,  $P=.797$ ]. Aquests mateixos resultats es van observar per la variable *latència* de resposta. La resta de variables, *no respostes*, *creuaments entre assaigs* i *creuaments durant l'assaig*, no van mostrar diferències estadísticament significatives.

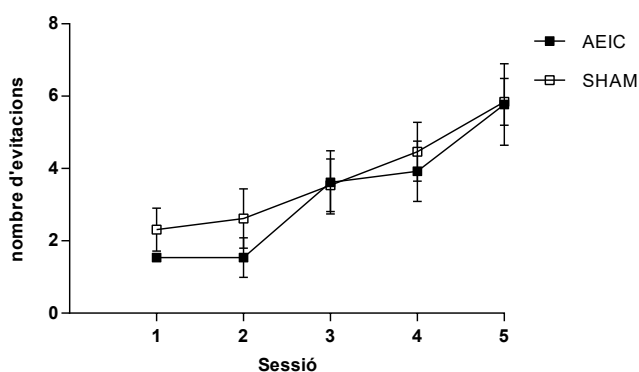


Fig. 32 Efectes de l'AEIC al llarg de les cinc sessions d'aprenentatge de la tasca d'EV2. Es mostren les mitjanes de les *evitacions* realitzades per cada grup i sessió ( $\pm$ SE).

### 1.3.2.2 Test de retenció

L'anàlisi *t-test* de les *evitacions* del test de retenció no va mostrar diferències significatives entre grups [ $t_{23}=-0.142$ ,  $P=.888$ ] (Fig.33A), però es va observar una tendència a la significació en la variable *no respostes* [ $t_{22}=-1.802$ ,  $P=.089$ ] (Fig.33B).

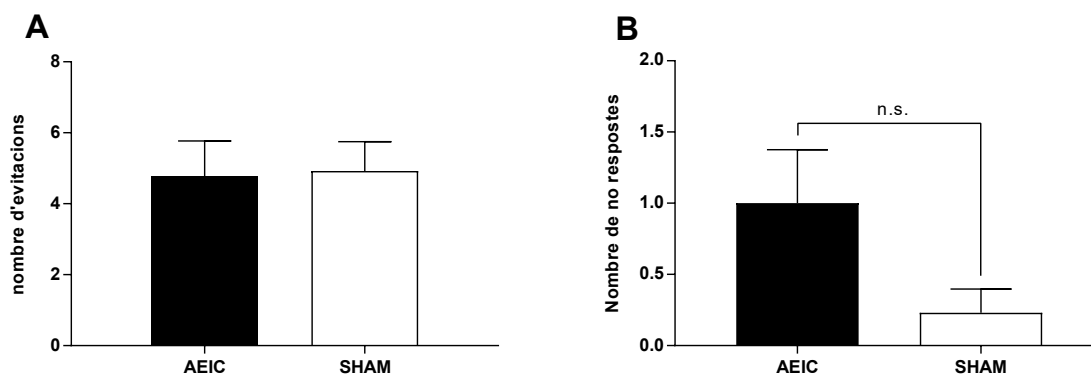


Fig. 33 Efectes de l'AEIC sobre la memòria al test de retenció de l'EV2. (A) Nombre d'evitacions, respostes condicionades d'evitació activa ( $\pm$ SE); (B) Nombre de *no respostes*, vegades que els animals suporten el xoc elèctric sense canviar de compartiment, considerada com a resposta de *freezing* ( $\pm$ SE).

### 1.3.3 Tasca de memòria espacial al LAM

#### 1.3.3.1 Sessions d'habitució i adquisició

Pel que fa a la sessió d'habitució, no es van trobar diferències entre grups en les variables de control *temps en parets*, *distància* i *velocitat*. A la fase d'adquisició, l'anàlisi de contrast polinomial va indicar que els subjectes seguien una evolució d'aprenentatge lineal descendent i significativa al llarg de les sessions d'adquisició [ $F_{1,23}=101.182$ ,  $P<.0001$ ] però aquest efecte no depenia del grup ja que la interacció GRUP x SESSIÓ no va arribar a la significació estadística, malgrat presentar una tendència a la significació [ $F_{1,23}=4.218$ ,  $P=0.051$ ] (Fig.34A). Una anàlisi d'efectes simples va posar de manifest diferències significatives entre els grups [ $F_{1,23}=2.243$ ,  $P=0.016$ ] a la tercera sessió; concretament, els subjectes del grup AEIC van mostrar latències superiors a les del grup SHAM. Aquestes diferències es van reduir progressivament a les sessions 4 i 5. L'estudi estadístic de la variable *temps en parets* va posar de manifest que el factor interacció GRUP x SESSIÓ era significativa [ $F_{4,92}=3.552$ ,  $P=0.010$ ], detectant diferències entre grups [ $F_{1,23}=4.426$ ,  $P=0.035$ ] a la tercera sessió; concretament, els subjectes del grup SHAM van presentar menor tigmotaxi que els del grup AEIC (Fig.34B).

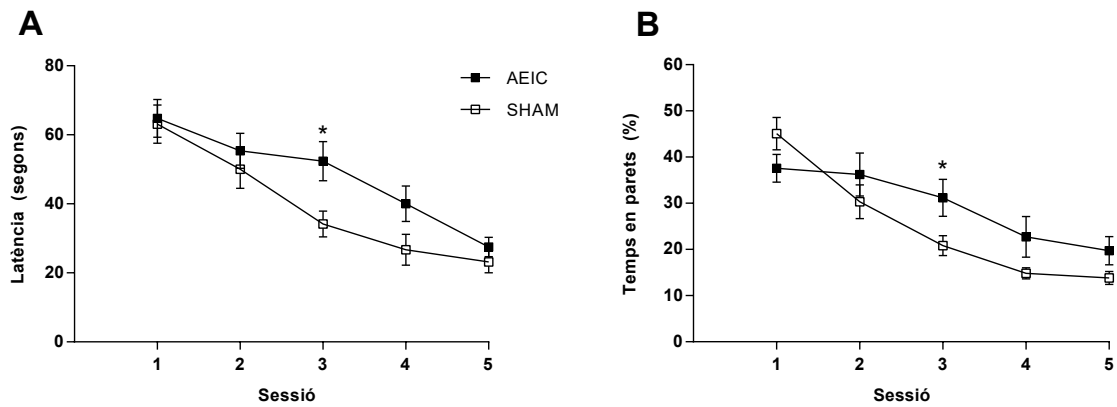


Fig. 34 Efectes de l'AEIC en les sessions d'adquisició de la tasca espacial. (A) Latència mitjana per grup i sessió. (B) Percentatge de *temps en parets* per grup i sessió. \*P<0.05.

### 1.3.3.2 Test de retenció

L'anàlisi estadística no va mostrar diferències significatives entre grups en les principals variables d'estudi (*temps al quadrant target*, *temps a l'annulus del target*, i *creuaments del target*), però els subjectes del grup SHAM van mostrar una tendència a fer més *creuaments del target* que els d'AEIC [ $t_{23}=1.871$ ,  $P=.074$ ] (Fig.35A). Ambdós grups van recordar per igual la ubicació de la plataforma, ja que van estar al quadrant *target* un temps superior al que haurien estat per atzar (25%), tant per la primera meitat del test (TQ30) com pel global (TQ60) (SHAM:  $t_{11}=7.201$ ,  $P<.0001$ ;  $t_{11}=6.455$ ,  $P<.0001$ , respectivament; AEIC:  $t_{12}=6.100$ ,  $P<.0001$ ;  $t_{12}=5.044$ ,  $P<.0001$ , respectivament). Es van detectar diferències significatives a la variable de control *temps en parets* [ $t_{23}=-2.851$ ,  $P=.010$ ] (Fig.35B), indicant que els subjectes del grups AEIC feien més tigmotaxi que els del grup SHAM. Aquestes diferències es van veure només a la primera meitat del test (TP30). Per la resta de variables analitzades no es van trobar diferències significatives entre els grups.

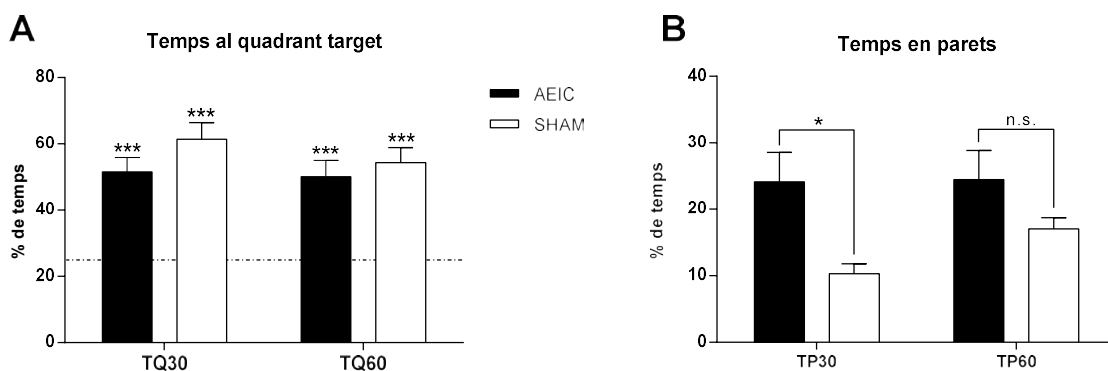


Fig. 35 Efectes de l'AEIC sobre la memòria al test de retenció. (A) Percentatge de temps que els animals estaven al quadrant *target* respecte de l'atzar, TQ30 i TQ60. ( $\pm$ SE); (B) Percentatge de temps que els animals nedaven a prop de les parets de la piscina, TP30 i TP60 ( $\pm$ SE). \*P<0.05; \*\*\*P<.0001.

### 1.3.4 Anàlisis correlacionals

#### 1.3.4.1 Paràmetres d'AEIC i conducta

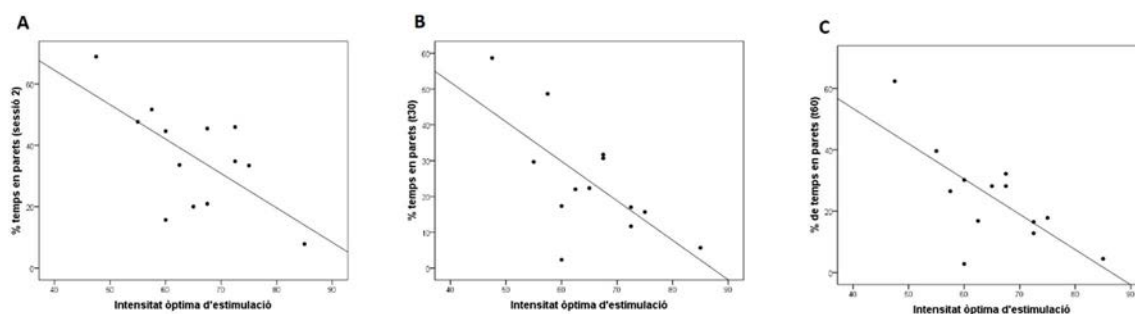
A la taula 8 es descriuen els rangs, valors mitjans i, entre parèntesi, les desviacions estàndard de les variables d'AEIC.

Intensitat d'estimulació ( $\mu\text{A}$ )	Durada del tractament (minuts)
Rang: 45 a 100	Rang: 28 a 48
Mitjana: 65.19 (9.76)	Mitjana: 34.03 (5.42)

**Taula 8 Paràmetres de les sessions d'AEIC.** Es representen els valors mitjans ( $\pm\text{DE}$ ) dels paràmetres d'AEIC del subjectes que van rebre tractament.

L'anàlisi correlacional *Rho de Spearman* va mostrar que cap dels paràmetres d'AEIC avaluats (*Intensitat d'estimulació* i *durada del tractament*) es relacionava amb el nivell d'aprenentatge assolit pels animals a les diferents sessions d'adquisició de la tasca d'EV2, tampoc es va trobar correlació d'aquests paràmetres amb les variables de control.

Per la tasca espacial al LAM vam trobar una correlació negativa entre la *intensitat d'estimulació* i el *temps en parets*, aquesta correlació es va observar a la segona sessió d'adquisició [ $r_s = -0.563$ ,  $P = .045$ ] (Fig.36A) i es va tornar a trobar al test de retenció, tant al global de la sessió (TP60) [ $r_s = -0.568$ ,  $P = .043$ ] (Fig.36B) com en els primers 30 segons (TP30) [ $r_s = -0.574$ ,  $P = .040$ ] (Fig.36C). Per la resta de variables analitzades de les sessions d'habitució, adquisició i test de retenció no es van trobar altres correlacions significatives.



**Fig. 36 Anàlisis de correlació entre les variables de l'AEIC i la conducta a la tasca espacial.** (A) Correlació entre la intensitat mitjana d'estimulació i el *temps en parets* a la segona sessió d'adquisició de la tasca espacial. (B) Correlació entre la intensitat mitjana d'estimulació i el *temps en parets* de la primera meitat del test de retenció (TP30). (C) Correlació entre la intensitat mitjana d'estimulació i el *temps en parets* del test de retenció global (TP60).

### 1.3.4.2 Variables conductuals (EV2 i espacial al LAM)

L'anàlisi de correlacions entre les variables de conducta d'ambdues tasques de memòria no va mostrar resultats estadísticament significatius entre les principals variables d'estudi de la fase d'adquisició (*evitacions* a la tasca d'EV2 i *latències* a la tasca espacial), ni tampoc amb les variables del test de retenció.

### 1.3.5 Histologia

L'estudi microscòpic de la localització dels elèctrodes a l'HL va mostrar que es trobaven entre les coordenades AP -1.92mm i -3.46mm en relació a bregma [320]. No es van observar lesions que haguessin pogut afectar el rendiment dels subjectes a les tasques d'EV2 i espacial.

## 1.4 Discussió

Els resultats obtinguts al present experiment no van mostrar diferències entre els grups AEIC i SHAM a la tasca d'EV2 a la *shuttle-box*, indicant que quan el tractament s'aplicava de manera distribuïda al llarg del dia i no contingent amb l'aprenentatge no era capaç de facilitar ni l'adquisició ni la retenció d'aquesta tasca de memòria implícita, en les presents condicions. Per altra banda, l'AEIC tampoc va facilitar l'aprenentatge de la tasca espacial; de fet fins i tot semblava haver tingut un lleuger efecte d'interferència en aquesta tasca, ja que es va observar una major dificultat dels subjectes autoestimulats per trobar la plataforma en alguna de les sessions d'adquisició, respecte dels que no van rebre l'AEIC.

El nombre de tractaments i reforçaments per tractament que vam aplicar en aquest estudi no van aportat uns resultats que ens puguin fer pensar que són adients per facilitar l'aprenentatge i la memòria, a diferència de les troballes de treballs previs en què es va administrar un sol tractament diari i de manera contingent amb l'entrenament [5–7, 11–13]. Els presents resultats fan pensar que la contingència AEIC-entrenament és rellevant per a facilitar l'aprenentatge, no obstant, altres estudis sí que van trobar que l'AEIC no contingent amb l'entrenament podia facilitar l'aprenentatge [8], per exemple, en l'estudi de Ramkumar i col·laboradors es va donar menor quantitat d'estimulació i es van observar els efectes del tractament en l'aprenentatge un temps després. Per tant, no podem afirmar que la contingència sigui necessària, sinó que la manca de resultats podria ser deguda a altres explicacions alternatives.

Una primera possibilitat podria estar relacionada amb la quantitat d'estimulació. En aquest sentit, al llarg de l'experiment els animals que no van rebre AEIC van guanyar pes progressivament, mentre que els autoestimulats el van mantenir sense mostrar cap

altre signe de malaltia. Aquesta dada ens fa pensar que els animals que rebien els tractaments d'AEIC podrien estar sotmesos a una activitat física i consum d'energia significativament superiors als SHAM. Cal recordar que els animals tractats van rebre tres sessions d'AEIC diàries de 45 minuts de durada aproximada cadascuna, de manera que van realitzar un nivell d'activitat física molt superior al dels subjectes que no van rebre AEIC. Malgrat que l'activitat física no és un factor que interfereixi en l'aprenentatge, sinó que és positiva i el pot facilitar [355–358], l'exercici d'alta intensitat sí que pot deteriorar l'aprenentatge tant en animals [359–361] com en humans [362], podent arribar a anul·lar els possibles efectes de l'AEIC.

Una segona possibilitat, relacionada amb l'anterior, és que un tractament tant intensiu hagi pogut ocasionar nivells massa elevats d'ansietat o d'*arousal*, superiors als òptims per facilitar l'aprenentatge. La tigmotaxi es considera una resposta de por típica dels rosegadors i és una variable àmpliament estudiada com a indicadora de nivells d'ansietat en animals de laboratori [250, 251]. En el nostre estudi de memòria espacial la vam analitzar mesurant el temps que els animals nedaven tocant amb les vibrisses a les parets de la piscina. Tant a les sessions d'adquisició com al test de retenció, els animals que van rebre els tractaments d'AEIC van passar significativament més temps nedant a prop de les parets que els del grup SHAM.

Segons la hipòtesi de la U invertida, l'execució és una funció del nivell d'activació [363], és a dir, a mida que incrementa l'activació millora l'execució, però quan es supera el nivell òptim d'activació, l'execució empitjora i decau. Aquest fenomen també s'observa en el cas de la conducta d'AEIC en que, un cop superada la intensitat òptima, el rendiment dels subjectes disminueix i s'observa una menor taxa de respostes. Així doncs, les tres sessions de tractament diàries administrades durant cinc dies consecutius podrien haver produït un *arousal* excessivament elevat i sostingut al llarg del temps, que hauria provocat nivells anormalment elevats d'ansietat, expressada com a tigmotaxi a la tasca espacial. A les tasques d'aprenentatge, una possible conseqüència derivada d'aquest estat d'ansietat i activació cerebral sostinguda és la manca d'atenció [364]. Això concorda amb el fet que l'AEIC sembla que va afectar més al rendiment al LAM que a l'EV2, aquest últim considerat un aprenentatge de tipus implícit que no requereix una atenció constant un cop adquirit l'aprenentatge.

L'estudi de correlacions ens va indicar que la intensitat d'estimulació estava relacionada amb el rendiment a la tasca de memòria espacial. És possible que, en les condicions en que vam aplicar els tractaments d'aquest experiment, la intensitat hagués resultat un factor important en els resultats obtinguts. Tanmateix, les intensitats es trobaven dintre

del rang en què altres estudis han trobat efectes de facilitació de l'aprenentatge i la memòria [9, 11, 12, 27, 133].

En resum, la manca de facilitació de l'AEIC administrada en aquest experiment indica que, en les presents condicions i amb aquest procediment experimental, l'AEIC no permet facilitar els processos d'aprenentatge i memòria quan s'aplica de manera distribuïda i no contingent amb l'entrenament. La dificultat en la recuperació del pes de les rates del grup AEIC, que podria ser produïda per una major activitat física, juntament amb nivells d'ansietat i *arousal* excessivament elevats que haurien dificultat la capacitat atencional podrien haver influït en el rendiment global de les rates a les tasques, principalment la que van realitzar al LAM.

En el futur, caldria considerar la contingència del tractament amb l'aprenentatge com una variable important en l'efecte facilitador de l'AEIC, reduir el nombre de sessions de tractament o la quantitat de reforçaments per tractament, a fi de trobar l'equilibri entre l'efecte de facilitació de la memòria i el d'activació cerebral. Així mateix, caldria explorar quines intensitats d'estimulació són les més adequades per obtenir efectes de facilitació de la memòria amb AEIC.

## 2. EXPERIMENT VI

### 2.1 Introducció

Una de les principals diferències entre la clínica i l'experimentació en animals és el nombre de sessions d'estimulació que s'administren. A la clínica, el temps que el subjecte està exposat a l'estimulació és molt més elevat i els tractaments són persistents, regulars i distribuïts al llarg del temps [21, 22, 202, 203]. En canvi, en animals el tractament sol ser de curta durada i puntual, amb sessions d'entrenament intensives també de curta durada [26–28, 158, 365] i els efectes del tractament s'avaluen en un tipus d'aprenentatge en concret.

Així doncs, l'objectiu d'aquest experiment va ser estudiar els efectes de l'AEIC aplicada post-entrenament sobre una tasca de memòria explícita espacial durant un període superior (2 setmanes) al que habitualment s'administra en animals de laboratori. En aquest experiment, vam triar una tasca de memòria explícita per estudiar els efectes del tractament d'AEIC sobre la memòria, pel fet que a la clínica d'humans la DBS destinada a tractar problemes de memòria se sol aplicar a la malaltia d'Alzheimer [21, 22, 202] i és la memòria explícita la que es veu més afectada a les fases inicials d'aquesta malaltia neurodegenerativa [366].

Com que l'AEIC la vam administrar post-entrenament, augmentar el nombre de sessions de tractament en el temps implicava també augmentar el nombre de sessions d'adquisició de la tasca. Aquest protocol d'entrenament de major durada, per una banda, va fer que haguéssim de reduir el nombre d'assaigs per sessió per tal d'evitar un efecte sostre de l'aprenentatge; augmentant la dificultat de la tasca. Per altra banda, ens va permetre plantejar l'estudi dels efectes de l'AEIC més sostinguda en el temps sobre la neurogènesi (NG).

En diversos estudis s'ha vist que tant l'AEIC com l'aprenentatge espacial al LAM estan relacionats amb la NG a l'HPC [31–35] però, fins on sabem, no s'ha estudiat la relació entre la facilitació d'aquest tipus de memòria produïda per l'AEIC i la NG. Així doncs, vam considerar interessant incloure una anàlisi de NG, activació neuronal i integració funcional per aprofundir en la relació de l'AEIC amb la NG. Addicionalment, vam mesurar els nivells d'AChE en àrees cerebrals relacionades amb l'aprenentatge i la memòria per tal d'avaluar si l'activitat colinèrgica es veu afectada pel tractament d'AEIC. Diversos estudis han mostrat que la densitat òptima d'ACh es veu reduïda en processos neurodegeneratius [367, 368] com la malaltia d'Alzheimer, essent un bon indicador d'aquest declivi el nivell de l'enzim AChE. També s'ha observat que la DBS del septum medial és capaç de recuperar els nivells d'AChE a més d'incrementar la NG [28, 193]. A més, sembla ser que el nucli lateral de l'amígdala és crític per l'adquisició de records



que impliquen por [369] i s'ha demostrat que en els mecanismes de plasticitat subjacents al condicionament de la por hi estan implicats els receptors colinèrgics de la LA [370]. Malgrat que les tasques de memòria al LAM no es consideren experiments de condicionament de la por, vam creure que el fet d'exposar als animals a un medi que no els és natural podia generar una resposta emocional de por. Per tant, vam incloure les principals regions de l'amígdala com a objecte d'estudi dels nivells d'AChE. En un estudi previ del nostre laboratori, també es va trobar una correlació entre nivells d'AChE anormalment reduïts i una pitjor execució dels animals en una tasca de DVS al LAM [27]. A partir d'aquestes dades, vam voler fer un estudi dels nivells d'AChE en àrees eminentment colinèrgiques relacionades amb l'aprenentatge i la memòria així com d'àrees relacionades amb els aprenentatges i respostes de por.

En resum, en aquest experiment es van avaluar els efectes de l'AEIC administrada post-entrenament durant un període llarg, sobre 1) la tasca espacial al LAM en un protocol d'entrenament d'alta dificultat, 2) la neurogènesi al gir dentat de l'hipocamp i la seva integració funcional i 3) l'activitat d'acetilcolinesterasa a l'hipocamp i altres àrees relacionades amb la memòria i la por condicionada.

## **2.2 Material i procediment**

### **2.2.1 Subjectes**

Es van utilitzar un total de 61 rates (*Rattus Norvegicus*) albines mascles de la soca Wistar, de 98.22 dies d'edat ( $DE=7.77$ ) i un pes mitjà de 397.67g ( $DE=47.05$ ) a l'inici de l'experiment. Tot allò referent a ètica i benestar animal, tipus, procedència, alimentació i manipulació dels animals, procediments quirúrgics i coordenades d'implantació dels elèctrodes es va realitzar de manera idèntica a l'Experiment V.

### **2.2.2 Administració de BrdU**

La 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) és un nucleòsid sintètic, anàleg de timidina, que s'utilitza habitualment en la detecció de cèl·lules proliferants en teixit viu i, per tant, constitueix un dels mètodes per a estudiar l'existència de NG en determinades àrees del cervell. Estudis de NG en rosegadors han demostrat que les cèl·lules noves que es generen al GD de l'HPC poden sobreviure més de quatre setmanes si s'aplica un protocol d'injeccions de BrdU consecutives [366,367]. Així, per determinar si el tractament amb AEIC alterava la proliferació cel·lular al GD vam injectar BrdU (Sigma-Aldrich Co., St.Louis, MO, USA) intraperitoneal a tots els animals durant 5 dies consecutius, deixant un interval de 7 dies a partir de l'última injecció abans de la cirurgia

estereotàxica. El primer dia es va injectar una dosi de 0.4mL/400g i els següents quatre dies 0.2mL/400g.

### 2.2.3 Aparells

L'aparell d'AEIC utilitzat va ser idèntic al de l'experiment anterior (veure l'apartat *a* del punt 1.2.3 de l'Experiment V). El rang d'intensitats d'estimulació va anar de 50 a 230µA. Tots els paràmetres del corrent estimulant, excepte la intensitat, es van mantenir fixos al llarg de l'experiment.

L'adquisició i test de retenció de la tasca espacial es van realitzar en un LAM idèntic al descrit a l'experiment anterior (veure l'apartat *b* del punt 1.2.3 de l'Experiment V).

### 2.2.4 Conducta d'AEIC

#### a) Assignació a grups experimentals

Inicialment, els subjectes es van distribuir en 2 grups experimentals principals *morris* (m): AEICm (animals que realitzaven la tasca espacial i rebien el tractament d'AEIC) i SHAMm (animals que realitzaven la tasca espacial i servien de control dels efectes de l'AEIC). Addicionalment, per a l'estudi de la NG, es van considerar 2 condicions experimentals en relació al LAM: *nedar* (n) (exercici físic al LAM en absència de senyals contextuais i plataforma) i *sec* (s) (gàbia habitual). A la taula 9 es poden veure els 6 grups experimentals resultants d'un disseny 2x2: Tractament d'AEIC (sí/no) i Condiició experimental al LAM (aprenentatge de la tasca espacial, nedar sense aprenentatge, no LAM o sec). Concretament, AEICn rebia tractament i permetia analitzar els efectes de l'AEIC sobre l'activitat motora, i SHAMn era el seu grup control. El grup AEICs rebia tractament però no duia a terme immersió al LAM i SHAMs era el seu grup control.

		TRACTAMENT D'AEIC	
		Sí	No (control)
CONDICIÓ AL LAM	Morris	<b>AEICm</b>	<b>SHAMm</b>
	Nedar (control)	<b>AEICn</b>	<b>SHAMn</b>
	Sec (control)	<b>AEICs</b>	<b>SHAMs</b>

**Taula 9 Distribució dels grups experimentals.** Grups de tractament d'AEIC (sí/no) a la tasca espacial *morris* i grups de control a les condicions experimentals *nedar* i *sec*.

#### b) Modelament de la conducta d'AEIC i CIO

Aquestes dues fases es van realitzar de manera idèntica als experiments anteriors (veure punt 2.2.5 de l'Experiment I).

### **c) Tractament amb AEIC**

Un cop determinada la IO, durant 10 dies no consecutius els animals dels grups AEICm, AEICn i AEICs van rebre un tractament de 2500 trens d'AEIC a la IO prèviament establerta per cadascun d'ells a la mateixa gàbia de *Skinner* on es va fer el modelament. El grup AEICm va rebre el tractament immediatament després de l'aprenentatge espacial, el grup AEICn immediatament després de nedar i el grup AEICs el va rebre en qualsevol moment dins de la franja horària habitual que els altres grups van rebre el tractament. Mentre els animals dels tres grups AEIC s'autoadministraven el tractament, els dels grups SHAMm, SHAMn i SHAMs els vam deixar en una gàbia de *Skinner* sense rebre tractament durant 45 minuts, temps mitjà equivalent a la durada dels tractaments d'AEIC.

## **2.2.5 Procediment de la tasca de memòria espacial**

### **a) Adquisició de l'aprenentatge**

Tres dies després de les sessions de modelament d'AEIC i CIO, les rates dels grups AEICm i SHAMm van ser entrenades per realitzar la tasca espacial. Com es pot veure a la figura 37, l'adquisició d'aquesta tasca va consistir en 10 sessions d'entrenament diàries durant dues setmanes, amb un interval de 72h entre les 5 primeres i les 5 últimes sessions. Cada sessió es va iniciar des d'una de quatre posicions possibles (N, E, S i O) seguint un programa pseudoaleatori, i cada assaig va consistir en un trajecte de natació des de l'extrem de la piscina fins a la plataforma. Quan la rata no trobava la plataforma en els 90s que durava l'assaig, la guiàvem manualment perquè hi pugés. Passats 15s retiràvem la rata de la piscina. Quan trobava la plataforma per si mateixa igualment la hi deixàvem durant 15s per tal de facilitar l'aprenentatge de la localització de la plataforma.

Paral·lelament, els animals dels grups AEICn i SHAMn van seguir el mateix procediment amb l'única diferència que retiràvem els senyals contextuals i la plataforma. Els animals d'aquests grups van nedar un temps equivalent a les latències realitzades pels subjectes dels grups AEICm i SHAMm, per no exposar-los a un esforç físic superior al que van realitzar els grups d'aprenentatge.

### **b) Test de retenció**

Aquest assaig es va realitzar de manera idèntica al realitzat a l'experiment anterior (veure l'apartat c del punt 1.2.6 de l'Experiment V).

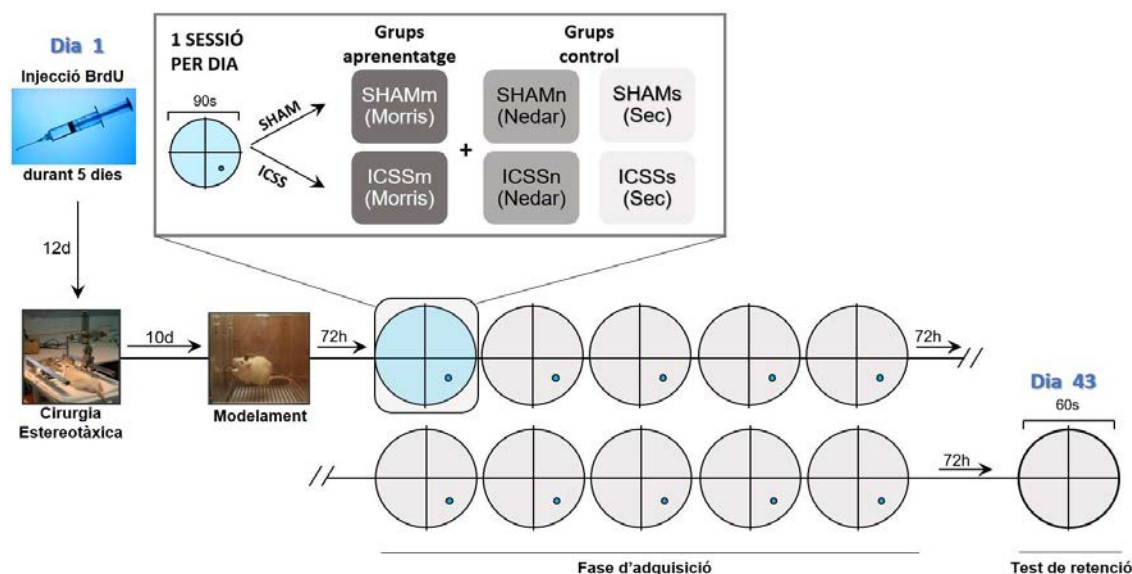


Fig. 37 Diagrama del procediment experimental de l'Experiment VI. Es mostra tot el procés amb les diferents fases, des de l'inici de l'administració de BrdU fins al test de retenció, indicant la distribució dels diferents grups experimentals i control, els intervals de temps entre fases i durada total de l'experiment conductual.

## 2.2.6 Estudi immunohistoquímic

### 2.2.6.1 Recollida de mostres

Noranta minuts després del test de retenció es van sacrificar els animals amb una sobredosi de pentobarbital (150mg/kg, i.p., concentració 60mg/ml). El teixit nerviós es va fixar mitjançant perfusió vascular intracardíaca administrant una solució de 0.1M PBS, pH 7.4, seguit d'una solució de paraformaldehid al 4% en buffer fosfat 0.1M (PBS; pH = 7.4). Es va utilitzar una bomba de perfusió (J.P.Selecta, S.A. Barcelona) a 140rpm amb un caudal aproximat de 40ml/min. Una vegada fixat el teixit es van extreure els cervells i es van guardar en post-fixació en solució de paraformaldehid durant 2 hores en refrigeració. Passat aquest període de post-fixació, es va procedir a la crioprotecció en solució de sucrosa al 15% durant 3 dies i posteriorment es va canviar a solució de sucrosa al 30% durant 24-48 hores per la seva posterior congelació a  $-80^{\circ}\text{C}$  fins a realitzar el marcatge immunohistoquímic.

Amb un criòstat (Cryocut 1800, equipat amb micròtom 2020, Jung) es van recollir seccions seriades de teixit de  $40\mu\text{m}$  de gruix. Per seccionar els cervells i obtenir els talls de les àrees d'interès a fi d'analitzar el marcatge amb BrdU i c-Fos es va procedir de la següent manera: en primer lloc, es va tallar el cervell separant els 2 hemisferis per tal de recollir-los per separat i conservar-los en *free-floating*. Es van realitzar talls coronals de la regió hipocampal (bregma -2.56 a -4.30) [320]. Es van recollir en *ependorfs* en el

micròtom a  $-20^{\circ}\text{C}$  i es van traslladar en neu carbònica a un congelador de  $-80^{\circ}\text{C}$ . De cada subjectes també es van recollir mostres corresponents a les coordenades -2.28 a -3.12 per tal de determinar la ubicació de l'elèctrode, es van muntar en portaobjectes gelatinitzats i es van tenyir amb *violeta de cresil*.

### 2.2.6.2 Tinció immunohistoquímica

El procediment de tinció immunohistoquímica pel doble marcatge BrdU/c-Fos es va dur a terme en seccions coronals en suspensió, seguint el protocol detallat a l'Annex 2. Durant aquest procés, es van obtenir aleatòriament mostres per control negatiu del procediment immunohistoquímic a les quals no es van afegir els anticossos. Una vegada finalitzat el procediment, les seccions es van muntar en portaobjectes amb un medi fluorescent (Dako) i es van guardar a  $4^{\circ}\text{C}$  aïllant-les de qualsevol font de llum.

### 2.2.6.3 Presa d'imatges i anàlisi

Les microfotografies de l'HPC es van obtenir amb un microscopi automàtic de fluorescència Nikon ECLIPSE 90i equipat amb una càmera DS-5M i unitat de control de càmera DS-L1. Es van prendre microfotografies a 4x per mesurar la longitud total del GD de cada secció de teixit. A continuació es van prendre fotografies a 20x abastant el total del GD per facilitar el recompte posterior de cèl·lules BrdU+, c-Fos+ i DAPI+. Es van fer fotografies de zones consecutives evitant el solapament i amb diferent enfocament per poder comptabilitzar el total de cèl·lules marcades de la zona, ubicades a diferent profunditat. Vam delimitar dues zones de localització de NG, les capes granular i subgranular del GD i, addicionalment, vam prendre microfotografies de les zones CA1, CA2 i CA3 per quantificar les cèl·lules c-Fos+.

Les diferents capes del GD es van analitzar de manera independent i es van fer estudis comparatius considerant dues categories en relació al nivell d'integració: cèl·lules recentment integrades (a la capa subgranular) i cèl·lules completament integrades (a la capa granular). Addicionalment es va fer un estudi de colocalització d'aquelles cèl·lules integrades (BrdU+) al GD i que suposadament havien estat activades (c-Fos+).

Es va utilitzar el *software* d'anàlisi d'imatges Image-J 1.45s (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>), a fi d'analitzar la superfície (en  $\text{mm}^2$ ) de cada GD per obtenir la densitat de cèl·lules immunopositives.

#### 2.2.6.4 Tinció enzimàtica d'ACHe i anàlisi quantitativa

La recollida de mostres per l'estudi de l'activitat AChE a l'HPC, l'amígdala, el còrtex retrosplenial, infralímbic i prelímbic, els nuclis tegmental dorsal, accumbens, i parabraquial es va realitzar amb un mètode *free-floating* seguint el protocol detallat a l'annex 3. Els talls es van deshidratar i muntar en portaobjectes per observar-los al microscopi posteriorment, com s'especifica a l'annex 4. Per la presa de microfotografies es va utilitzar un microscopi Olympus BX-41 acoblat a una càmera digital Olympus DP-70 (Japó), amb una lent de 10x. Els paràmetres de llum es van mantenir constants per la presa de totes les microfotografies. Per avaluar els nivells d'intensitat de la tinció d'ACHe es va utilitzar el software Image-J 1.45s. Per mesurar la intensitat del senyal de la reacció enzimàtica vam delimitar regions d'interès idèntiques en forma de cercle que vam aplicar repetidament a cada àrea d'estudi. Vam aplicar entre 8 i 10 cercles sense solapar-se dins de l'àrea i a continuació vam realitzar la mitjana de les intensitats obtingudes per cada cercle, així mateix, vam fer la mitjana de tres talls corresponents a cada subjecte. Els nivells d'intensitat observats a cada tall es van comparar amb la intensitat observada en regions de substància blanca del mateix tall per obtenir la mesura relativa final.

#### 2.2.7 Anàlisi estadística

Les anàlisis principals de la tasca espacial al LAM (grups AEICm i SHAMm) es van dur a terme considerant la variable independent *tractament* com a qualitativa amb dues categories i les variables dependents com a quantitatives. Per l'aprenentatge al LAM la principal variable dependent analitzada va ser la *latència*. Les comparacions entre grups de les sessions d'adquisició es van fer usant anàlisis multivariants de la variància (model lineal general (MLG) de mesures repetides) amb l'objectiu d'analitzar les variables d'estudi indicades anteriorment i les de control *temps en parets* (percentatge de temps que els animals nedaven a prop de les parets de la piscina, com a mesura de tigmotaxi), *distància* (distància total nedada en cm) i *velocitat* de natació (en cm/s), també vam realitzar una anàlisi de contrast polinomial per explorar si hi havia una tendència lineal o quadràtica al llarg de les sessions d'entrenament. Pel test de retenció, es van realitzar proves *t-test* de mostres independents per comparar l'execució dels subjectes d'ambdós grups en relació al percentatge de *temps al quadrant target*, nombre de *creuaments del target* (nombre de vegades que passaven pel punt on es localitzava la plataforma durant l'aprenentatge), *velocitat*, i percentatge de *temps a l'annulus del target*. Posteriorment a l'anàlisi qualitativa de les estratègies de natació, vam fer un test *chi-quadrat* per determinar diferències estadístiques entre grups.

Es va aplicar una ANOVA mixta per analitzar les dades de NG, activació neuronal i integració funcional. Per l'estudi dels nivells de BrdU, c-Fos i de l'activitat AChE es va aplicar un disseny factorial 2x3 (GRUP x CONDICIÓN EXPERIMENTAL) incloent 6 grups: AEIC i SHAM en les condicions experimentals *morris*, *nedar* i *sec* descrits a l'apartat 2.1.4. El nivell de significació per tots els tests es va establir en  $\alpha=0.05$  i tot el processament de dades es va realitzar mitjançant el paquet estadístic SPSS v23 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA).

## 2.3 Resultats

### 2.3.1 Subjectes

La mostra inicial constava de 69 subjectes, un total de 8 van ser exclosos de l'experiment. En concret, 2 subjectes van morir durant el procés experimental, 2 van patir diferents tipus de ferides hemorràgiques, 2 no van respondre adequadament al tractament d'AEIC i 2 més els vam descartar per ser *outliers*. Per l'anàlisi de la tasca de memòria, la mostra va estar formada per 32 subjectes (AEICm: n=15; SHAMm: n=17). Addicionalment, es van excloure 6 subjectes de l'anàlisi de NG, activació neuronal i integració funcional. La mostra va estar formada per 55 subjectes (AEICm: n=13; SHAMm: n=16; AEICn: n=6; SHAMn: n=8; AEICs: n=6; SHAMs: n=6). Per l'anàlisi d'AChE la mostra va estar formada per 52 subjectes (AEICm: n=12; SHAMm: n=15; AEICn: n=6; SHAMn: n=7; AEICs: n=6; SHAMs: n=6). Per les anàlisis histològiques vam disposar d'una mostra menor degut a la manca de teixit i material fotogràfic de qualitat. Es va dur a terme un control regular del pes dels subjectes com a indicador de canvis de salut que podrien haver afectat l'aprenentatge. L'anàlisi de la variància va mostrar que els subjectes partien de pesos similars a l'inici i no es van trobar diferències entre grups en l'evolució del pes al llarg de l'experiment.

### 2.3.2 Paràmetres d'AEIC

A la taula 10 es descriuen els rangs, valors mitjans i, entre parèntesi, les desviacions estàndard de les variables d'AEIC per cada grup de tractament.

	Intensitat d'estimulació ( $\mu\text{A}$ )	Durada del tractament (minuts)
<b>AEICm</b>	Rang: 47.50 a 226.50 Mitjana: 86.27 (52.834)	Rang: 42.30 a 86.10 Mitjana: 54.487 (11.001)
<b>AEICn</b>	Rang: 51.50 a 68.00 Mitjana: 60.571 (6.509)	Rang: 44.60 a 68.10 Mitjana: 60.5714 (7.832)
<b>AEICs</b>	Rang: 49.00 a 107.50 Mitjana: 67.643 (18.603)	Rang: 45.50 a 74.40 Mitjana: 55.342 (9.354)

Taula 10 **Paràmetres del tractament amb AEIC**. Es representen els valors mitjans ( $\pm\text{DE}$ ) dels paràmetres d'AEIC del subjectes que van rebre tractament.

L'anàlisi de la variància no va mostrar diferències significatives entre grups ni en la *intensitat d'estimulació* ni en la *durada del tractament*. Les anàlisis correlacionals no van mostrar correlacions estadísticament significatives entre les variables conductuals i els paràmetres d'AEIC, per cap dels grups experimentals.

### 2.3.3 Sessions d'adquisició

La figura 38 mostra la mitjana de les latències de cada grup d'entrenament a la tasca espacial (ICSSm i SHAMm). El factor SESSIÓ va resultar significatiu [ $F_{9,270}=5.520$ ,  $P<.0001$ ] així com la interacció GRUP x SESSIÓ [ $F_{9,270}=1.966$ ,  $P=.043$ ]. Una anàlisi dels efectes simples va mostrar que les diferències entre grups apareixien a la tercera sessió ( $P=.046$ ) i es mantien a la quarta ( $P=.042$ ) i cinquena sessió ( $P=.023$ ) però desapareixien en les cinc sessions següents de la segona setmana d'entrenament.

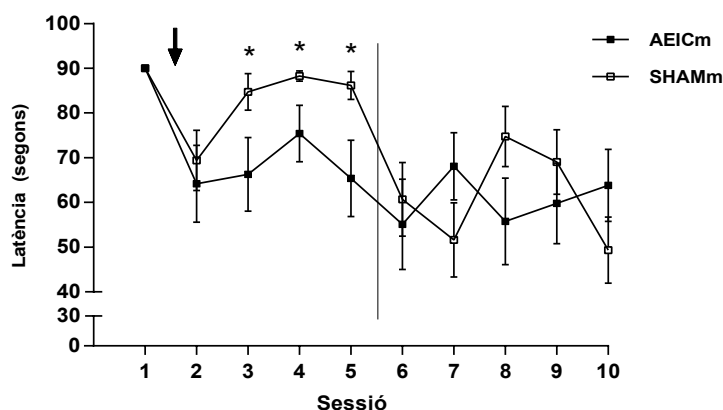


Fig. 38 **Efectes de l'AEIC al llarg de les sessions d'adquisició**, mesurat amb les mitjanes de la *latència* ( $\pm\text{SE}$ ) durant les 10 sessions. La fletxa mostra el moment en què els subjectes del grup AEICm reben la primera sessió de tractament. \* $P<.05$ .



### 2.3.4 Test de retenció

A la sessió de retenció no vam trobar diferències significatives entre els grups AEICm i SHAMm en cap de les variables d'estudi *temps al quadrant target* [ $t_{30}=-0.589$ ,  $P=.560$ ] (Fig.39A), nombre de *creuaments del target* [ $t_{30}=0.351$ ,  $P=.728$ ] (Fig.39B) i *temps a l'annulus del target* [ $t_{30}=-0.588$ ,  $P=.561$ ] (Fig.39C), ni en les de control. Tampoc vam observar correlació entre l'execució a la fase d'aprenentatge i els resultats de la retenció.

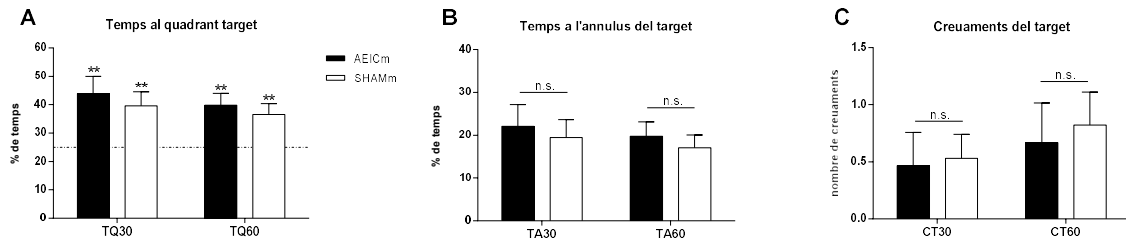
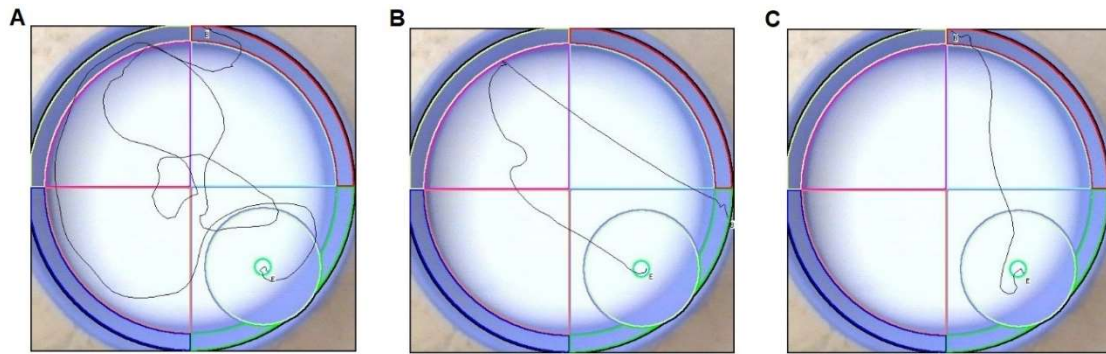


Fig. 39 Efectes de l'AEIC al test de retenció. (A) percentatge de *temps al quadrant target*, TQ30 i TQ60 ( $\pm$ SE); (B) percentatge de *temps a l'annulus del target* TA30 i TA60 ( $\pm$ SE); (C) nombre de *creuaments del target* CT30 i CT60 ( $\pm$ SE). La línia discontinua a la gràfica A indica el nivell d'atzar (25%). \*\* $P < .01$

### 2.3.5 Trajectòries de natació

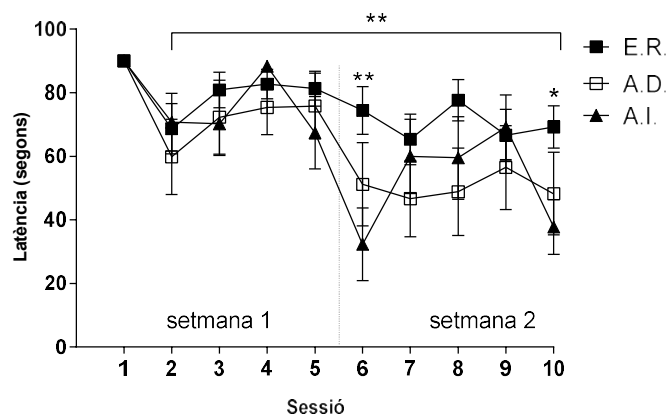
L'anàlisi qualitativa de les trajectòries de natació al LAM es va realitzar per l'observació de les darreres sessions de cada bloc (setmanes 1 i 2), en les quals se suposa que els animals presenten l'estratègia més *eficient* per a resoldre la tasca (sessions 4, 5, 9 i 10), i vam observar que les trajectòries mostrades pels subjectes eren de 2 tipus diferents. Alguns animals van mostrar una estratègia espacial relacional (Fig.40A) basada en l'observació de tots els senyals contextuais presents a l'entorn del LAM; mentre que altres van mostrar una estratègia associativa amb dues variants, indirecta (Fig.40B) o directa (Fig.40C). Aquells subjectes que van aplicar estratègies associatives semblaven guiar-se solament pels estímuls lluminosos del quadrant oposat a la plataforma (estratègia indirecta) i del quadrant *target* (estratègia directa).



**Fig. 40** Imatges d'exemple d'estratègies de natació espacial relacional i associativa que els animals aplicaven per resoldre la tasca al LAM. El quadrant a baix a la dreta correspon a la ubicació de la plataforma; el cercle concèntric extern correspon a la zona *annulus* del target; el cercle més petit correspon a la ubicació exacta de la plataforma. (A) subjecte del grup AEICm mostrant una estratègia espacial relacional a la sessió 5; (B) subjecte AEICm mostrant una estratègia associativa indirecta a la sessió 10 i (C) subjecte SHAMm mostrant una estratègia associativa directa a la sessió 9.

### 2.3.5.1 Anàlisi comparativa de l'adquisició segons les trajectòries de natació

Cada animal va ser classificat, en funció de l'estratègia predominant observada a les sessions 4,5, 9 i 10, en un dels següents 3 grups: espacial relacional, associativa directa i associativa indirecta. A la figura 41 es poden observar les mitjanes de les latències al llarg de les sessions d'adquisició pels subjectes, segons la seva estratègia o trajectòria de natació predominant. Els factors principals ESTRATÈGIA i SESSIÓ van ser significatius [ $F_{2,29}=4.671$ ,  $P=.017$  i  $F_{9,261}=6.403$ ,  $P<.0001$ , respectivament], però la interacció ESTRATÈGIA x SESSIÓ no va ser significativa [ $F_{18,261}=1.111$ ,  $P=.314$ ]. L'anàlisi d'efectes simples va mostrar diferències entre els grups *estratègia espacial relacional* i *estratègia indirecta* a la sessió 6 ( $P=.009$ ) i la sessió 10 ( $P=.010$ ).



**Fig.41** Latències en la fase d'adquisició segons l'estratègia de natació. Efectes al llarg de les 10 sessions d'adquisició per cada estratègia i sessió ( $\pm$ SE). Abreviatures: E.R., espacial relacional; A.D., associativa directa; A.I., associativa indirecta. \* $P<.05$ ; \*\* $P<.01$

Amb l'objectiu de comparar les dues principals estratègies de natació observades (espacial relacional i associativa) vam analitzar les latències dels subjectes que aplicaven estratègies associatives directa i indirecta de manera conjunta (Fig.42A). Els

efectes principals dels factors ESTRATÈGIA i SESSIÓ van ser significatius [ $F_{1,30}=9.484$ ,  $P=.004$  i  $F_{9,270}=5.634$ ,  $P<.0001$ , respectivament], però no hi havia interacció ESTRATÈGIA x SESSIÓ [ $F_{9,270}=1.472$ ,  $P=.158$ ]. L'anàlisi d'efectes simples va trobar que les diferències significatives apareixien a la sessió 6 ( $P=.008$ ) i es repetien a les sessions 8 ( $P=.047$ ) i 10 ( $P=.015$ ).

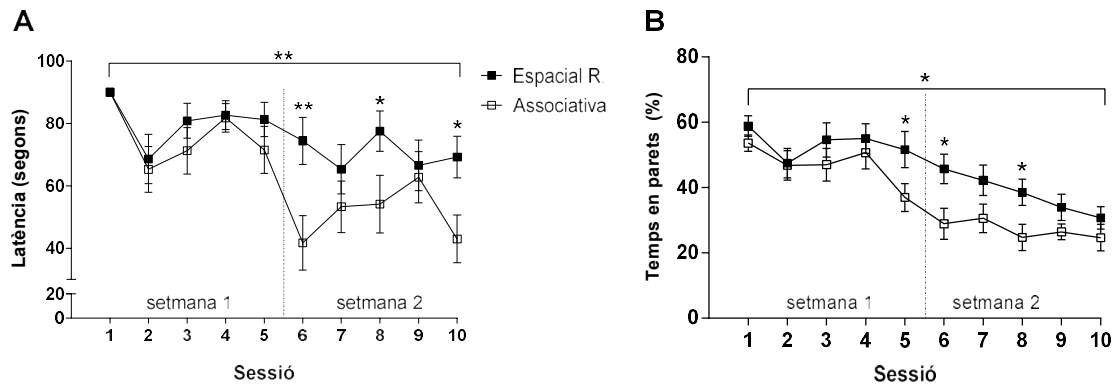


Fig. 42 Efectes del 2 principals tipus d'estratègies (espacial relacional i associativa) sobre l'adquisició de la tasca. (A) Es mostra l'evolució de les latències al llarg de les sessions d'adquisició per cada estratègia ( $\pm$ SE). (B) Evolució de la tigmotaxi (*temps en parets*) al llarg de les sessions d'adquisició per cada estratègia. \* $P<.05$ ; \*\* $P<.01$ .

Vam trobar resultats similars per la variable de control *temps en parets*, essent significatius els efectes principals dels factors SESSIÓ i ESTRATÈGIA [ $F_{9,270}=14.836$ ,  $P<.0001$  i  $F_{1,30}=6.703$ ,  $P=.015$ , respectivament] però sense ser significativa la seva interacció [ $F_{9,270}=0.959$ ,  $P=.474$ ]. Tal com es mostra a la figura 42B, els animals que van seguir una estratègia espacial presentaven un temps significativament major en parets a les sessions 5 ( $P=.043$ ), 6 ( $P=.017$ ) i 8 ( $P=.022$ ) i al global de la segona setmana ( $t_{30}=2.706$ ,  $P=.012$ ).

### 2.3.5.2 Efectes de l'AEIC en les diferents estratègies

La taula 11 mostra el percentatge de subjectes de cadascun dels principals grups experimentals (AEICm i SHAMm) que van mostrar una de les 3 estratègies descrites al punt anterior.

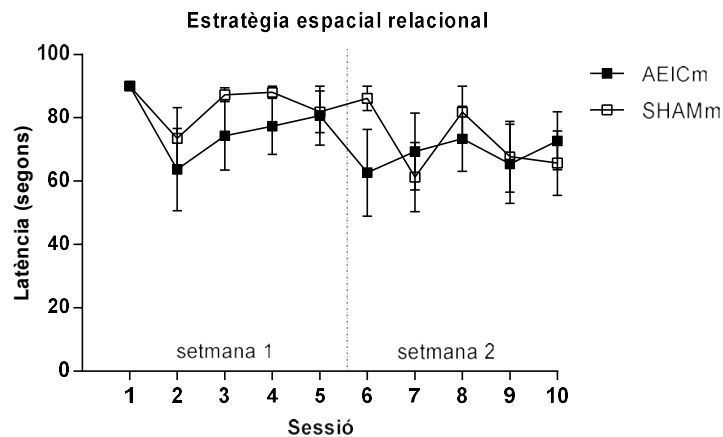
		Estratègia de natació			Total
		Espacial relacional	Associativa directa	Associativa indirecta	
Grup	AEICm	53.3% (8)	26.7% (4)	20.0% (3)	100% (15)
	SHAMm	47.1% (8)	26.7% (4)	29.4% (5)	100% (17)

Taula 11 Percentatge d'animals dels grups AEICm i SHAMm que mostren preferència per una estratègia espacial relacional o una estratègia associativa. La distribució es mostra per grup experimental d'aprenentatge al LAM. La freqüència es mostra entre parèntesi després del percentatge.

L'anàlisi *chi-quadrat* va posar de manifest que no existien diferències entre grups en quant al tipus d'estratègia utilitzada, donat que van presentar similars distribucions [ $X^2_{2,32}=0.376$ ,  $P=.828$ ].

### 2.3.5.3 Efectes de l'AEIC segons les estratègies espacial relacional i l'associativa

També vam estudiar els possibles efectes de l'AEIC sobre l'adquisició de la tasca per cada subgrup d'animals en funció de l'estratègia principal utilitzada. Els grups AEIC i SHAM no van mostrar diferències significatives en quant a les latències de resposta a la fase d'adquisició quan es considerava el subgrup de subjectes que van mostrar una estratègia *espacial relacional* (Fig.43), no resultant significatius tampoc ni el factor SESSIÓ ni la interacció GRUP x SESSIÓ [ $F_{9,126}=1.646$ ,  $P=.109$  i  $F_{9,126}=0.572$ ,  $P=.818$ , respectivament].



**Fig. 43 Efectes del tractament d'AEIC sobre els grups de subjectes que van mostrar una estratègia espacial relacional.** Latències mitjanes per grup ( $\pm$ SE), seleccionant només aquells subjectes de cada grup experimental que van mostrar una estratègia espacial relacional.

En canvi, vam trobar diferències entre grups quan vam seleccionar només aquells animals que havien mostrat una estratègia associativa. Tant el factor SESSIÓ com la interacció GRUP x SESSIÓ van resultar significatius [ $F_{9,126}=5.113$ ,  $P<.0001$  i  $F_{9,126}=2.619$ ,  $P=.008$ , respectivament]. Tal com es mostra a la figura 44, l'anàlisi d'efectes simple va indicar diferències significatives entre grups a la sessió 5 ( $P=.015$ ). Aquestes dades van posar de manifest que el tractament d'AEIC semblava tenir efectes positius sobre l'adquisició de la tasca, especialment en aquells subjectes que van seguir una estratègia associativa.

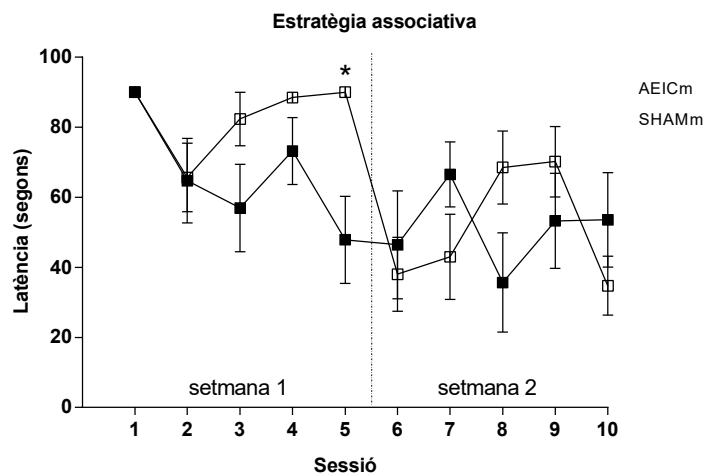


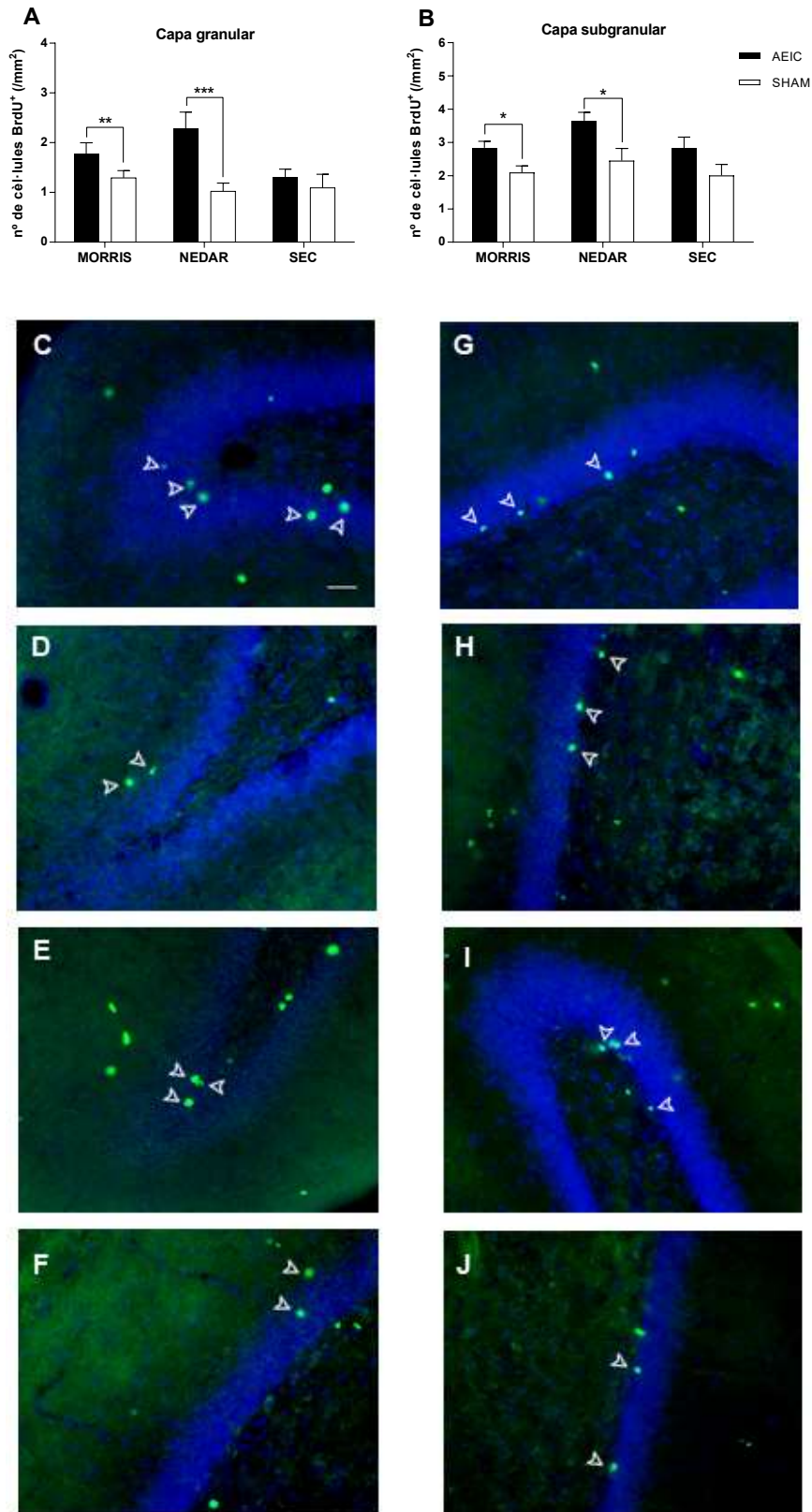
Fig. 44 Efectes de l'AEIC en l'adquisició de la tasca pels grups de subjectes que van mostrar una estratègia associativa. Latències mitjanes per grup ( $\pm$ SE), seleccionant només aquells subjectes de cada grup experimental que van mostrar una estratègia associativa directa o indirecta. \* $P < .05$ .

### 2.3.6 Proliferació de cèl·lules BrdU+

Una anàlisi ANOVA va mostrar que les dues capes del GD estudiades (granular i subgranular) eren significativament diferents en el nombre de cèl·lules BrdU+. La capa subgranular va presentar un major nombre de cèl·lules BrdU+ comparada amb la capa granular [ $F_{1,54}=75.34$ ,  $P < .001$ ]. Considerant les dues capes i totes les condicions experimentals, els subjectes dels grups AEIC van presentar un major nombre de neurones BrdU+ comparats amb els dels grups SHAM [ $F_{1,54}=18.58$ ,  $P < .001$ ]. Tenint en compte que trobar NG en una capa o l'altra pot tenir significats diferents en quant al temps que tarden les cèl·lules a incorporar-se a la capa subgranular i a integrar-se a la granular, vam analitzar les dues capes per separat (Fig.45).

#### 2.3.6.1 Capa granular

Les dades procedents d'una anàlisi específica de la capa granular del GD van mostrar diferències significatives per la variable TRACTAMENT [ $F_{1,49}=12.668$ ,  $P = .001$ ], amb tendència a la significació en la interacció TRACTAMENT x CONDICIÓN EXPERIMENTAL [ $F_{2,49}=2.553$ ;  $P = .088$ ]. Per tant, vam decidir analitzar les diferents capes i condicions experimentals per separat. A l'anàlisi de la capa granular, per les condicions experimentals *morris* i *nedar*, els subjectes que van rebre tractament amb AEIC presentaven un major nombre de cèl·lules BrdU+ que els dels grups SHAM [ $F_{1,49}=4.01$ ,  $P = .050$  i  $F_{1,54}=12,54$ ,  $P = .001$ , respectivament], En canvi per la condició *sec* no vam trobar diferències [ $F_{1,54}=0.34$ ,  $P = .565$ ] (Fig.45A).



**Fig. 45 Efectes de l'AEIC sobre la neurogènesi observats amb marcatge BrdU+/DAPI al GD.** (A) nombre de cèl·lules BrdU+ per cada grup i condició experimental a la capa granular del GD. (B) nombre de cèl·lules BrdU+ per cada grup i condició experimental a la capa subgranular del GD. A les microfotografies de la columna esquerra s'observen cèl·lules BrdU+ a la capa granular indicades amb fletxes: (C) Grup AEICm (D) Grup SHAMm, (E) grup AEICn i (F) grup SHAMn. La columna de la dreta mostra cèl·lules BrdU+ a la capa subgranular del GD indicades amb fletxes: (G) grup AEICm, (H) grup SHAMm, (I) grup AEICn i (J) grup SHAMn. Barra d'escala=20µm \*\*\*P<.001, \*\*P<.01 i \*P<.05

L'estudi de la comparació entre condicions experimentals dins de cada grup de TRACTAMENT (AEIC o SHAM) no va mostrar diferències entre les condicions pels subjectes dels grups SHAM. En canvi, pels grups AEIC vam trobar diferències significatives entre condicions experimentals a la capa granular. Els subjectes a la condició *nedar* van presentar un major nombre de cèl·lules BrdU+ [ $F_{1,54}=5.82$ ,  $P=.020$ ] i aquest efecte també el vam trobar a la condició *morris* [ $F_{1,54}=4.31$ ,  $P=.043$ ], comparat amb els subjectes dels grups que no tenien accés al LAM (Fig.46).

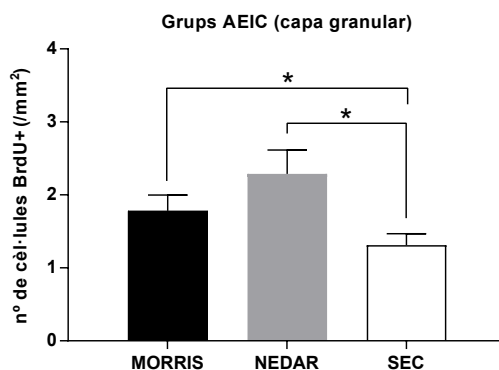


Fig.46 Nombre de cèl·lules BrdU+ a la capa granular del GD pels grups que havien rebut AEIC. Es mostren les diferències entre condicions experimentals per aquells subjectes dels grups AEICm, AEICn i AEICs). \* $P<.05$

### 2.3.6.2 Capa subgranular

L'anàlisi de la capa subgranular va posar de manifest que el factor TRACTAMENT era significatiu [ $F_{1,49}=12.132$ ,  $P=.001$ ], independentment de la condició experimental. Malgrat no trobar interacció TRACTAMENT x CONDICIÓN EXPERIMENTAL [ $F_{2,49}=0.301$ ,  $P=.741$ ] vam considerar rellevant destacar que l'estudi d'efectes simples va posar de manifest resultats similars als observats a la capa granular, és a dir, que el grup AEIC va presentar major nombre de cèl·lules BrdU+ que el SHAM a les condicions *morris* i *nedar* [ $F_{1,54}=4.96$ ,  $P=.030$  i  $F_{1,54}=4.64$ ,  $P=.035$ , respectivament] (Fig.45B).

### 2.3.7 Cèl·lules cFos+ a l'HPC

#### 2.3.7.1 Gir dentat

L'anàlisi ANOVA va mostrar que, en global, el nombre de cèl·lules cFos+ era significativament més alt a la capa granular que a la subgranular [ $F_{1,54}=170.54$ ,  $P<.0001$ ].

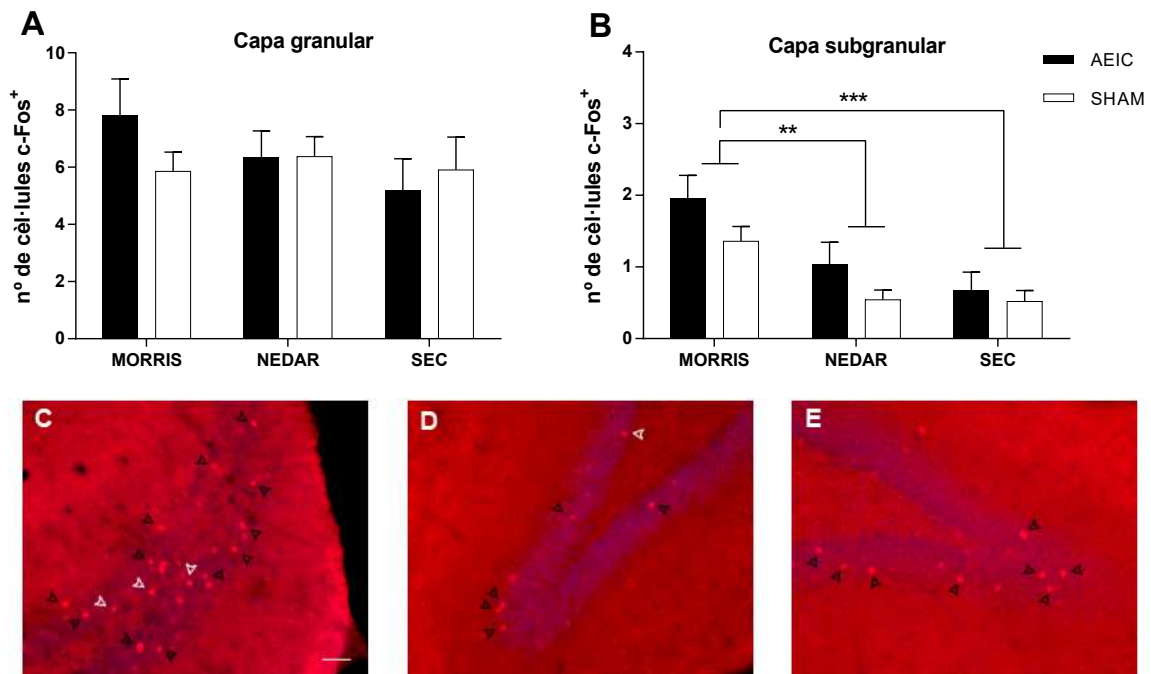
#### 2.3.7.2 Capa granular

A l'estudi de cadascuna de les capes per separat vam trobar que, per la capa granular, cap dels factors principals TRACTAMENT i CONDICIÓN EXPERIMENTAL [ $F_{1,54}=0.18$ ,

$P=.672$  i  $F_{2,54}=0.70$ ,  $P=.500$ , respectivament], ni la seva interacció [ $F_{2,54}=0.94$ ,  $P=.398$ ] eren significatius (Fig.47A).

### 2.3.7.3 Capa subgranular

En canvi, per la capa subgranular vam trobar diferències entre les condicions experimentals [ $F_{1,54}=9.71$ ,  $P<.0001$ ] independentment del tractament [ $F_{2,54}=0.314$ ,  $P=.732$ ] i una tendència a la significació en les diferències entre els nivells del factor TRACTAMENT [ $F_{1,54}=3.08$ ,  $P=.085$ ]. L'estudi de contrastos entre les diferents condicions experimentals va mostrar que l'expressió de c-Fos en les condicions *morris* i *nedar* era significativament superior a l'observada en la condició *sec* [ $F_{1,54}=10.62$ ,  $P=.002$  i  $F_{1,54}=13.15$ ,  $P<.001$ , respectivament], tal com es mostra a la figura 47B.



**Fig.47 Comparacions múltiples entre grups i condicions experimentals i imatges representatives.** (A) Nombre de cèl·lules cFos<sup>+</sup> a la capa granular del GD ( $\pm$ SE) i (B) a la capa subgranular ( $\pm$ SE). \*\*\* $P<.0001$ , \*\* $P<.01$ , \* $P<.05$ . (C) microfotografies on es mostren cèl·lules BrdU<sup>+</sup> sobre DAPI de la condició *morris* (D) de la condició *nedar* i (E) de la condició *sec*. Les fletxes blanques assenyalen cèl·lules c-Fos<sup>+</sup> ubicades a la capa subgranular del GD i les fletxes negres les que es troben a la capa granular. Escala=20 $\mu$ m.

### 2.3.7.4 CA1 i CA3

L'anàlisi de la variància no va trobar diferències significatives en cap dels factors principals (TRACTAMENT [ $F_{1,49}=0.99$ ,  $P=.325$ ] i CONDICIÓ EXPERIMENTAL [ $F_{2,49}=3.15$ ,  $P=.052$ ]), ni en la seva interacció [ $F_{2,49}=0.74$ ,  $P=.484$ ].

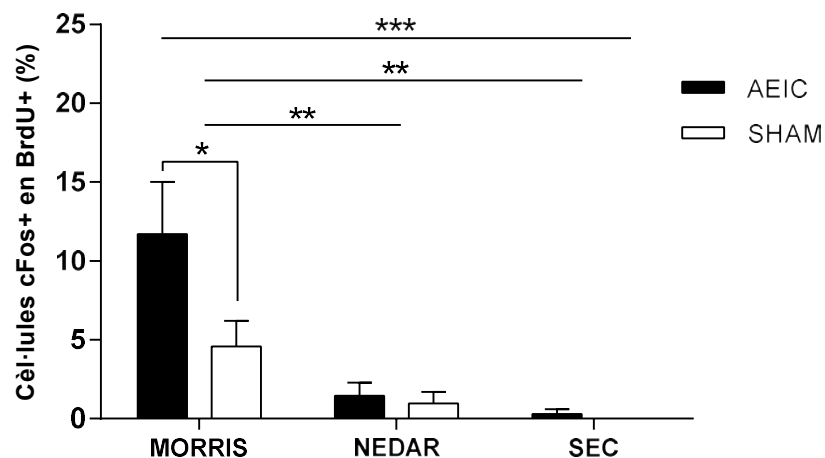


### 2.3.8 Integració funcional de neurones noves (BrdU+/cFos+)

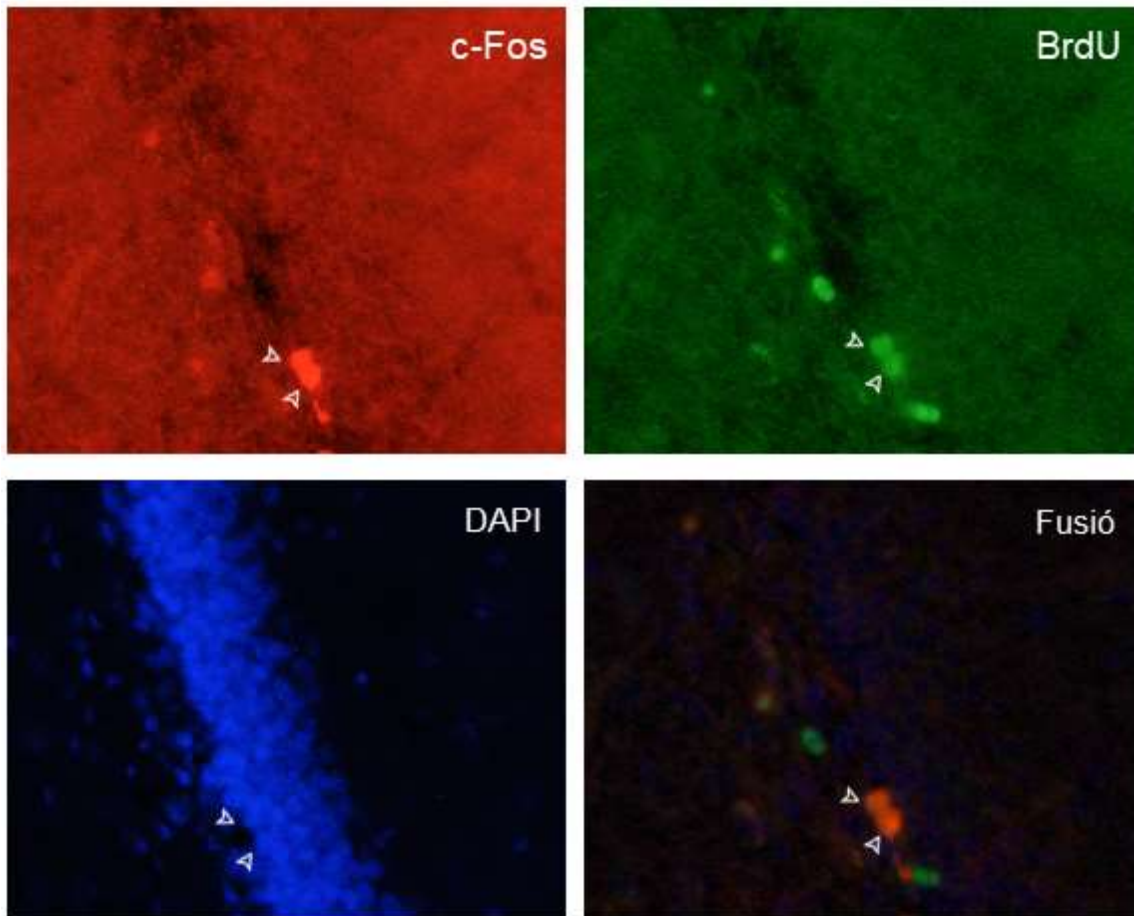
L'observació del doble marcatge cFos+ en cèl·lules BrdU+ ens va permetre quantificar les neurones generades en l'edat adulta de l'animal que s'activaven en les diferents condicions experimentals i que, per tant, podíem suposar que s'havien incorporat a circuits funcionals del GD. L'estudi quantitatiu el vam realitzar considerant la proporció de colocalitzacions segons el nombre de neurones BrdU+.

#### Gir dentat

Els resultats van indicar que ambdues capes analitzades, la granular i la subgranular del GD, presentaven nivells similars de colocalitzacions per mm<sup>2</sup> [ $F_{1,49}=2.76$ ,  $P=.103$ ]. Així, considerant el GD en conjunt, el factor CONDICIÓN EXPERIMENTAL va ser significatiu [ $F_{2,54}=3.85$ ,  $P=.028$ ], però no el TRACTAMENT [ $F_{1,54}=0.11$ ,  $P=.747$ ], ni la seva interacció [ $F_{2,54}=0.03$ ,  $P=.974$ ]. Tal com es mostra a la figura 48, l'anàlisi de contrastos va indicar que els subjectes sotmesos a la condició *morris* presentaven significativament major nombre de colocalitzacions c-Fos+/BrdU+ que els sotmesos a les condicions *nedar* i *sec* [ $F_{1,54}=7.79$ ,  $P=.007$  i  $F_{1,54}=9.36$ ,  $P=.004$ , respectivament]. Així mateix, malgrat que la interacció no va ser significativa, la comparació dels grups AEIC i SHAM dintre de cada condició experimental va indicar que els animals tractats amb AEIC presentaven un nombre significativament superior de colocalitzacions que els SHAM, únicament a la condició *morris* [ $F_{1,54}=4.81$ ,  $P=.033$ ], però no a la resta de condicions (*nedar*:  $F_{1,54}=0.12$ ,  $P=.729$  i *sec*  $F_{1,54}=0.00$ ,  $P=.945$ ). La figura 49 mostra imatges d'exemple de colocalitzacions.



**Fig.48 Percentatge de cèl·lules que expressaven el doble marcatge BrdU+/c-Fos+.** A la gràfica es mostren les diferències entre grups i condicions experimentals en el nombre de colocalitzacions a la capa granular del GD de l'HPC ( $\pm$ SE) \* $P<0.05$ ; \*\* $P<0.01$ ; \*\*\* $P.001$ .



*Fig.49 Anàlisi microscòpica de colocalitzacions al GD.* D'esquerra a dreta i de dalt a baix es mostren cèl·lules marcades amb c-Fos (vermell) assenyalades amb una fletxa blanca, i cèl·lules marcades amb BrdU (verd). En blau es mostren els nuclis cel·lulars al GD, les fletxes assenyalen els nuclis corresponents a les cèl·lules indicades a les dues imatges anteriors. Les colocalitzacions a baix a la dreta corresponen a la superposició d'imatges amb marcatge c-Fos/BrdU i el marcador nuclear DAPI.

### 2.3.9 Activitat AChE

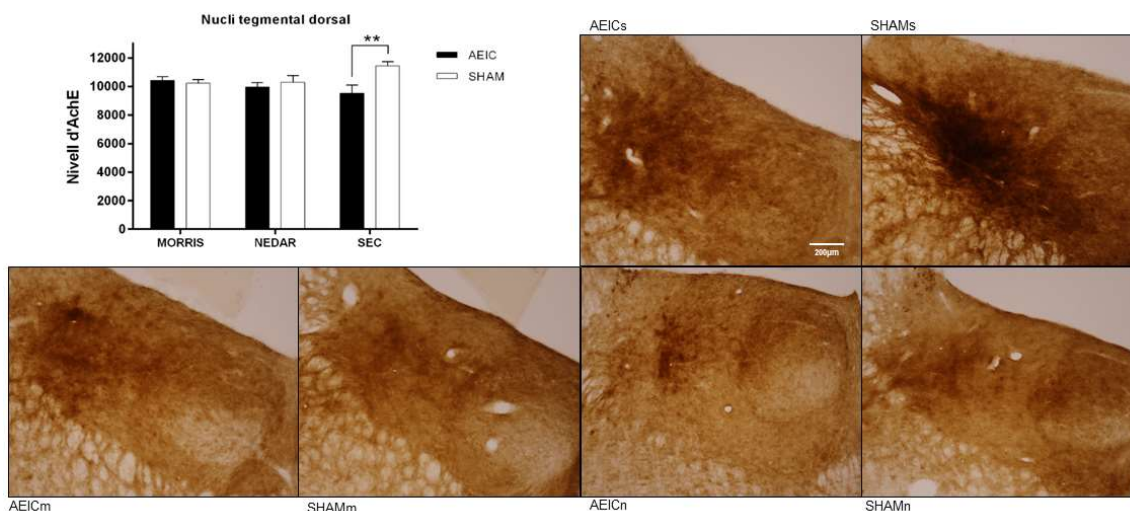
La taula 12 resumeix els resultats estadístics per totes les àrees analitzades, mostrant els factors i la seva interacció, amb els valors  $F$  i  $p$  corresponents. Com es pot observar, només es van trobar variacions en la intensitat del senyal d'AChE en dues de les zones estudiades: el nucli tegmental dorsal del tronc de l'encèfal i l'amígdala. En canvi, a la resta de zones, al gir dentat i àrees CA1 i CA3 de l'hipocamp, nucli accumbens, escorça retrosplenial i regions infralímbica i prelímbica de l'escorça prefrontal, cap dels factors principals ni la seva interacció va resultar significativa.

			Anàlisi ANOVA (valors $F$ i $p$ )		
			FACTORS		
Regió			TRACTAMENT	CONDICIÓ	Interacció
CRS	CRSg	Capa I	$F_{1,49}=1.26; P=.269$	$F_{2,49}=1.02; P=.367$	$F_{2,49}=3.42; P=.042^*$
		Capes III-IV	$F_{1,49}=0.00; P=.992$	$F_{2,49}=2.11; P=.133$	$F_{2,49}=0.81; P=.453$
		Capa V	$F_{1,49}=0.04; P=.842$	$F_{2,49}=0.94; P=.398$	$F_{2,49}=1.14; P=.329$
		Capa VI	$F_{1,49}=0.37; P=.544$	$F_{2,49}=0.25; P=.782$	$F_{2,49}=0.21; P=.815$
	CRSag	--	$F_{1,49}=0.17; P=.681$	$F_{2,49}=0.34; P=.716$	$F_{2,49}=0.52; P=.595$
HPC	CA1	$F_{1,52}=1.37; P=.248$	$F_{2,52}=0.73; P=.487$	$F_{2,52}=1.29; P=.284$	
	CA2	$F_{1,51}=0.01; P=.905$	$F_{2,51}=1.22; P=.304$	$F_{2,51}=0.68; P=.512$	
	CA3	$F_{1,52}=0.02; P=.891$	$F_{2,52}=0.94; P=.397$	$F_{2,52}=0.14; P=.872$	
	GD	$F_{1,53}=0.34; P=.561$	$F_{2,53}=0.74; P=.481$	$F_{2,53}=0.22; P=.807$	
CPF	IL	$F_{1,53}=0.07; P=.799$	$F_{2,53}=1.83; P=.172$	$F_{2,53}=0.66; P=.523$	
	PL	$F_{1,53}=0.72; P=.401$	$F_{2,53}=0.53; P=.595$	$F_{2,53}=0.03; P=.972$	
Amígdala	BLA	$F_{1,53}=0.10; P=.754$	$F_{2,53}=2.72; P=.076$	$F_{2,53}=0.22; P=.801$	
	LA	$F_{1,53}=0.55; P=.463$	$F_{2,53}=4.74; P=.013^*$	$F_{2,53}=0.28; P=.756$	
	CE	$F_{1,53}=1.24; P=.271$	$F_{2,53}=0.09; P=.917$	$F_{2,53}=1.92; P=.158$	
NAcc	Core	$F_{1,50}=0.04; P=.834$	$F_{2,50}=0.97; P=.386$	$F_{2,50}=0.96; P=.392$	
	Shell	$F_{1,50}=0.05; P=.820$	$F_{2,50}=0.04; P=.961$	$F_{2,50}=0.83; P=.476$	
	NTD	$F_{1,52}=5.13; P=.028^*$	$F_{2,50}=0.36; P=.699$	$F_{2,50}=4.30; P=.019^*$	
	NPB	$F_{1,52}=0.09; P=.769$	$F_{2,50}=0.99; P=.379$	$F_{2,50}=0.08; P=.926$	

**Taula 12 Resultats estadístics de l'anàlisi de l'activitat AChE a totes les àrees cerebrals analitzades.** Abreviatures: CRS, còrtex retrosplenial (g, granular; ag, agranular); CA1-CA2-CA3, cornu ammonis 1, 2 i 3; GD, gir dentat; CPF, còrtex prefrontal; IL, infralímbic; PL, prelímbic; BLA, amígdala basolateral; LA, amígdala lateral; CE, amígdala central; NAcc, nucli accumbens; NTD, nucli tegmental dorsal; NPB, nucli parabraquial. \* $P < .05$

### 2.3.9.1 Activitat d'AChE al nucli tegmental dorsal del tronc de l'encèfal

L'anàlisi dels nivells AChE al nucli tegmental dorsal van mostrar que el factor interacció TRACTAMENT x CONDICIÓN EXPERIMENTAL era significatiu [ $F_{2,47}=4.30, P=.019$ ]. Una anàlisi d'efectes simples va mostrar que els animals tractats amb AEIC presentaven menor activitat AChE que els seus controls no estimulats, però només a la condició sec [ $F_{1,49}=10.48, P=.002$ ] (Fig.50).



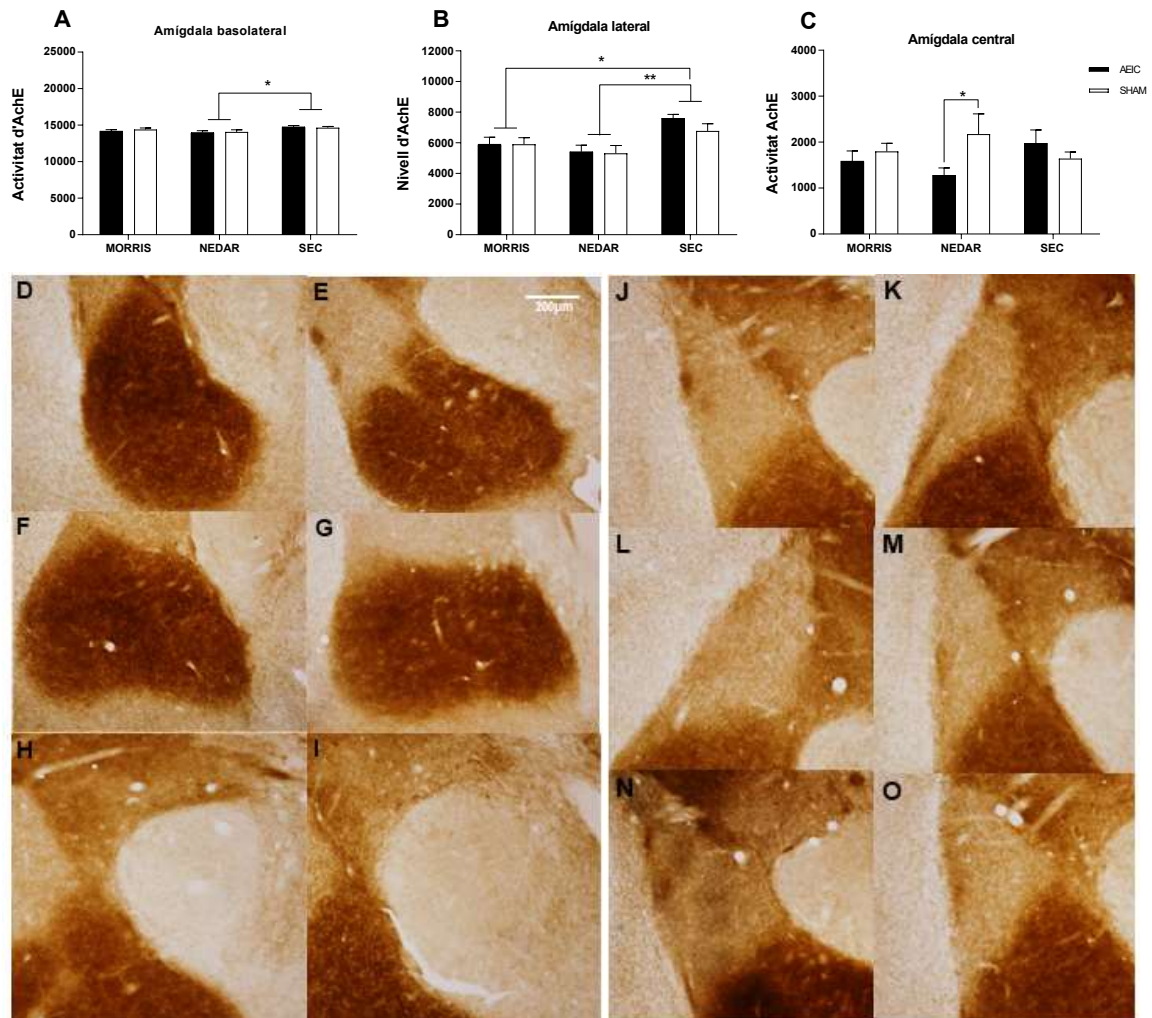
**Fig. 50 Efectes del tractament i la condició experimental en l'activitat de l'AChE al nucli tegmental dorsal del tron de l'encèfal.** A la condició experimental sec, els subjectes del grup que no van rebre AEIC presentaven major activitat AChE que els que en van rebre **\*\*P<0.01**.

### 2.3.9.2 Activitat d'AChE a l'amígdala

Concretament, a la BLA únicament el factor CONDICIÓN EXPERIMENTAL va ser significatiu [ $F_{2,48}=4.74$ ,  $P=.013$ ]; de forma que els subjectes de la condició sec van presentar una activitat significativament superior d'AChE que els sotmesos a la condició *nedar*, independentment del tractament [ $F_{1,51}=5.56$ ,  $P=.022$ ] (Fig.51A).

A la LA, també vam trobar que només el factor CONDICIÓN EXPERIMENTAL va resultar significatiu [ $F_{2,48}=4.74$ ,  $P=.013$ ]. L'anàlisi de contrastos va posar de manifest que els subjectes sotmesos a la condició experimental sec presentaven nivells d'AChE significativament superiors als dels subjectes sotmesos a les condicions *nedar* i *morris* [ $F_{1,51}=9.35$ ,  $P=.004$  i  $F_{1,51}=5.59$ ,  $P=.022$ , respectivament] (Fig.51B).

A la CeA, malgrat que cap dels factors principals va resultar ser significatiu TRACTAMENT i CONDICIÓN EXPERIMENTAL [ $F_{1,51}=1,24$ ,  $P=.271$  i  $F_{2,48}=0.09$ ,  $P=.917$ , respectivament] i interacció TRACTAMENT x CONDICIÓN EXPERIMENTAL [ $F_{2,48}=1.92$ ,  $P=.158$ ]; a la condició experimental *nedar*, els animals que van rebre AEIC presentaven menor activitat AChE que els no estimulats [ $F_{1,50}=4.75$ ,  $P=.034$ ] (Fig.51C).



**Fig. 51 Efectes del tractament d'AEIC i de la condició experimental en l'activitat d'AChE a l'amígdala.** (A) activitat AChE a la BLA, (B) activitat AChE a la LA i (C) activitat AChE a la CeA, en els animals dels grups de tractament (AEIC i SHAM) en les diferents condicions experimentals (*morris*, *nedar* i *sec*). \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$ . Les microfotografies representatives de cada nucli de l'amígdala es mostren a sota i corresponen a la BLA dels grups (D) AEICn, (E) SHAMn, (F) AEICs, (G) SHAMs; a la CeA dels grups (H) AEICn, (I) SHAMn; a la LA dels grups (J) AEICm, (K) SHAMm, (L) AEICn, (M) SHAMn, (N) AEICs i (O) SHAMs.

## 2.4 Discussió

Els resultats d'aquest estudi van confirmar que l'AEIC aplicada post-entrenament tenia una certa capacitat per a facilitar l'aprenentatge espacial relacional. Però en les presents condicions de molt poc entrenament diari, l'efecte només es va produir a la fase inicial de l'adquisició (setmana 1) i no es va observar durant la segona setmana d'entrenament ni al test de retenció a les 72h. L'AEIC semblava capaç d'accelerar l'adquisició de l'aprenentatge però no de mantenir un efecte de facilitació al llarg del temps. Altres estudis han posat també de manifest un efecte merament accelerador de l'AEIC sobre l'aprenentatge, tant de caràcter implícit [5] com espacial al LAM [7] però en el cas contrari al present, és a dir, en condicions espacials d'un elevat entrenament.

En el present estudi, l'AEIC no es va mostrar efectiva per facilitar la consolidació d'una memòria explícita, a diferència del que s'havia vist amb anterioritat en procediments amb poc entrenament [6]. No obstant, el disseny de l'estudi de Ruiz-Medina i col·laboradors [6] presentava diferències remarcables que podrien explicar els resultats: a) cada sessió diària constava d'un únic assaig de 120s de durada, mentre que en el present treball es limitava a 90s i b) l'experiment que va mostrar evidents efectes facilitadors a la retenció constava només de 5 sessions d'adquisició. A partir d'aquesta comparació, podem pensar que hem aplicat les condicions experimentals mínimes necessàries per iniciar un procés d'aprenentatge. Per exemple, en l'estudi de Ruiz-Medina on la sessió d'entrenament constava d'un únic assaig de 120s [9] l'AEIC va mostrar un efecte positiu sobre la retenció de l'aprenentatge, però amb un assaig de 60s aquest efecte ja no apareixia probablement perquè els animals no van ser capaços d'aprendre [29]. Donat que la majoria de subjectes van presentar latències relativament elevades, podem suggerir que el procediment d'entrenament utilitzat va resultar ser d'alta dificultat. Per altra banda, els resultats del present estudi van ser consistents amb els de Ruiz-Medina observant-se també l'efecte facilitador als assaigs 3, 4 i 5.

El fet que vam augmentar la durada del procés experimental a 10 sessions podria haver fet que altres factors no controlats haguessin interferit en l'aprenentatge, no observant-se en les 5 últimes sessions els efectes inicials de l'AEIC vistos a les 5 primeres. Una explicació plausible de la limitació temporal de l'efecte del tractament podria trobar-se en l'augment de l'*arousal*. En l'estudi anterior (Experiment V), on s'aplicaven 2000 trens d'AEIC 3 vegades al dia durant 5 dies consecutius, vam trobar un efecte d'augment d'ansietat probablement degut a un *arousal* elevat i sostingut al llarg del temps. És probable que un nivell d'ansietat anormalment alt provocat per la dificultat de la tasca, junt amb els efectes d'*arousal* produïts per 2500 trens d'AEIC post-entrenament haguessin contribuït a la manca d'efectes evidents a la segona setmana i el test de retenció. No obstant, els efectes d'activació neuronal observats a l'hipocamp per expressió de c-Fos o els nivells d'AChE no van mostrar diferències entre els grups de la condició experimental *sec*, és a dir, degut exclusivament al tractament d'AEIC. Aquestes dades van indicar que el tractament per sí sol no incrementava l'activació neuronal ni l'activitat colinèrgica en aquestes regions de manera significativa respecte dels animals que no havien rebut tractament. De fet, l'AEIC només va afectar l'activitat d'AChE en regions colinèrgiques del tronc de l'encèfal. Per altra banda, el fet que entre les 5 primeres i les 5 últimes sessions d'adquisició hi va haver un interval de 72h i una manca de consolidació de la memòria de l'aprenentatge previ podrien haver agreujat encara més la dificultat de la tasca, impeding mostrant una millora significativa en un alt percentatge de subjectes durant les sessions d'adquisició de la segona setmana.

La dificultat que van mostrar els animals per adquirir l'aprenentatge i la manca de diferències entre els grups al llarg de les 10 sessions de l'experiment es podrien explicar en les bases moleculars de l'efecte de l'AEIC. Una de les principals hipòtesis dels mecanismes pels quals l'AEIC post-entrenament facilitaria els processos d'aprenentatge i memòria és la seva capacitat per a mantenir actius els mecanismes de plasticitat iniciats durant l'aprenentatge, promovent-ne l'estabilització i l'enfortiment [11, 35, 178, 185]. En el present experiment va semblar que les condicions no havien estat favorables perquè es desenvolupés un aprenentatge suficient per consolidar la memòria. Quan l'experiència no permet activar amb prou intensitat les sinapsis hipocampals implicades en l'aprenentatge, l'AEIC no disposaria d'un substrat neural sobre el qual activar processos de potenciació a llarg termini i afavorir la consolidació de la memòria. En aquest cas, un únic assaig diari de 90s hauria pogut no ser suficient per a què es produís l'aprenentatge espacial, de manera que no es proporcionaria un context neural prou estable per a poder observar els efectes beneficiosos de l'AEIC durant el període crític de la consolidació.

Una altra causa que pot haver influït en els resultats obtinguts és el fet que la tasca al LAM i l'AEIC, que es va administrar de forma contingent, tenien una valència emocional oposada. Mentre l'aprenentatge al LAM és un tasca ansiogènica, considerada com un estímul aversiu que produeix una resposta operant de fugida, l'AEIC es considera un estímul apetitiu reforçant d'alta intensitat que provoca l'activació directa del SNR. De fet, les condicions *morris* i *nedar* presentaven nivells inferiors d'AChE —podent indicar una major activitat colinèrgica— a l'amígdala. Els animals van realitzar un únic assaig, cosa que, a diferència d'altres estudis en els que es donava un major nombre d'assaigs per sessió, hauria pogut afavorir la contingència temporal entre la tasca espacial i el tractament d'AEIC i, per tant, també l'associació entre dos estímuls oposats. La resposta dels animals a l'exposició al LAM podria quedar condicionada a l'expectativa del reforç, de manera que es produiria una conducta passiva esperant acabar l'assaig perquè l'experimentador els tragués de la piscina (estímul aversiu) i poguessin iniciar el tractament (estímul apetitiu). Des d'aquest punt de vista, podem pensar que els canvis observats entre la primera i la segona setmana podrien ser deguts, no a l'extinció d'allò après ni a una manca d'efectes de l'AEIC, sinó a un nou aprenentatge incompatible amb l'aprenentatge previ de localització de la plataforma. Si fos així, s'hauria vist afavorit l'aprenentatge més adaptatiu ja sigui perquè la demanda cognitiva era menor o perquè permetia dirigir la conducta cap a contingències més rellevants.

Per tal d'aclarir el canvi inesperat en l'evolució de les latències durant la segona setmana d'entrenament, vam analitzar qualitativament les trajectòries de natació realitzades pels animals dels grups d'aprenentatge al LAM (AEICm i SHAMm). Els resultats ens van

indicar que els animals capaços de trobar la plataforma triaven dos tipus d'estratègia de cerca diferents, a) una estratègia espacial, guiant-se per tots els senyals de l'entorn de la piscina i b) una estratègia associativa guiant-se per un o dos dels estímuls més salients de l'entorn. Un nombre major de subjectes van decantar-se per una estratègia associativa respecte d'aquells que aplicaven una estratègia espacial relacional. Aquest fet podria indicar que l'alta dificultat del procediment hauria fet que la majoria dels animals desenvolupessin una estratègia alternativa per trobar la plataforma, diferent de l'esperada per aquesta tasca de memòria al LAM. Això hauria pogut dificultar l'execució al laberint sobretot per aquells animals que haurien aplicat una estratègia espacial relacional. És a dir, l'observació de diversos objectes en l'espai i la ubicació d'aquests respecte de la plataforma hauria resultat l'opció més difícil, amb la dificultat afegida de la durada dels assaigs (90s), en comparació amb l'estratègia associativa que només implicava l'observació d'un o dos senyals contextuals. Donat que l'AEIC no va semblar influir en la tria de l'estratègia més adequada, probablement per això no va facilitar l'aprenentatge al llarg de totes les sessions d'adquisició i la memòria al test de retenció. L'estratègia associativa triada majoritàriament necessita més assaigs per consolidar-se a diferència de l'espacial relacional que és més flexible i s'adquireix en pocs assaigs.

Els resultats obtinguts a l'estudi d'expressió de c-Fos van indicar que tant l'aprenentatge al LAM com l'activitat física de nedar al laberint podien promoure l'activació al GD com ja s'havia vist en estudis previs [373–377], especialment a la capa subgranular. En canvi, a la capa granular no vam trobar diferències entre els animals AEIC i els seus controls; aquest resultat concorda amb el fet que s'observi una dessensibilització de l'expressió de c-Fos quan el tractament d'AEIC és de llarga durada [378]. Per altra banda, el fet que el tractament no hagi incrementat el nivell d'expressió de c-Fos reflectiria els resultats conductuals, malgrat les diferències entre grups observades per la primera setmana, al final de l'experiment i al test de retenció vam trobar que tots els animals sotmesos a la tasca d'aprenentatge van aprendre per igual. Per tant, no podíem esperar diferències en l'expressió de c-Fos degudes a l'entrenament. Malgrat semblar contradictori, el fet que els animals sotmesos a aprenentatge presentessin significativament major activació a la capa subgranular del GD que els que només nedaven al laberint o no feien res, s'explicaria pel fet que les neurones que es trobaven ubicades a la capa subgranular eren joves i possiblement més sensibles a ser activades quan els subjectes es veien exposats a una activitat d'aprenentatge o simplement a l'activitat física de nedar.

L'estudi immunohistoquímic de BrdU va mostrar que l'AEIC incrementava la NG al GD, però, a diferència de l'estudi de Takahashi i col·laboradors [34] en que el tractament



d'AEIC era suficient per augmentar la NG, en el nostre cas els efectes es van observar quan els animals tractats amb AEIC van ser també sotmesos a una situació d'aprenentatge o de nedar al laberint. Una possible explicació podria venir de les diferències entre els protocols dels dos estudis. Per una banda, en l'estudi de Takahashi van administrar una única injecció de BrdU de 150mg/kg mentre que en el nostre cas en vam injectar cinc, una de 10mg/kg el primer dia i quatre de 5 mg/kg els 4 dies següents. Per altra banda, en l'estudi de Takahashi els animals van ser injectats després d'haver fet el tractament amb AEIC i les mostres es van recollir passats 1 dia, 1 setmana i 1 mes després de l'administració de BrdU, en canvi, en el nostre treball vam iniciar l'administració de BrdU 3 setmanes abans de començar el tractament i vam recollir les mostres 43 dies després.

Donat que el temps transcorregut des que es va finalitzar l'administració de BrdU fins que vam obtenir les mostres és superior a 30 dies, podem considerar que les cèl·lules observades marcades amb BrdU són les que han sobreviscut. En suport a aquesta hipòtesi, un estudi de NG en rates va demostrar que el nombre de neurones noves al GD de l'HPC augmentava entre 2 hores i 1 setmana després d'una única injecció i disminuïa ràpidament passades 2 setmanes de la injecció [379]. Altres estudis en rates i ratolins han trobat que algunes de les neurones noves poden sobreviure més de 4 setmanes al GD si s'administren varies injeccions de BrdU consecutives [371, 372]. Per tant, no podem descartar que l'AEIC hagi pogut generar una major proliferació no observada en les anàlisis immunohistoquímiques realitzades. A partir dels resultats obtinguts, creiem que la proliferació cel·lular potenciada per l'AEIC no es va mantenir si aquestes cèl·lules no eren funcionals. És a dir, només hi hauria hagut supervivència de la NG en els subjectes sotmesos a aprenentatge si les neurones que van proliferar es van integrar a una xarxa neural, la resta haurien desaparegut al llarg del procés experimental. Una dada interessant a destacar és que vam observar major nombre de colocalitzacions en aquells animals que van rebre tractament i que van ser sotmesos a aprenentatge al LAM. Això reforçaria la hipòtesi que l'AEIC només és capaç de facilitar la supervivència cel·lular quan els animals són sotmesos a una activitat d'aprenentatge en què les noves neurones s'activen pel fet d'haver-se integrat a una xarxa neuronal i ser funcionals.

Malgrat aquests resultats, els efectes de l'AEIC sobre la NG no van ser suficients per facilitar l'aprenentatge al llarg del procés experimental i consolidar-lo com a memòria explícita. Els nostres resultats concorden amb els de Kempermann i Gage [31] que no van trobar correlació entre els nivells de NG a l'HPC i la retenció d'una tasca de memòria al LAM, però sí amb l'adquisició d'aquesta mateixa tasca. Un altre estudi en el qual van analitzar els efectes de l'estimulació elèctrica del fòrnix per facilitar la memòria va trobar

que, malgrat la millora en la memòria dels animals estimulats, els nivells de NG eren iguals als del grup SHAM [29], plantejant la possibilitat d'altres mecanismes diferents de la NG implicats en aquests processos de facilitació de la memòria.

Una altra explicació a la manca de concordança entre els resultats conductuals i els moleculars és que la proliferació i supervivència neuronal observada al GD haguessin contribuït a una flexibilitat en l'aprenentatge relacional [380], fent que els animals adoptessin una actitud passiva a l'espera d'un reforçador de major valor o bé aplicant una estratègia alternativa més eficient per tal de trobar la plataforma, però no adequada per retenir l'aprenentatge. Així doncs, l'AEIC, en funció de les característiques del procediment experimental, podria haver facilitat l'adquisició d'un aprenentatge diferent a l'esperat inicialment.



### 3. EXPERIMENT VII

#### 3.1 Introducció

La DBS és una forma d'aplicació de l'estimulació elèctrica del cervell que es fa de manera passiva, a diferència de l'AEIC que és el propi individu qui se l'administra. La DBS de regions cerebrals del sistema del reforç ha estat menys usada en recerca experimental. Les línies d'estudi s'orienten a la creació de models animals de diferents patologies, sobretot de trastorns depressius [315, 316] i d'ansietat [381] per estudiar-ne els possibles mecanismes implicats en el seu efecte terapèutic. A la clínica d'humans, l'estimulació del SNR o de regions relacionades s'ha utilitzat, sobretot, pel tractament de trastorns emocionals com la depressió [18] i s'ha mostrat efectiva per millorar els símptomes d'ansietat i depressió associats al TOC [219]. Tenint en compte que la DBS a la clínica d'humans s'ha usat per millorar l'aprenentatge i la memòria en pacients amb malaltia d'Alzheimer [22] i que l'AEIC de FPM s'ha mostrat efectiva per facilitar aquests processos en animals de laboratori [5, 7, 9, 11, 27], ens vam plantejar estudiar la rellevància de la forma d'administració del tractament. Els antecedents experimentals que comparen aquests dos tipus d'administració són escassos [36, 152]. Per tant, vam voler veure si el fet que el tractament fos autoadministrat (AEIC) o administrat remotament (DBS) tindria el mateix efecte sobre la memòria comparant aquests dos tipus d'administració, tant a nivell funcional sobre la memòria com a nivell d'activació cerebral. Els objectius específics que ens vam plantejar van ser comparar els efectes de l'AEIC amb la DBS del FPM sobre 1) l'adquisició i la retenció de l'aprenentatge espacial al LAM i 2) l'expressió de c-Fos en diferents àrees cerebrals implicades en els sistemes a) motors, b) de l'aprenentatge i la memòria, c) del reforç i d) de l'*arousal*.

#### 3.2 Material i procediment

##### 3.2.1 Subjectes

En aquest experiment vam utilitzar un total de 21 rates (*Rattus Norvegicus*) albines mascles de la soca Wistar, de 113 dies d'edat (DE=4.00) i un pes mitjà de 389.57g (DE=7.00) a l'inici de l'experiment. Tot allò referent a ètica i benestar animal, tipus, procedència, alimentació i manipulació dels animals, procediments quirúrgics i coordenades d'implantació dels elèctrodes es va realitzar de manera idèntica als Experiments V i VI.

### 3.2.2 Aparells

L'estimulador utilitzat per administrar el tractament d'AEIC o de DBS, així com les característiques del corrent estimulant van ser idèntiques a les dels Experiments V i VI (veure l'apartat *a* del punt 1.2.3 de l'Experiment V). El rang d'intensitats d'estimulació es trobava entre 40 i 250 $\mu$ A. Tots els paràmetres del corrent estimulant excepte la intensitat es van mantenir fixos al llarg de l'experiment.

Les fases d'adquisició i test de retenció es van realitzar en un LAM idèntic al dels Experiments V i VI (veure l'apartat *b* del punt 1.2.3 de l'Experiment V).

### 3.2.3 Conducta d'AEIC

#### a) Assignació a grups experimentals

Els animals es van distribuir aleatòriament en tres grups experimentals segons el tractament que se'ls hauria d'administrar. Aquells que havien de rebre el tractament autoadministrat pertanyien al grup AEIC (n=6), els que havien de rebre el tractament administrat remotament —per l'experimentador— pertanyien al grup DBS (n=5) i els que no havien de rebre cap tipus de tractament pertanyien al grup SHAM (n=5).

#### b) Modelament de la conducta d'AEIC i CIO

Aquestes dues fases es van realitzar de manera idèntica als experiments anteriors tant pels subjectes d'AEIC com DBS (veure punt 2.2.5 de l'Experiment I). El fet de sotmetre els subjectes de DBS a modelament de la conducta d'AEIC i CIO va garantir, per una banda, que l'animal tenia l'elèctrode ben implantat al FPM i per altra banda ens va permetre saber quina era la intensitat òptima de DBS, que és la que es va utilitzar per l'administració remota per part de l'experimentador de l'AEIC post-entrenament.

#### c) Tractament amb AEIC i DBS

Un cop determinada la IO de cada subjecte, el procediment del tractament es va realitzar de la següent manera: 1) els subjectes del grup AEIC premien la palanca fins a rebre 2500 trens de corrent estimulant (a la IO de cada animal determinada a la sessió de CIO), 2) els subjectes del grup DBS rebien el tractament administrat remotament per l'experimentador (també a la IO de cada animal determinada a la sessió de CIO). L'experimentador premia un botó fins a administrar a l'animal 2500 trens de corrent estimulant a una freqüència que simulava l'estimulació autoadministrada i 3) els subjectes del grup SHAM van ser introduïts individualment en una gàbia de *Skinner* durant 45 minuts (durada mitjana d'un tractament d'AEIC), sense rebre cap tipus

d'estimulació. Immediatament després del test de retenció, els animals van rebre una sessió de tractament idèntica a les administrades post-entrenament.

### **3.2.4 Procediment de la tasca de memòria espacial**

#### **a) Adquisició de l'aprenentatge**

Tres dies després de les sessions de modelament i CIO, totes les rates van ser entrenades per realitzar la tasca espacial al LAM. L'adquisició d'aquesta tasca va consistir en 5 sessions d'entrenament diàries de 6 assaigs cadascuna. Cada sessió es va iniciar des d'una de quatre posicions possibles (N, E, S, O) seguint un programa pseudoaleatori i cada assaig va consistir en un trajecte de natació des de l'extrem de la piscina fins a la plataforma. Quan la rata no trobava la plataforma en els 90s que durava l'assaig, la guiàvem manualment perquè hi pugés. Passats 15s retiràvem la rata de la piscina. Quan trobava la plataforma per si mateixa igualment la hi deixàvem durant 15s per tal de facilitar l'aprenentatge de la localització de la plataforma.

#### **b) Test de retenció**

Aquest assaig es va realitzar de manera idèntica al realitzat als Experiments V i VI (veure l'apartat c del punt 1.2.6 de l'Experiment V).

### **3.2.5 Estudi immunohistoquímic**

#### **3.2.5.1 Recollida de mostres**

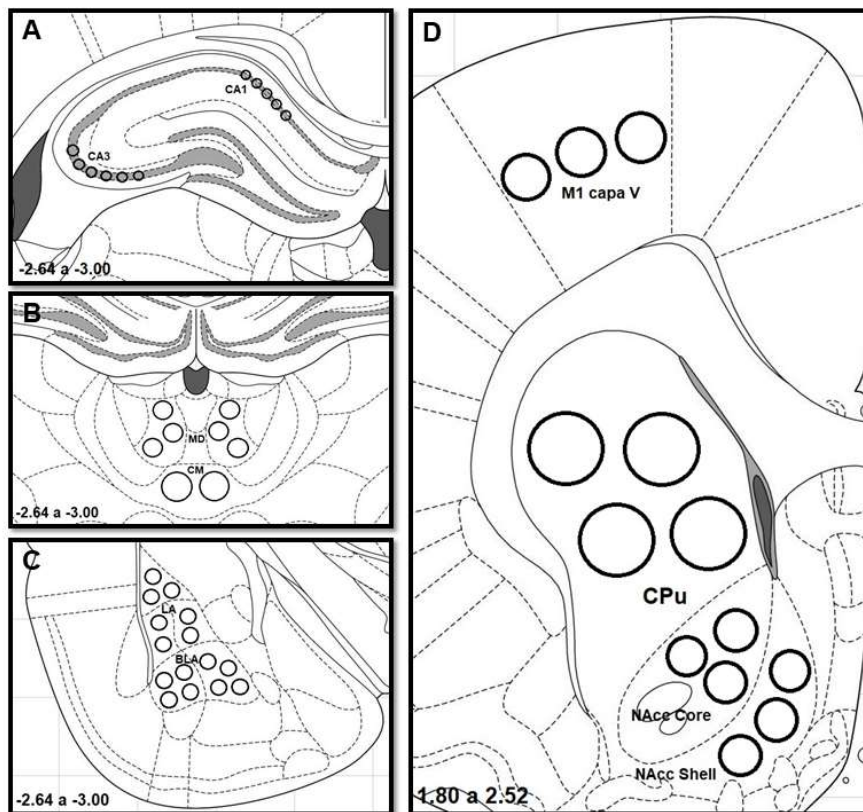
Noranta minuts després del test de retenció es van sacrificar els animals. Tot el procediment de sacrifici i recollida de mostres es va realitzar de manera idèntica a com es descriu a l'experiment anterior (veure el punt 2.2.6.1 de l'Experiment VI). Es van recollir talls coronals del cervell de 30µm de gruix corresponents a les coordenades anteroposteriors de les regions a estudiar (Fig.51).

#### **3.2.5.2 Tinció immunohistoquímica**

El procediment de tinció immunohistoquímica per marcatge de c-Fos es va dur a terme en seccions coronals en suspensió (*free-floating*), seguint el protocol detallat a l'Annex 5. Durant aquest procés, es van obtenir aleatòriament mostres per control negatiu del procediment immunohistoquímic sense afegir els anticossos. Una vegada finalitzat el procediment, es van muntar les seccions en portaobjectes amb un medi PERTEX i es van guardar a 4°C aïllant-les de qualsevol font de llum.

### 3.2.5.3 Presa d'imatges i anàlisi

Les imatges de les diferents regions analitzades van ser obtingudes amb un microscopi Olympus BX-41 acoblat a una càmera digital Olympus DP-70 (Japó). El comptatge de c-Fos es va realitzar amb el programa Image-J 1.45s. Es va dissenyar una macro per calibrar les imatges (correspondència píxel/mm) i millorar la nitidesa, seguint un procés de *smoothing* per a destacar els nuclis c-Fos positius. Per cada àrea a estudiar es va establir una o diverses regions d'interès (ROI, de l'anglès *Region Of Interest*) on realitzar la quantificació (veure figura 52A – 52D). Es va fer un recompte de la mitjana de tres seccions histològiques per cada àrea. Les coordenades de cada àrea es van homogeneïtzar per cada grup per tal de reduir la variabilitat entre les mostres (AP: HPC-Amígdala-Nuclis del tàlem, -2.64mm a -3.00mm; CM1-NAcc-CPu, 1.80 a 2.52). També es van establir, per a cada àrea, uns paràmetres per les variables *mida de les partícules*, *intensitat* i *esfericitat*, que es van mantenir fixes per tots els subjectes i mostres. L'expressió de c-Fos va ser registrada com a nombre de cèl·lules immunopositives/mm<sup>2</sup>.



**Fig. 52 Regions d'interès (ROI) per la quantificació dels nuclis c-Fos immunopositius a les àrees (A) HPC (CA1 i CA3). (B) MD i CM. (C) BLA i LA. (D) CM1 (capa V), CPu, NAcc Core i NAcc Shell.** Les regions d'interès estan superposades en seccions coronals d'imatges adaptades de l'atles Paxinos i Watson (2007). Abreviatures: HPC, hipocamp, CA1-CA3, cornu ammonis 1 i 3; MD, nucli mediodorsal; CM, nucli centromedial; BLA, amígdala basolateral; LA, amígdala lateral; CM1, còrtex motor primari; CPu, caudat-putamen; NAcc, nucli accumbens.

### 3.2.6 Anàlisi estadística

Les anàlisis principals de la tasca de memòria al LAM es van dur a terme considerant la variable independent *tractament* com a qualitativa amb tres categories (AEIC, DBS i SHAM) i les variables dependents com a quantitatives. Es va utilitzar una ANOVA mixta per analitzar les dades de l'estudi de l'expressió de c-Fos, aplicant un disseny factorial 3x2 (GRUP x HEMISFERI) incloent 3 grups: AEIC, DBS i SHAM i els hemisferis *ipsilateral* i *contralateral*, segons la localització de l'elèctrode (que es troba ubicat a l'hemisferi dret). Per l'aprenentatge al LAM les variables dependents analitzades van ser 1) *latència* i 2) *temps en parets*. Les comparacions entre grups de les sessions d'adquisició es van fer usant anàlisis multivariants de la variància (MLG de mesures repetides). També vam realitzar una anàlisi de contrast polinomial per explorar si hi havia una tendència lineal o quadràtica al llarg de les sessions d'entrenament. Pel test de retenció, es van realitzar proves *t-test* de mostres independents per comparar l'execució dels subjectes d'ambdós grups en relació al percentatge de *temps al quadrant target*, tant per la sessió global (TQ60) com per la primera meitat del test (TQ30), nombre de *creuaments del target*, *velocitat*, *error de Whishaw* i percentatge de *temps a l'annulus del target*. També es va analitzar la variable de control *temps en parets* per la primera meitat (TP30) i pel global del test de retenció (TP60). El nivell de significació per tots els tests es va establir en  $\alpha=0.05$  i tot el processament de dades es va realitzar mitjançant el paquet estadístic SPSS v23 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA).

## 3.3 Resultats

### 3.3.1 Subjectes

La mostra inicial va constar de 21 subjectes i un total de 5 van ser exclosos de l'experiment. En concret, 2 subjectes van presentar una conducta anormal a la primera sessió d'adquisició, 1 subjecte va ser exclòs per manca de dades de l'estudi de conducta i 2 més els vam descartar per ser *outliers*. Per l'anàlisi conductual i d'expressió de c-Fos, la mostra va estar formada per 16 subjectes (AEIC: n=6; DBS: n=5; SHAM: n=5). Es va dur a terme un control regular del pes dels subjectes com a indicador de canvis de salut que podrien haver afectat l'aprenentatge. L'anàlisi de la variància va mostrar que els subjectes partien de pesos similars a l'inici i no es van trobar diferències entre grups en l'evolució del pes al llarg de l'experiment.

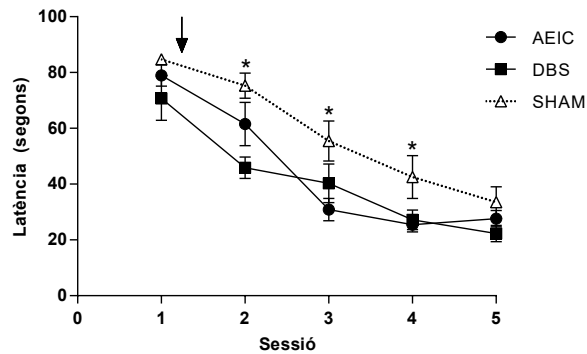
### 3.3.2 Sessions d'adquisició

L'anàlisi de la sessió 1 va mostrar diferències entre grups en la variable *temps en parets* [ $F_{2,15}=4.191$ ,  $P=.039$ ], els subjectes del grup DBS van presentar menor tigmotaxi que els



SHAM ( $P=.032$ ). En aquest primer assaig, quan els animals encara no havien rebut tractament, la tigmotaxi es podia considerar com una mesura d'ansietat. Per aquest motiu vam introduir la variable *temps en parets* (mesura de tigmotaxi) com a covariable en l'anàlisi de l'efecte dels tractaments a la fase d'adquisició. Aquesta covariable no va resultar ser significativa [ $F_{4,48}=0.731$ ,  $P=.534$ ], però va permetre homogeneïtzar els grups en la sessió d'adquisició.

Els resultats van indicar que l'efecte del factor GRUP era significatiu [ $F_{2,13}=9.695$ ,  $P=.003$ ], independentment de la SESSIÓ [ $F_{8,52}=1.445$ ,  $P=.200$ ]. Per altra banda, el factor SESSIÓ també va resultar ser significatiu [ $F_{4,52}=55.080$ ,  $P<.001$ ]. L'estudi de l'evolució de l'aprenentatge va evidenciar que els grups mostraven una disminució significativa de les latències al llarg de les sessions, tal com es mostra a la figura 53. Segons l'estudi polinomial, les latències es van ajustar a una funció lineal [ $F_{1,13}=271.324$ ,  $P<.001$ ] però també a una equació quadràtica [ $F_{1,13}=8.392$ ,  $P=.012$ ].



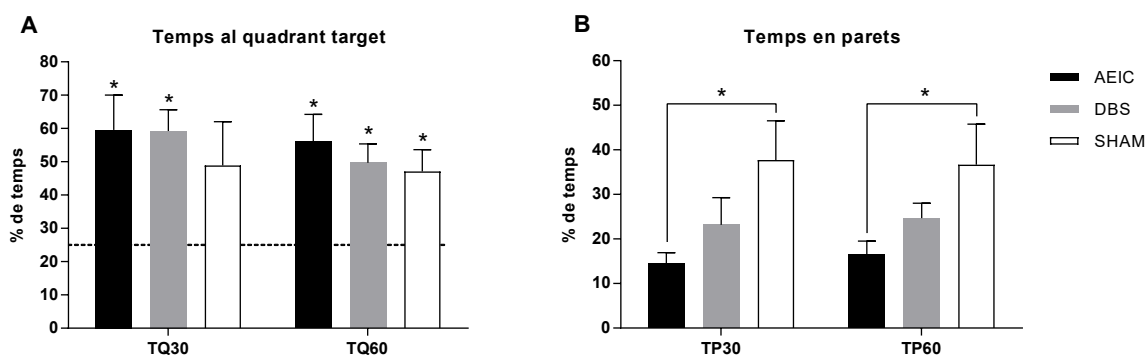
**Fig. 53 Efectes facilitadors de l'AEIC al llarg de les sessions d'adquisició.** Resultats de les mitjanes de la *latència* ( $\pm$ SE) introduint la variable *temps en parets* de la sessió 1 com a covariable. La fletxa indica el moment d'administració de la primera sessió de tractament als grups AEIC i DBS. \* $P<.05$ .

L'anàlisi d'efectes simples dels efectes del tractament dins de cada sessió d'adquisició va posar de manifest que a la sessió 1 no hi havia diferències significatives entre els grups [ $F_{2,13}=1.830$ ,  $P=.199$ ] i, per tant, es pot considerar que els 3 grups van partir del mateix nivell d'aprenentatge. Les sessions 2, 3 i 4 sí que van mostrar diferències entre-grups [ $F_{2,13}=5.625$ ,  $P=.017$ ;  $F_{2,13}=4.385$ ,  $P=.035$  i  $F_{2,13}=3.657$ ,  $P=.055$ ; respectivament) pel que fa al nivell d'aprenentatge. L'anàlisi de contrastos *post hoc* (Tukey) va indicar que a la sessió 2 hi havia diferències significatives entre els grups DBS i SHAM ( $P=.013$ ), on el grup DBS presentava latències menors que SHAM. A la sessió 3 hi havia diferències significatives entre AEIC i SHAM ( $P=.028$ ), on el grup AEIC presentava latències menors que SHAM. A la sessió 4 vam trobar una tendència a la significació entre AEIC i SHAM ( $P=.062$ ), el grup AEIC tendia a fer latències menors que SHAM. Finalment, a l'última sessió vam observar de nou absència de diferències significatives entre els diferents grups de tractament, que es van tornar a igualar en el nivell

d'aprenentatge. En general, tant el grup DBS com AEIC van fer latències significativament inferiors respecte el SHAM, indicant que ambdós tractaments facilitaven l'aprenentatge.

### 3.3.3 Test de retenció

Es va realitzar una prova *t-test* per a una mostra per tal de conèixer el grau de retenció de cada grup. Vam comparar el temps que els animals estaven al quadrant de la piscina on hi havia la plataforma durant les sessions d'adquisició (*temps al quadrant target*) amb el percentatge teòric de temps que els animals hi haurien nedat si no haguessin recordat la localització de la plataforma, és a dir, el percentatge degut a l'atzar (25%). Aquesta prova es va realitzar per la primera meitat del test de retenció i per la sessió global. L'anàlisi de la sessió global va indicar que el grup SHAM va estar més temps al quadrant *target* del que s'esperaria per atzar [ $t_4=3.391$ ,  $P=.027$ ], però no era així si analitzàvem la primera meitat del test [ $t_4=1.824$ ,  $P=.142$ ]. En canvi, el grup DBS es va mantenir al quadrant *target* més temps de l'esperat per atzar tant a la primera meitat [ $t_4=5.367$ ,  $P=.006$ ], com al global del test de retenció [ $t_4=4.372$ ,  $P=.012$ ]. Respecte al grup AEIC, es van observar resultats similars als del grup DBS, per la primera meitat [ $t_5=3.306$ ,  $P=.021$ ] i pel global del test [ $t_5=3.785$ ,  $P=.013$ ], tal com es mostra a la figura 54A.



**Fig. 54 Efectes dels tractaments d'AEIC i DBS al test de retenció.** (A) es mostra el percentatge de temps que els animals nedaven al quadrant *target*. La línia discontinua indica el temps que els animals haurien estat al quadrant si no haguessin fet cap sessió d'aprenentatge, nivell d'atzar (25%). Els asteriscs mostren que hi havia diferències significatives entre el resultat obtingut per cada grup i l'atzar. (B) Mitjanes de tigmotaxi al test de retenció. Els resultats es van analitzar pel global del test (TP60) i per la primera meitat (TP30). \* $P < .05$

L'anàlisi ANOVA no va mostrar diferències entre grups en el *temps al quadrant target* ni per la primera meitat del test (TQ30) [ $F_{2,13}=0.327$ ,  $P=.727$ ], ni pel global (TQ60) [ $F_{2,13}=0.433$ ,  $P=.657$ ].

Per la variable *temps en parets* (TP30) es van trobar diferències significatives entre grups [ $F_{2,13}=3.933$ ,  $P=.046$ ] i una tendència a la significació per la variable *temps en parets* (TP60) [ $F_{2,13}=3.365$ ,  $P=.066$ ]. L'anàlisi de contrastos (Tukey) va mostrar

diferències significatives entre els grups AEIC i SHAM en TP30 ( $P=.038$ ) i una tendència a la significació entre els grups AEIC i SHAM en TP60 ( $P=.055$ ). Observant les mitjanes dels tres grups vam trobar que els grups que havien rebut tractament (AEIC i DBS) passaven menor temps nedant a prop de les parets de la piscina tal com es pot veure a la Figura 54B, essent significativa la diferència entre els grups AEIC i SHAM.

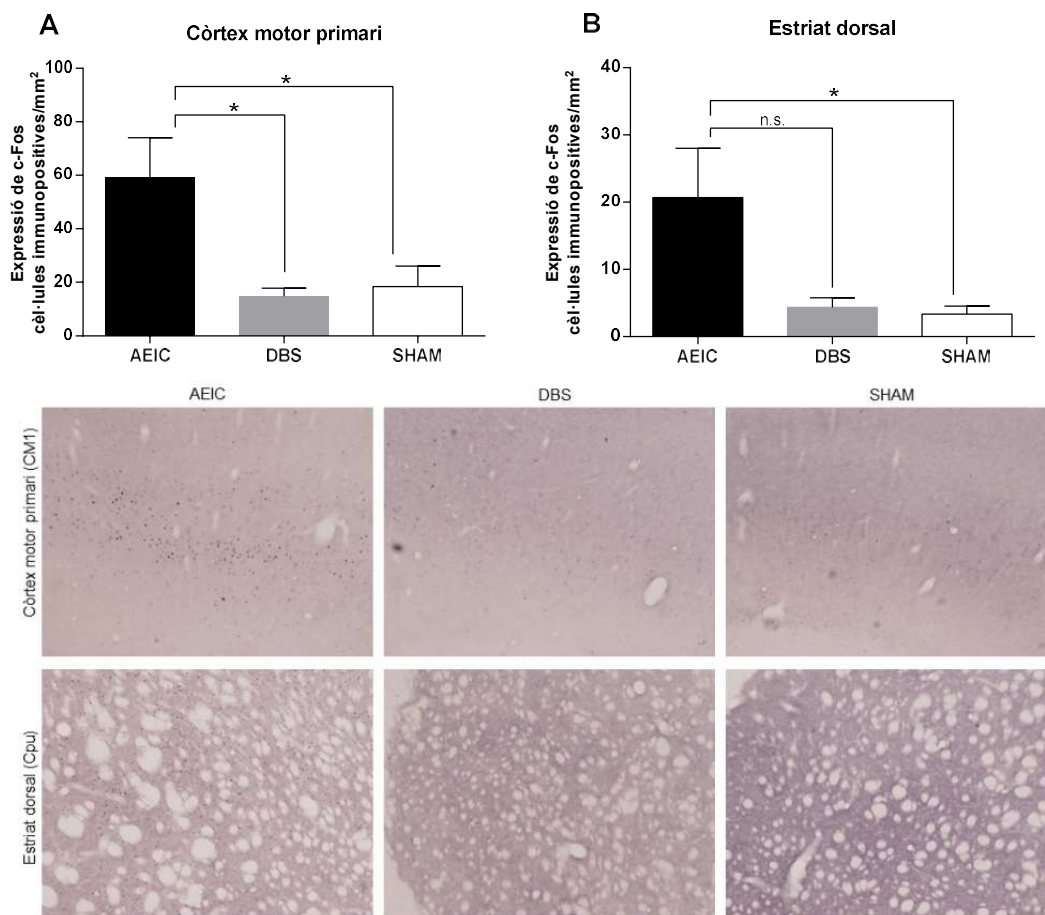
### **3.3.4 Expressió de c-Fos: àrees relacionades amb la conducta motora**

#### **3.3.4.1 Còrtex motor primari (CM1)**

L'anàlisi de la variància no va mostrar diferències significatives en el factor HEMISFERI [ $F_{1,12}=1.533$ ,  $P=.239$ ]. Aquesta dada ens va permetre completar les dades d'un hemisferi amb la informació de l'altre per 2 subjectes dels quals només disposàvem de mostra d'un hemisferi. Vam trobar un efecte significatiu del factor GRUP [ $F_{2,12}=6.309$ ,  $P=.013$ ] que indicava que hi havia diferències entre els grups de tractament. L'estudi de contrastos ens va indicar que el grup AEIC presentava major expressió de c-Fos que els altres dos grups, SHAM ( $P=.012$ ) i DBS ( $P=.008$ ); i que els grups SHAM i DBS presentaven nivells similars d'expressió de c-Fos ( $P=.799$ ). Aquestes diferències es poden observar a la figura 55A.

#### **3.3.4.2 Estriat dorsal (CPu)**

L'estudi realitzat a l'estriat dorsal no va mostrar diferències significatives pel factor HEMISFERI [ $F_{1,13}=1.268$ ,  $P=.314$ ] ni per la interacció GRUP x HEMISFERI [ $F_{1,13}=3.134$ ,  $P=.077$ ]. En canvi, el factor GRUP va resultar significatiu [ $F_{2,13}=4.102$ ,  $P=.042$ ] i l'anàlisi de contrastos va mostrar una tendència a la significació en la comparació entre els grups AEIC i SHAM ( $P=.063$ ). L'estriat dorsal juga un paper important en les conductes operants, per tant, la hipòtesi de treball va ser que el grup AEIC hauria de mostrar major expressió de c-Fos ja que era l'únic grup que realitzava una conducta operant durant el tractament. Per aquesta raó vam realitzar un contrast d'hipòtesis (*t de Dunett*) amb el grup AEIC com a grup fixat per fer la comparació. Aquesta anàlisi va mostrar diferències significatives entre els grups AEIC i SHAM ( $P=.048$ ) i una tendència a la significació entre els grups AEIC i DBS ( $P=.062$ ). Tal com es mostra a la figura 55B, el nombre de cèl·lules c-Fos+ a l'estriat dorsal va ser significativament més alta al grup AEIC respecte del SHAM i gairebé respecte del DBS.



**Fig. 55 Efectes dels tractaments en àrees de conducta motora.** (A) nivells d'expressió de c-Fos al còrtex motor primari (CM1) en funció dels diferents grups experimentals ( $\pm$ SE); (B) nivells d'expressió de c-Fos a l'estriat dorsal (CPu) ( $\pm$ SE). A sota de les gràfiques es mostren microfotografies de cada àrea analitzada. *n.s.* indica una tendència a la significació ( $P=.062$ ).  $*P<.05$

### 3.3.5 Expressió de c-Fos: àrees relacionades amb aprenentatge i memòria

#### 3.3.5.1 Cornu ammonis 1 (CA1)

Per aquesta àrea de l'HPC vam trobar diferències entre grups en funció del factor HEMISFERI (interacció:  $F_{2,13}=3.772$ ,  $P=.050$ ). Els resultats van mostrar diferències significatives entre grups només a l'hemisferi contralateral ( $F_{2,13}=4.820$ ,  $P=.027$ ), en el què el grup AEIC presentava major expressió de c-Fos que els grups SHAM ( $P=.038$ ) i DBS ( $P=.012$ ). En canvi, a l'hemisferi ipsilateral, malgrat que el factor GRUP no va ser significatiu ( $P=.179$ ), l'expressió de c-Fos dels subjectes del grup AEIC presentava una tendència a ser superior a la del grup SHAM ( $P=.075$ ). L'estudi de les diferències entre hemisferis dins de cada grup de tractament no va mostrar diferències significatives en el grup SHAM ( $P=.269$ ) ni en l'AEIC ( $P=.116$ ). En canvi, sí que hi va haver diferències significatives en el grup DBS ( $P=.034$ ), presentant major expressió de c-Fos a l'hemisferi ipsilateral que al contralateral (Fig.56A).

### 3.3.5.2 Cornu ammonis 3 (CA3)

Cap dels factors principals HEMISFERI [ $F_{1,12}=0.000$ ,  $P=.996$ ] ni GRUP [ $F_{2,12}=1.176$ ,  $P=.841$ ] van ser estadísticament significatius. Tampoc ho va ser la interacció entre aquests dos factors [ $F_{2,12}=0.164$ ,  $P=.850$ ].

### 3.3.5.3 Amígdala

Els nuclis de l'amígdala que vam estudiar van ser BLA i LA. A la BLA no vam trobar resultats estadísticament significatius: factor HEMISFERI [ $F_{1,13}=1.396$ ,  $P=.259$ ], factor GRUP [ $F_{2,13}=0.486$ ,  $P=.626$ ] i interacció GRUP x HEMISFERI [ $F_{1,13}=0.740$ ,  $P=.496$ ] (Fig.56B). A la LA vam obtenir resultats similars, en el sentit que cap dels factors principals va resultar significatiu: factor HEMISFERI [ $F_{1,13}=0.965$ ,  $P=.344$ ], factor GRUP [ $F_{2,13}=0.170$ ,  $P=.845$ ] i interacció GRUP x HEMISFERI [ $F_{1,13}=0.253$ ,  $P=.781$ ]. L'expressió de c-Fos als nuclis BLA i LA de l'amígdala no va variar en funció del tractament ni de l'hemisferi.

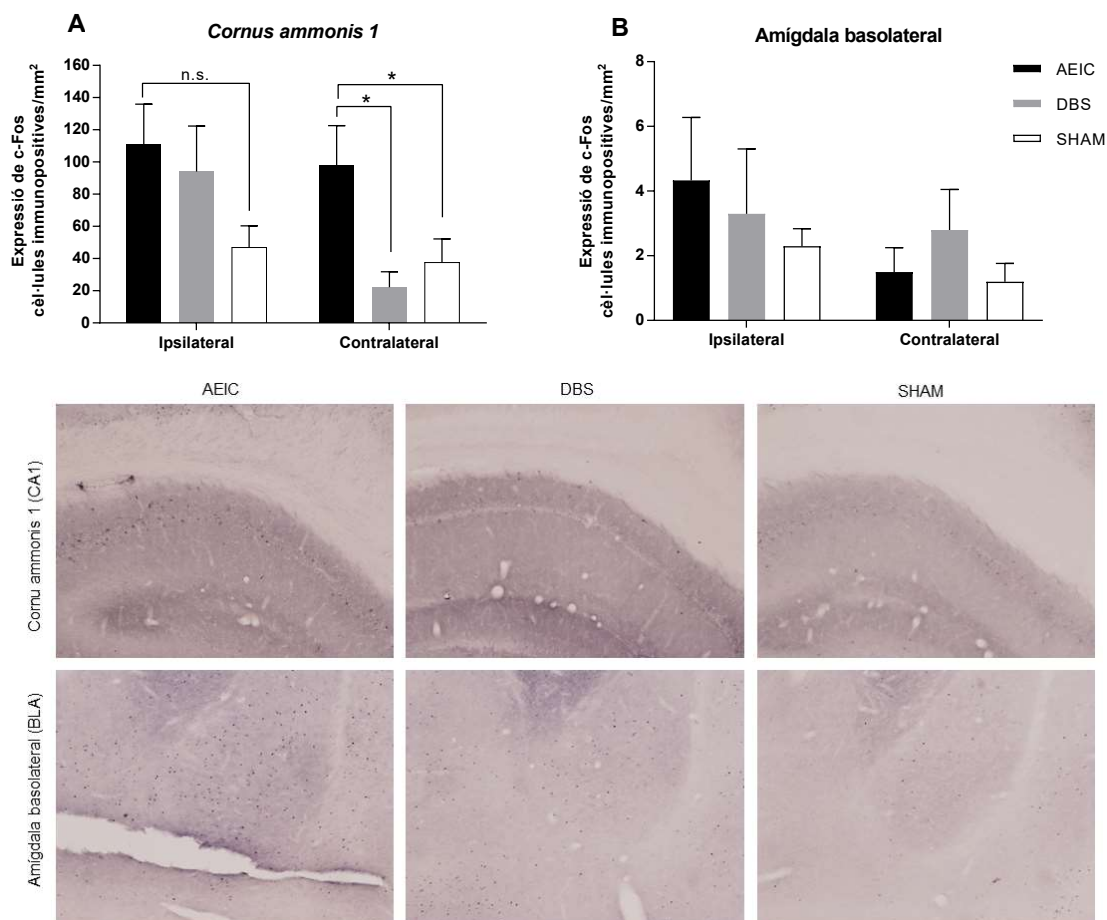


Fig. 56 Efectes dels tractament en àrees d'aprenentatge i memòria. (A) nivells d'expressió de c-Fos a CA1 de l'HPC de cada grup a l'hemisferi contralateral ( $\pm$ SE); (B) expressió de c-Fos a la BLA de cada grup a l'hemisferi ipsilateral ( $\pm$ SE). *n.s.* indica una tendència a la significació ( $P=.075$ ). Les microfotografies a sota de les gràfiques corresponen a les àrea analitzades. \* $P<.05$

### 3.3.6 Expressió de c-Fos: àrees relacionades amb el reforç

#### 3.3.6.1 Feix prosencefàlic medial (FPM)

Al FPM, el factor HEMISFERI va ser estadísticament significatiu [ $F_{1,13}=5.753$ ,  $P=.032$ ] però no ho va ser la interacció GRUP x HEMISFERI [ $F_{2,13}=1.981$ ,  $P=.177$ ]. L'expressió de c-Fos va resultar diferent en ambdós hemisferis, essent major a l'hemisferi ipsilateral a la implantació de l'elèctrode, independentment del tractament aplicat. El factor GRUP no va ser estadísticament significatiu [ $F_{2,13}=2.480$ ,  $P=.122$ ], indicant que l'expressió de c-Fos al FPM no variava en funció del tractament però sí de l'hemisferi (Fig.57A).

#### 3.3.6.2 Nucli accumbens: core

Es van trobar diferències significatives en el factor GRUP en funció de l'HEMISFERI [ $F_{2,12}=3.944$ ,  $P=.048$ ]. L'estudi d'efectes simples, és a dir, les diferències entre grups dins de cada hemisferi, va indicar una tendència a la significació per l'hemisferi ipsilateral [ $F_{2,12}=4.407$ ,  $P=.067$ ], però no del contralateral [ $F_{2,13}=1.165$ ,  $P=.343$ ]. L'anàlisi de contrastos ens va indicar que el grup AEIC presentava major expressió de c-Fos ipsilateral que el SHAM ( $P=.025$ ). Al realitzar l'anàlisi per cada grup experimental vam trobar que no hi havia diferències d'activació entre hemisferis en el grup SHAM ( $P=.298$ ) ni en el DBS ( $P=.240$ ), però sí que hi havia una tendència del grup AEIC ( $P=.072$ ) a mostrar més expressió de c-Fos al core ipsilateral (Fig.57B).

#### 3.3.6.3 Nucli accumbens: shell

Cap dels factors principals HEMISFERI [ $F_{1,12}=1.180$ ,  $P=.166$ ] ni GRUP [ $F_{2,12}=0.858$ ,  $P=.449$ ] van ser estadísticament significatius. Tampoc ho va ser la interacció entre aquests dos factors [ $F_{2,12}=1.382$ ,  $P=.288$ ]. Les imatges de la figura 58 mostren expressió de c-Fos al FPM i al core del NAcc.

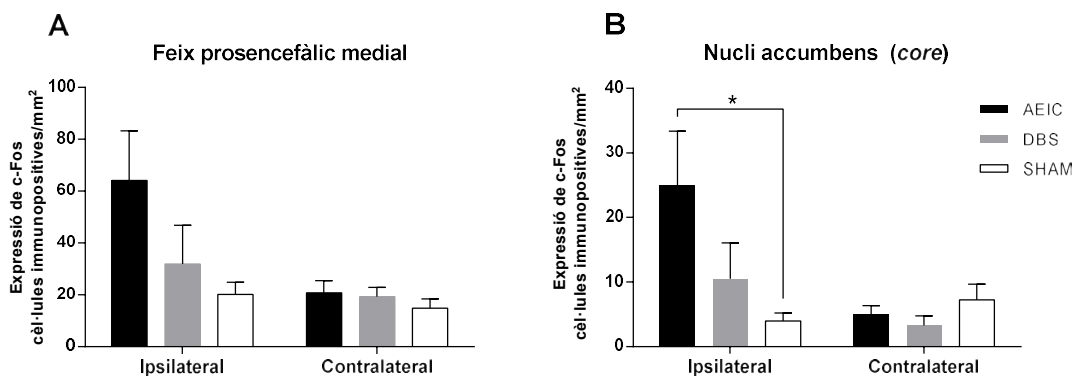


Fig. 57 Efectes dels tractaments en àrees relacionades amb el reforç. (A) nivells d'expressió de c-Fos al FPM de cada grup a l'hemisferi ipsilateral ( $\pm$ SE); (B) expressió de c-Fos al core del NAcc de cada grup a l'hemisferi ipsilateral ( $\pm$ SE). \* $P<.05$

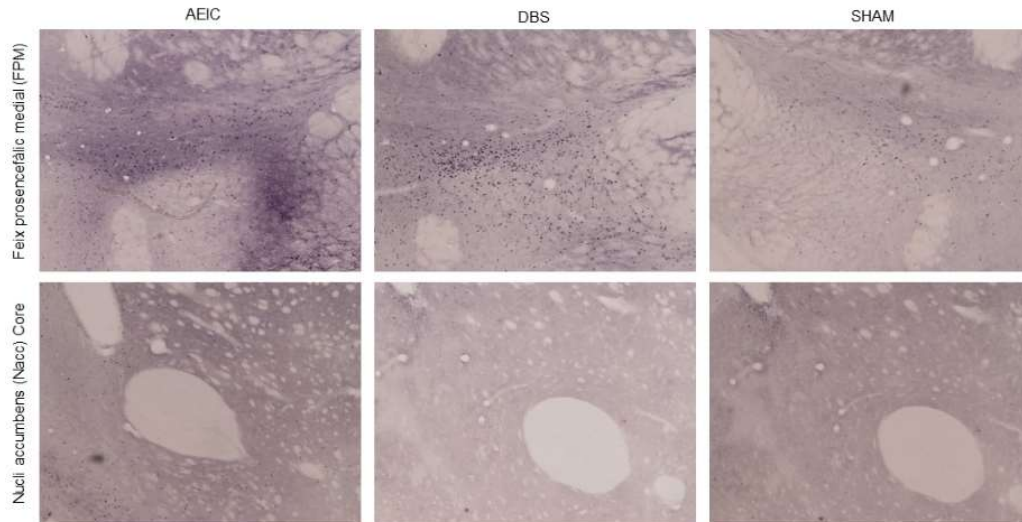


Fig. 58 Microfotografies d'expressió de c-Fos al FPM i al core del NAcc. Es mostren imatges d'exemple de cada grup experimental AEIC, DBS i SHAM.

### 3.3.7 Expressió de c-Fos: àrees relacionades amb *arousal*

En relació als sistemes d'*arousal*, es va avaluar l'expressió de c-Fos al nucli centromedial, un nucli inespecífic talàmic, en comparació amb un altre nucli talàmic de caràcter més associatiu, el mediodorsal. Pel nucli centromedial, el factor HEMISFERI [ $F_{1,13}=1.089$ ,  $P=.316$ ] i la interacció HEMISFERI x GRUP [ $F_{2,13}=1.268$ ,  $P=.314$ ] no van resultar significatius però sí que ho va ser el factor GRUP [ $F_{2,13}=15.708$ ,  $P<.0001$ ]. L'anàlisi de contrastos va mostrar major expressió de c-Fos en el grup AEIC en comparació amb els altres dos grups, el DBS ( $P=.005$ ) i el SHAM ( $P<.0001$ ), independentment de l'hemisferi, com s'observa a la figura 59A. Per altra banda, al nucli mediodorsal ni el factor HEMISFERI [ $F_{1,13}=2.614$ ,  $P=.130$ ] ni el factor GRUP [ $F_{2,13}=0.720$ ,  $P=.505$ ], ni la interacció GRUP x HEMISFERI [ $F_{2,13}=0.156$ ,  $P=.857$ ] van resultar significatius (Fig.59B). Les imatges de la figura 60 mostren expressió de c-Fos als nuclis del tàlem relacionats amb l'*arousal*.

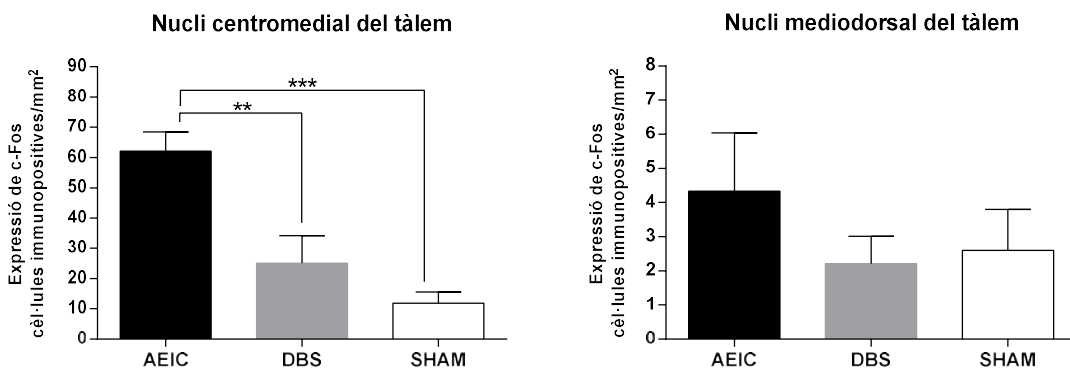
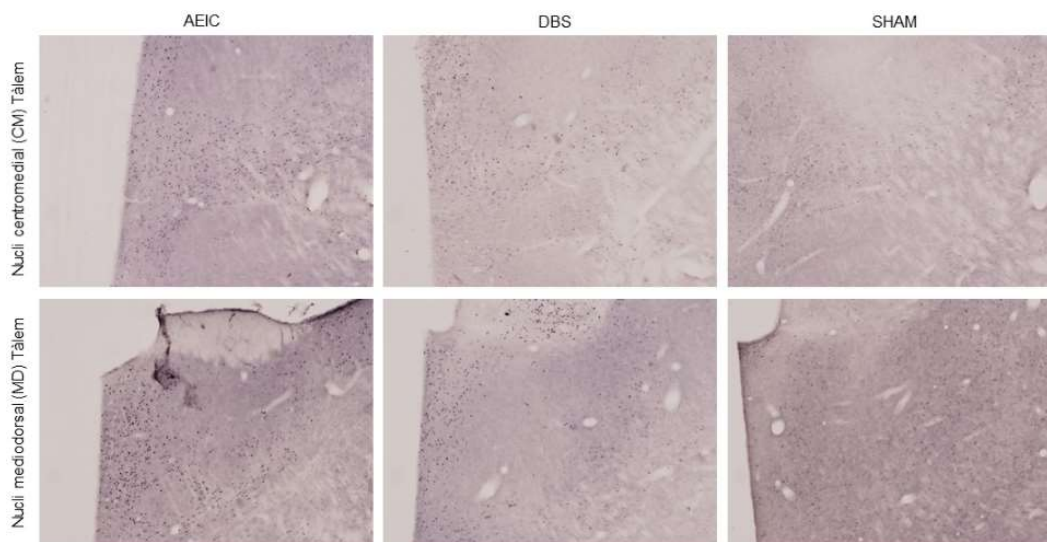


Fig. 59 Efectes dels tractaments en àrees relacionades amb *arousal*. (A) nivells d'expressió de c-Fos al nucli centromedial del tàlem per cada grup ( $\pm$ SE); (B) nivells d'expressió de c-Fos al nucli mediodorsal del tàlem per cada grup ( $\pm$ SE). \*\* $P<.005$ ; \*\*\* $P<.001$



*Fig. 60* Microfotografies d'expressió de c-Fos en àrees relacionades amb arousal (nuclis centromedial i mediodorsal del tàlem). Es mostren imatges d'exemple de cada grup experimental AEIC, DBS i SHAM.

### 3.4 Discussió

Els resultats del present experiment van mostrar que l'estimulació elèctrica reforçant del FPM facilitava l'aprenentatge espacial relacional, independentment de si era o no autoadministrada. Els resultats de l'anàlisi de l'expressió de c-Fos van posar de manifest que, malgrat ser funcionalment similars, els dos tipus d'administració de l'estimulació provocaven l'activació de regions diferencials del cervell.

#### 3.4.1 Efectes dels tractaments d'AEIC i DBS sobre la memòria espacial al LAM

Les dades que vam obtenir a partir de l'anàlisi de la fase d'adquisició de l'aprenentatge espacial ens van mostrar que els animals que havien estat tractats amb l'estimulació del FPM feien latències menors que els no tractats, presentant, per tant, una facilitació de la tasca. Aquests efectes els vam atribuir al tractament i no a altres variables com ara el pes dels animals o la conducta motora, ja que no es van observar diferències entre grups en les variables de control analitzades. A més, l'AEIC com a tractament aplicat post-entrenament es va mostrar capaç de facilitar la consolidació de la memòria en el curs de les sessions d'entrenament, tal com ja s'havia vist en estudis previs [9, 11].

En canvi, donat que hi ha pocs estudis en que s'hagi aplicat la DBS al FPM per facilitar la memòria espacial [321] i, fins on sabem, no s'han fet treballs estudiant els efectes de la DBS del FPM en un LAM de tipus espacial, aquests resultats suposen una dada inèdita, pel fet de mostrar que la DBS al FPM clarament facilita l'aprenentatge i la memòria.



A la sessió 1 vam veure certes diferències entre grups a les latències, encara que no van ser estadísticament significatives. Aquesta dada és important a l'hora d'atribuir els resultats observats als tractaments, ja que els animals van rebre el primer tractament després d'aquesta primera sessió. Aquestes diferències podrien ser degudes a l'atzar, a la variabilitat en l'execució del animals a les tasques al LAM o al fet de tenir una mostra petita de subjectes. Per tal de reduir aquesta variabilitat inicial, vam introduir la variable *temps en parets* com a covariable, ja que resultava significativa en aquesta primera sessió d'entrenament quan encara no s'havia administrat cap tractament. Aquestes lleugeres diferències també podrien ser degudes a diferents nivells inicials d'ansietat entre individus, ja que els subjectes que havien rebut tractament amb DBS feien, significativament, menys tigmotaxi que el grup SHAM. Aquest efecte ja va ser descrit per Luyck i col·laboradors [381] i podria provocar una millor predisposició a l'aprenentatge. Així doncs, vam partir de grups iguals per a valorar els efectes dels tractaments, però no podíem descartar efectes de les sessions de modelament i CIO. Les sessions de CIO poden, o bé reduir l'ansietat o bé produir altres efectes que podrien predisposar a una millor execució. Habitualment aquestes sessions es realitzen 72h abans d'iniciar l'entrenament i són de curta durada precisament per a evitar efectes proactius sobre l'aprenentatge posterior. De totes formes, en treballs del nostre laboratori on també es van estudiar els efectes de l'AEIC en un LAM espacial no es va trobar cap interferència de la CIO [9, 11], per tant, vam concloure que si la CIO podia haver produït algun efecte, no era comparable al del propi tractament.

#### *La DBS i l'AEIC han estat igualment efectives?*

L'estudi dels efectes dels dos tipus d'administració a cadascuna de les sessions ens va indicar que a les sessions 2, 3 i 4 sí que hi havia diferències en funció del grup de tractament al qual pertanyien el subjectes. El nivell d'aprenentatge va ser major en els grups d'AEIC i DBS que en el grup SHAM però no es va observar un clar efecte d'un dels dos tractaments per sobre de l'altre. De fet, si hi va haver un tractament més destacat podria ser la DBS, ja que l'efecte facilitador d'aquest començava a la sessió 2, mentre que el de l'AEIC es va començar a observar a la sessió 3. Per tant, podríem dir que el tractament de DBS va tenir un efecte accelerador de l'aprenentatge lleugerament superior al de l'AEIC. Aquest fenomen es pot comparar parcialment amb els resultats de White i Major [36], aquests autors van trobar que calien més trens d'estimulació pel grup AEIC que pel de DBS per obtenir el mateix efecte facilitador de l'aprenentatge. Aquestes dades són coherents amb el fet que la DBS va mostrar efectes una sessió abans que l'AEIC, que també facilitava l'aprenentatge però quan havia rebut més trens

d'estimulació elèctrica. Malgrat això, nosaltres aplicàvem 2500 trens i, segons la hipòtesi de l'activació que proposaven els autors, el tractament de DBS no hauria de ser facilitador ja que provocaria un *arousal* massa elevat. Considerant que els paràmetres del corrent estimulant d'aquell estudi i el nostre no són equivalents, no podem afirmar que el nostre model de tractaments s'ajusti necessàriament a aquesta hipòtesi.

A l'última sessió d'adquisició tots els grups van presentar latències similars, mostrant un mateix nivell d'aprenentatge. Això es podria explicar per un efecte sostre, un nombre massa elevat de sessions o d'assaigs per sessió podria haver fet que tots els animals acabessin assolint el mateix nivell d'adquisició. Així mateix, en un altre estudi del nostre laboratori on s'avaluaven els efectes de l'AEIC en una tasca de memòria implícita, també es va trobar un efecte sostre per excés d'entrenament que va impedir veure efectes del tractament a les últimes sessions de retenció [133].

#### *Es van mantenir els efectes facilitadors al test de retenció?*

L'estudi del *temps al quadrant target* durant els primers 30 segons del test de retenció va mostrar que els animals que havien rebut tractament (AEIC i DBS) estaven un temps superior a l'atzar (25%) en aquest quadrant, a diferència del grup SHAM. En canvi, pel global de la sessió no hi havia diferències entre els grups. Sembla, doncs, que el grup SHAM no hauria consolidat tan bé l'aprenentatge adquirit com ho van fer els subjectes dels grups AEIC i DBS. Al test de retenció també es va trobar un efecte significatiu de tigmotaxi, els subjectes autoestimulats semblaven mostrar menys ansietat, seguits dels estimulats amb DBS i per últim els del grup SHAM. És probable que els animals que van aprendre on era la plataforma i van consolidar l'aprenentatge presentaven menors nivells d'ansietat que els que no recordaven on era i no buscaven al quadrant *target*, sinó que simplement buscaven fugir de la piscina.

#### *Per què no vam trobar un efecte potent dels tractaments en el test de retenció?*

Altres treballs d'investigació dels efectes de l'AEIC sobre l'aprenentatge i la memòria al LAM [9, 11] van obtenir efectes amb sessions de poc entrenament, com també es va veure a la primera setmana d'entrenament de l'Experiment VI d'aquest treball. Això ens fa pensar que els estudis amb pocs assaigs d'adquisició permeten detectar millor les diferències entre els grups de tractament i els SHAM. En canvi, i com també es va veure en l'estudi d'Aldavert-Vera i col·laboradors [382], on es feien sessions d'adquisició d'una tasca implícita amb aprenentatge massiu (50 assaigs per sessió), l'AEIC no va presentar efectes facilitadors a la fase d'adquisició de la tasca però sí a la retenció a curt termini.

Així doncs, podem concloure que, quan hi ha molt entrenament i els animals del grup SHAM poden aprendre totalment la tasca i presentar un bon rendiment, és més difícil veure efectes de l'AEIC a la fase d'adquisició i, inclús, a la retenció. No obstant, els tractaments amb AEIC i DBS tenen efectes facilitadors del procés de consolidació, permetent assolir l'aprenentatge en menys assaigs i recuperar-lo abans (als 30 primers segons del test de retenció).

### **3.4.2 Efectes dels tractaments d'AEIC i DBS sobre l'activació neuronal**

#### *Àrees relacionades amb la conducta motora*

Els grups DBS i SHAM van presentar igual expressió de c-Fos mentre que el grup AEIC tenia una major activació al CM1. Aquests resultats són coherents amb el fet que els animals que es van autoadministrar el tractament realitzaven major activitat motora que els DBS i els SHAM. Així mateix, aquests resultats concorden amb els estudis de Rao i col·laboradors [171]. Aquesta escorça sembla ser l'estructura on es formen les memòries motores i l'adquisició d'habilitats motores, requerint canvis de llarga durada a les sinapsis [383]. Rao i col·laboradors van demostrar que l'estimulació elèctrica administrada per l'experimentador produïa canvis a les neurones del CM1 però que l'AEIC sí que podia produir un augment en les ramificacions dendrítiques. Al nostre treball, les diferències entre grups no van dependre de l'hemisferi, per tant, podem pensar que l'activitat neuronal en aquest còrtex produïda pel tractament no estaria lateralitzada. Una altra estructura relacionada amb l'activitat motora és l'estriat dorsal, aquesta àrea té un paper important en tasques en les que una resposta motora és reforçada [384]. A diferència dels grups DBS i SHAM, el grup AEIC realitzava un conducta operant, per tant, és coherent que els resultats que vam obtenir indiquin una major activació de l'estriat dorsal pels subjectes del grup AEIC respecte dels altres dos grups estudiats.

Degut a que el *core* del NAcc està relacionat amb el control motor i l'aprenentatge de les respostes conductuals apetitives [385–388], també el podem considerar com una estructura relacionada amb les conductes motores implicades en l'AEIC. Al *core* de l'hemisferi ipsilateral, es van reproduir els mateixos patrons d'activació que a les altres estructures relacionades amb el component motor de la conducta, encara que de manera ipsilateral. L'efecte de lateralització és coherent si tenim en compte que el NAcc forma part del sistema del reforç i és una de les àrees més directament estimulades per l'AEIC del FPM [389].

*Àrees relacionades amb l'aprenentatge i la memòria*

La memòria espacial és un component bàsic de la memòria episòdica, relacionada amb records sobre fets ubicats en un moment concret en el temps i l'espai. La memòria episòdica s'inclou dins de les memòries explícites o declaratives. Aquest tipus de memòria ha estat estretament relacionada amb l'HPC, àrea on s'hipotetitzava que els tractaments d'estimulació elèctrica cerebral poden provocar canvis que explicarien la facilitació de l'aprenentatge espacial tant al model animal [7, 11, 34, 35, 39, 152, 171, 178], com a la clínica en humans [29, 365, 390]. Les dades histològiques d'aquest treball van indicar que l'estimulació elèctrica del FPM incrementava l'expressió del gen d'expressió primerenca c-Fos a l'HPC només quan era autoadministrada i especialment a l'hemisferi contralateral a l'estimulat. Els subjectes del grup AEIC van presentar major activació neuronal a CA1 de l'hemisferi contralateral respecte de DBS i SHAM. En canvi, a l'hemisferi ipsilateral, malgrat que els grups estimulats van mostrar nivells absoluts d'expressió de c-Fos superiors al grup no estimulat, no van arribar a cap diferència estadísticament significativa, probablement degut a una alta variabilitat intragrup.

Perquè els dos tipus d'estimulació (AEIC i DBS) no van causar nivells d'expressió de c-Fos superiors al grup SHAM, malgrat haver facilitat l'aprenentatge? Una primera explicació seria que en aquesta mateixa àrea de l'HPC, el grup SHAM també hauria presentat una elevada expressió de c-Fos, donat que a la fase de retenció no vam trobar diferències significatives entre grups en el total de la sessió. Això indicaria que hi ha factors externs al tractament que augmenten l'expressió d'aquest gen, com ara el propi entrenament, reduint el possible efecte de l'estimulació. Cal tenir en compte que l'obtenció del teixit per realitzar l'estudi immunohistoquímic es va realitzar 90 minuts després de la retenció, quan els animals van mostrar els mateixos nivells de consolidació de la memòria. Per altra banda, en un estudi d'Huguet i col·laboradors es va veure que el tractament d'AEIC augmentava els nivells de c-Fos a CA1 [35], però en aquell cas es va fer una única sessió de tractament, mentre que en el nostre estudi es va administrar un tractament més persistent. En treballs en que s'administra una AEIC continuada, els nivells de c-Fos disminueixen per un fenomen de dessensibilització a l'expressió de c-Fos [378]. En l'estudi d'Huguet i col·laboradors no van trobar diferències entre hemisferis i van concloure que l'AEIC produïa una activació neuronal bilateral. Les diferències de lateralitat trobades entre els dos treballs es poden explicar perquè, a) l'estimulació activa neurones concretes de diferents regions de l'HPC, per tant, els resultats poden variar segons la zona seleccionada per fer el comptatge; b) la memòria estudiada en el present estudi era explícita mentre que el d'Huguet i col·laboradors era implícita, i l'estimulació pot haver afectat de manera diferent.

En relació a les diferències hemisfèriques en l'expressió de c-Fos a CA1, cal destacar que el fet que haguem trobat una major expressió de c-Fos a l'hemisferi esquerre dels subjectes que han rebut autoestimulació podria tenir relació amb la possible lateralització de la memòria en rates. Klur i col·laboradors [391] van proposar que l'hemisferi esquerre podia estar relacionat amb la representació espacial i el dret amb l'emmagatzemament i la recuperació de la memòria. Per tant, una major activitat a CA1 de l'hemisferi esquerre concorda amb l'estudi de Klur i col·laboradors, ja que l'AEIC després d'una tasca de memòria espacial podria haver potenciat la representació espacial, portant a una adquisició més ràpida. Que l'expressió sigui major per l'AEIC que per la DBS pot tenir relació amb l'estudi de White i Major [36] on plantejaven que ambdós tipus d'estimulació podrien implicar substrats del reforç i estructures diferents. Això sembla seguir la línia de la nostra hipòtesi ja que el component motivacional de l'AEIC podria dur a una activació major o d'un major nombre d'àrees cerebrals. Aquesta activació més dispersa arribaria a l'hemisferi contralateral, mentre que la DBS podria no presentar una activació tant àmplia.

El fet de no haver trobat diferències als nuclis LA i BLA de l'amígdala podria explicar-se per la seva connexió amb la memòria emocional i no tant amb la memòria espacial. Els efectes del tractament amb AEIC en aquestes àrees s'han relacionat més amb la memòria implícita i no tant amb la memòria explícita [384].

#### *Àrees del reforç*

En conjunt, els resultats obtinguts de l'estudi immunohistoquímic del FPM no els vam poder considerar fiables, ja que el comptatge aportava xifres molt baixes. Al FPM vam trobat major expressió de c-Fos a l'hemisferi ipsilateral a l'elèctrode, sorprenentment i independent del grup experimental. Esperàvem que l'expressió de c-Fos fos més elevada en els grups de tractament (AEIC i DBS) ja que el FPM era la zona estimulada directament per l'elèctrode. Tanmateix, les dades absolutes van mostrar que la diferència entre ambdós hemisferis (ipsilateral i contralateral) es trobava, sobretot, en els subjectes del grup AEIC i no en els altres. Això estaria en consonància amb el treball de Arvanitogiannis i col·laboradors [179] en que també van trobar lateralització i major activació del sistema del reforç en el grup AEIC en comparació amb el grup SHAM.

El NAcc és una altra estructura cerebral relacionada amb el reforç. Per l'estudi de l'expressió de c-Fos en aquest nucli les mostres obtingudes no van ser adients, eren massa anteriors en relació a les coordenades anteroposteriors i els resultats no van resultar fiables donat que es va trobar una molt baixa expressió de c-Fos.

L'estudi d'activació del *core* del NAcc va indicar una major expressió de c-Fos a l'hemisferi ipsilateral tal com mostren altres estudis [183, 392]. Aquest efecte s'explicaria pel fet que aquesta regió rep aferències de l'HL dret que es troba proper i és el que va ser estimulat. El fet d'haver trobat major activació al grup AEIC pot ser degut a que el *core* està relacionat amb el condicionament clàssic, que no es produeix en els animals que reben DBS i els SHAM [15]. Degut a la limitació metodològica d'aquesta anàlisi, tant pel que fa al protocol immunohistoquímic com de les coordenades d'obtenció del teixit, considerem que un futur caldria repetir aquest estudi per obtenir resultats més fiables.

#### *Àrees relacionades amb arousal*

Al nucli centromedial del tàlem, críticament involucrat amb l'*arousal* i processos d'atenció i memòria, vam detectar una expressió major de c-Fos pel grup AEIC respecte de DBS i SHAM. El tractament amb AEIC pot fer que s'activi més, assolint una activació òptima per a una millor consolidació de la memòria si es dona en el període crític de processament de la informació [132, 133]. En consonància amb els resultats de Redolar-Ripoll [133], les nostres dades semblaven assenyalar que l'AEIC post-entrenament potenciava el procés de consolidació de la memòria activat per l'experiència inicial. La connexió del nucli centromedial amb àrees prefrontals també és consistent amb l'estudi de Nyberg i col·laboradors [393], ja que l'augment de l'activitat en aquest nucli podria portar també a un augment al CPF i això acceleraria els processos de recuperació de la memòria explícita episòdica.

En resum, tots els grups semblaven presentar similar activació de la regió hipocampal CA1 ipsilateral, que es podria relacionar amb el nivell similar d'execució a la tasca espacial. El grup AEIC va presentar major activació neuronal que els altres grups, especialment observada a regions relacionades amb conducta motora operant, a l'hemisferi contralateral de CA1 i a alguna regió relacionada amb *arousal*. Tanmateix, cap d'aquestes activacions específiques d'AEIC semblava ser crítica per a la facilitació de l'aprenentatge, però desconexem possibles efectes diferencials entre les dues formes d'administració més a llarg termini o en condicions de recuperació de la memòria. No obstant, el fet que tant l'AEIC com la DBS tinguessin la mateixa capacitat per facilitar la memòria, essent superiors al grup SHAM, indica que la major activació post-test en àrees motores o d'*arousal* causada per l'autoadministració no sembla ser crítica per a obtenir facilitació de la tasca. Caldrà tenir en compte les limitacions de l'estudi immunohistoquímic i dels temps d'obtenció del teixit en futurs experiments. Tot i així, considerem que els resultats són una troballa interessant ja que permetria una

aproximació dels resultats obtinguts en la investigació amb animals a l'ús terapèutic de la DBS a la pràctica clínica.

## **V. DISCUSSIÓ GENERAL**

---





El principal objectiu d'aquesta tesi doctoral va ser estudiar l'efecte de l'AEIC del FPM a nivell de l'HL sobre la facilitació de l'aprenentatge i la memòria en rates, modificant les condicions d'administració més utilitzades en models animals, amb la intenció de fer-les més anàlogues a les que s'utilitzen en el tractament de la DBS a la clínica d'humans. Habitualment, la DBS per facilitar la memòria s'administra amb corrent elèctric d'ona quadrada i es fa de manera crònica, continuada i distribuïda al llarg del dia [21, 23, 202], no només quan la persona està fent una tasca d'aprenentatge específica o evocant records. Per tant, vam buscar incrementar el valor translacional del nostre model de facilitació de la memòria mitjançant l'estimulació cerebral reforçant autoadministrada, en la rata, 1) aplicant estimulació amb corrent elèctric d'ona quadrada, 2) aplicant el tractament de forma no contingent amb l'aprenentatge, 3) incrementant la durada del tractament i 4) comparant els efectes d'un tractament autoadministrat (AEIC) i un tractament d'administració remota (DBS). El tipus d'ona i els paràmetres específics de la DBS, han estat àmpliament estudiats, tant pel tractament d'aspectes relacionats amb la memòria [30] com d'altres trastorns neurodegeneratius [314, 394–399] i neuropsiquiàtrics [142, 400, 401]. En canvi, fins on sabem, hi ha pocs estudis paramètrics en relació a l'administració del tractament, en quant a la durada, contingència i si és o no autoadministrat [36].

### **És efectiva l'ona quadrada, com ho és la sinusoidal?**

El primer bloc d'experiments d'aquesta tesi va tenir l'objectiu de fer un estudi d'administració d'un tractament d'AEIC amb ona quadrada. Vam cercar la configuració de paràmetres d'estimulació capaç de produir uns efectes facilitadors de la memòria en una tasca de discriminació visual, de característiques similars als observats al nostre laboratori amb AEIC d'ona sinusoidal [6, 11, 27, 133, 136, 402]. Les variables que vam modificar van ser la freqüència de l'ona i la durada dels polsos i dels trens.

Inicialment, en els Experiments I i II vam mantenir la durada del tren en 300ms tal com havíem aplicat en estudis previs del nostre laboratori i, per evitar efectes secundaris del tractament, vam aplicar uns polsos d'estimulació de molt curta durada (0.1 i 0.5ms) i d'alta freqüència (100 i 200Hz), que s'havien vist efectius en DBS [155–158] i AEIC d'ona quadrada [147]. Els resultats obtinguts no van ser els esperats; a més de no haver trobat efectes sobre la memòria, vam necessitar unes intensitats d'estimulació excessivament elevades que podrien haver interferit en els efectes positius esperats de l'AEIC sobre l'aprenentatge. Vam considerar, també, que uns polsos massa curts podrien haver estat insuficients per tenir efectes o que una intensitat d'estimulació massa elevada podria haver afectat àrees adjacents, interferint en els efectes de l'AEIC. Sabem que

l'estimulació d'alta intensitat s'administra per tractar símptomes motors en models animals [322] perquè té efectes inhibitoris, i no s'ha mostrat efectiva per millorar les capacitats cognitives en models animals de símptomes depressius per sobre de  $300\mu\text{A}$  [323]. En el tercer experiment, vam modificar de nou les variables per fer un canvi global de configuració, augmentant la durada dels polsos i reduint la freqüència. En aquest experiment, tampoc vam trobar efectes clars del tractament en la memòria i, a més, vam observar efectes adversos probablement deguts a l'elevada durada dels polsos. Això hauria pogut fer que l'estimulació elèctrica s'expandís a àrees motores adjacents, com per exemple la càpsula interna, que és anatòmicament molt propera al FPM i forma part del tracte corticospinal, que transmet informació descendent des del còrtex motor primari (CM1) cap a les neurones motores caudals ubicades a la banya ventral de la medulla espinal [351]. En l'últim experiment d'aquest bloc, vam configurar l'ona quadrada de manera que fos el més similar possible a l'ona sinusoidal que habitualment apliquem al nostre laboratori, amb una freqüència de 50Hz i polsos de 20ms de durada, però reduint la durada del tren per evitar els efectes secundaris trobats en l'experiment anterior. D'aquesta manera, vam trobar efectes positius del tractament en la retenció de l'aprenentatge.

Per tant, el conjunt de resultats d'aquest bloc ens va permetre concloure que, de manera general, els polsos de llarga durada administrats a baixa freqüència eren més efectius per facilitar la memòria a la tasca de DVS al LAM que els polsos de curta durada i freqüències elevades. Creiem que les possibles causes de la manca d'efectes observats en els Experiments I i II podrien ser 1) que la durada dels polsos era insuficient o 2) que els paràmetres aplicats requerien una intensitat d'estimulació massa elevada i, de manera indirecta, la intensitat del corrent interferia en els efectes del tractament. Per l'Experiment III, les causes possibles són una durada del pols i/o del tren massa elevats que hauria expandit el corrent a àrees adjacents produint efectes adversos que haurien pogut interferir en com els animals realitzaven la tasca.

El fet que els efectes positius del tractament d'AEIC sobre la memòria només es vagin observat a la retenció podria ser degut a la configuració de la tasca i no tant al tipus d'ona aplicada; en el protocol utilitzat als experiments del bloc I, els senyals contextuais estaven relativament allunyats de la plataforma i això podria haver dificultat l'establiment d'associacions entre els estímuls i la plataforma, dificultant l'execució dels animals en la tasca [301]. D'aquesta forma, els efectes de l'AEIC sobre les associacions produïdes pel condicionament han pogut ser més lentes, no sent evidents a la fase d'adquisició, sinó més tard, a la fase de retenció. Tanmateix, no podem descartar la possibilitat que la tasca de DVS al LAM resulti més difícil de resoldre que les de memòria espacial, com també s'ha vist en el treball de Garcia-Brito [353], en el qual no es van trobar efectes del

tractament observables en les latències de la fase d'adquisició però sí en la retenció. En qualsevol cas, els resultats de l'Experiment IV van indicar que l'AEIC amb corrent d'ona quadrada era capaç de facilitar la memòria en una tasca de DVS, tal com ja s'havia demostrat amb corrent d'ona sinusoidal.

### **Cal que l'AEIC sigui contingent amb l'aprenentatge per facilitar la memòria?**

Tenint en compte que la DBS en humans s'aplica de manera distribuïda al llarg del temps i sense caldre la contingència entre el tractament i les tasques de memòria, vam dissenyar l'Experiment V de manera que l'AEIC no fos contingent amb l'entrenament, i vam estudiar els seus efectes en una tasca de memòria implícita i una de memòria explícita. Estudis previs ja van mostrar que l'AEIC era efectiva per facilitar la memòria en rates quan no hi havia contingència tractament-entrenament [152, 165, 168, 169]. Essent així, l'activació neuronal generada per l'AEIC podria actuar, no només reforçant les connexions sinàptiques establertes prèviament durant l'adquisició d'una tasca de memòria, sinó també com a tractament preparatori capaç de potenciar la plasticitat dels circuits neuronals implicats en diferents tipus de tasques. En general, l'AEIC s'ha mostrat capaç de facilitar l'aprenentatge i la memòria tant quan ha estat administrada sola i s'han estudiat els seus efectes proactius un temps després sobre diferents tasques, com quan s'ha administrat contingentment —abans o després— de l'entrenament en tasques de memòria. Per tant, aquestes dades suggereixen que l'AEIC pot tenir dos efectes diferenciats sobre l'aprenentatge i la memòria, encara que no excloents entre si: 1) un efecte més inespecífic o general, que podríem considerar com un agent *nootròpic*, sobre la plasticitat sinàptica al cervell [8, 37, 170, 171, 173, 185, 187], i 2) un efecte més específic en processos cognitius d'aprenentatge i memòria i els seus correlats neurals coneguts [5, 6, 9, 11, 27, 38]. En models animals prenem, principalment, aquest últim enfocament i controlem el moment d'administració del tractament respecte dels entrenaments d'aprenentatge.

Els resultats que vam obtenir semblaven indicar que la contingència és important per obtenir efectes facilitadors de l'AEIC sobre l'aprenentatge, ja que a la tasca de memòria implícita no vam trobar efectes de l'AEIC i, a més, el tractament semblava tenir efectes adversos en la memòria per la tasca espacial al LAM. La principal limitació del nostre model no-contingent creiem que ha sigut la quantitat de tractament. Un quantitat massa elevada d'estimulació hauria pogut generar un estat d'*arousal* excessiu que hauria dificultat la memòria [363, 403]. Aquest model de tractament distribuït en varies sessions diàries i alternades amb l'entrenament seria ineficient per desenvolupar teràpies en humans; en canvi, aplicar una estimulació continuada i ininterrompuda al llarg del temps,

realitzant les tasques de memòria a posteriori sembla ser menys contraproductiu. Els treballs de Rao i col·laboradors ja indicaven l'efectivitat d'aquest model per a potenciar la memòria en rates, tant a nivell conductual com del substrat neural [37, 152, 173]. Per tant, creiem que la contingència entre el tractament d'AEIC i l'entrenament és important, però no seria la clau dels efectes de l'AEIC sobre l'aprenentatge i la memòria.

### **La durada del tractament és un factor important en l'efecte de l'AEIC?**

L'Experiment VI d'aquesta tesi doctoral va tenir com objectiu estudiar els efectes de l'AEIC aplicada post-entrenament sobre una tasca de memòria espacial. Vam triar una tasca de memòria explícita pel fet que aquesta memòria és la que es veu més afectada a les fases inicials de la malaltia d'Alzheimer [366] i perquè a la clínica d'humans la DBS destinada a tractar problemes de memòria se sol aplicar en pacients que pateixen aquesta malaltia [21, 22, 202]. A més, vam realitzar un estudi de NG, activació neuronal i integració funcional per tal d'aportar nous coneixements de les bases moleculars dels efectes de l'AEIC en l'aprenentatge i la memòria.

El tractament de llarga durada aplicat en aquest experiment va mostrar efectes positius en l'aprenentatge, consistent només en una acceleració d'aquest durant la primera setmana de tractament i no a la segona, i observant-se el mateix nivell de record en tots els animals. Els efectes parcials que vam trobar a nivell de conducta podrien ser deguts a l'alta dificultat de la tasca. Per exemple, a l'estudi de Ruiz-Medina on una única sessió d'entrenament diària durant 5 dies constava d'un sol assaig de 120s [9], l'AEIC va mostrar un efecte positiu sobre la retenció de l'aprenentatge, però amb un assaig de 60s aquest efecte ja no apareixia [29]. Un sol assaig de 90s per sessió hauria resultat extremadament difícil pels animals, fent que alguns d'ells implementessin una estratègia associativa més eficient en un paradigma d'alta dificultat, com el del present experiment. En l'estudi de Martel i col·laboradors també es va veure que els animals que havien fet un nombre menor d'assaigs triaven una estratègia diferent als que havien tingut més opcions per aprendre [404]. La tasca de DVS al LAM que vam utilitzar al bloc I d'experiments també va resultar difícil d'assolir, ja que els animals no van arribar a reduir les latències de manera que indiquessin un aprenentatge consolidat. Concretament, a l'Experiment IV del bloc I també vam obtenir efectes parcials del tractament en la conducta, observant-se els efectes només en la retenció però no en l'adquisició de l'aprenentatge.

### **L'estimulació del FPM té efectes similars sobre la memòria si no és autoadministrada pel propi subjecte?**

Un altre dels objectius d'aquesta tesi va ser comparar dues formes d'aplicació del tractament d'estimulació elèctrica cerebral del FPM a l'HL, l'AEIC (autoadministrada) i la DBS (administrada per l'experimentador). Vam analitzar els efectes dels tractaments sobre una tasca espacial al LAM i, a més, vam estudiar l'expressió del gen c-Fos en diferents àrees cerebrals implicades en els sistemes de les conductes motores, l'aprenentatge i la memòria, el reforç i l'*arousal*. En l'estudi conductual vam trobar efectes facilitadors dels tractaments sobre l'aprenentatge, però no va destacar cap dels dos tractaments (AEIC i DBS) per sobre de l'altre, encara que l'efecte de la DBS es va manifestar una sessió abans que el de l'AEIC. Aquest efecte concorda parcialment amb el treball comparatiu de White i Major [36], aquests autors van trobar que calien més trens d'estimulació d'AEIC que de DBS per obtenir el mateix efecte facilitador de l'aprenentatge. Per altra banda, en l'última sessió d'adquisició, les diferències entre les latències de cada grup desapareixien probablement degut a un efecte *sostre* produït per un nombre massa elevat d'assaigs d'entrenament, en l'Experiment V d'aquesta tesi també es va observar una evolució similar de les latències dels grups AEIC i SHAM amb un procediment al LAM de 4 assaig per sessió, en aquell cas les diferències significatives només es van observar a la sessió 3 i es van igualar completament a la sessió 5 indicant també un possible efecte *sostre*. Altres treballs d'investigació dels efectes de l'AEIC sobre l'aprenentatge i la memòria al LAM [9, 11] van obtenir efectes de facilitació amb sessions de poc entrenament, com també vam trobar a la primera setmana d'entrenament de l'Experiment VI d'aquest treball. Això ens fa pensar que els estudis amb pocs assaigs d'adquisició permeten detectar millor les diferències entre els grups de tractament i els SHAM.

Al test de retenció ja no vam trobar efectes del tractament —AEIC o DBS— en les variables estudiades; aquest fenomen podria ser degut al mateix efecte *sostre* observat a la fase d'adquisició en què un nivell d'aprenentatge massa elevat per tots els grups no va deixar veure els efectes diferencials produïts pels tractaments. L'estudi del temps que els animals van nedar al quadrant *target* respecte a l'atzar va mostrar que el grup SHAM no hauria consolidat tan bé l'aprenentatge adquirit com ho van fer els subjectes dels grups AEIC i DBS. En el test de retenció també es va trobar un efecte significatiu de tigmotaxi, els animals autoestimulats semblaven mostrar menys ansietat que els altres dos grups. És probable que els animals que van aprendre on era la plataforma i van consolidar l'aprenentatge, presentessin menors nivells d'ansietat que els que no recordaven on era i no van buscar al quadrant on abans hi havia la plataforma sinó que simplement intentaven fugir del laberint. Aquests resultats concorden amb els

d'experiments anteriors. Als Experiments I i II l'AEIC no va tenir efectes en l'aprenentatge i la memòria i, al mateix temps, semblava produir efectes ansiogènics. En canvi, en els Experiments III i IV on trobàvem certs efectes de l'AEIC en la memòria no es van veure efectes ansiogènics en els animals que havien rebut tractament. Si comparem els Experiments V i VI trobem que al V, on no hi havia aprenentatge i vam aplicar 3 sessions de tractament diàries, apareixia major tigmotaxi en els animals que havien rebut tractament en comparació amb els SHAM; mentre que a l'Experiment VI, on l'AEIC accelerava l'aprenentatge, no s'observava aquest efecte. Un treball on s'estudiaven els nivells de corticosterona (hormona de l'estrès) en rosegadors sotmesos al LAM respecte del laberint de Barnes, va mostrar que el laberint de Morris provocava per si sol nivells majors d'estrès en els animals a diferència del laberint de Barnes, en canvi, a mida que els animals aprenien al laberint de Morris els nivells disminuïen mentre que al laberint de Barnes això no passava [405]. Sembla ser doncs, que la manca d'aprenentatge junt amb un *arousal* més elevat generat pel tractament amb AEIC podria produir efectes ansiogènics en els animals.

L'autoadministració i l'heteroadministració de reforçadors positius també s'han comparat en contextos no experimentals. Tant en psicologia clínica com educativa, hi ha tractaments conductuals basats en la presentació de reforçadors positius aplicats pel terapeuta o pel propi pacient (autoreforçament). En un estudi sobre la pèrdua de pes es va veure que tant si era el propi subjecte qui s'administrava un reforç com si ho feia el terapeuta, el tractament era igualment eficaç [406]. Aquests resultats concorden amb els obtinguts al nostre treball, no obstant, el treball de Jeffrey va trobar que a llarg termini l'autoreforçament produïa canvis més estables. Donat que a l'Experiment VII només vam fer una primera retenció a 72h, no podem saber si a més llarg termini hauríem trobat efectes diferencials entre els tractaments d'AEIC i DBS.

### **L'AEIC del FPM podrà promoure la NG? Aquestes cèl·lules noves, s'integraran al GD de l'HPC i seran funcionals?**

L'estudi molecular realitzat a l'Experiment VI va aportar algunes dades interessants que concordaven amb els resultats conductuals obtinguts. Els animals que havien rebut AEIC i estaven en una situació d'entrenament i/o realitzaven activitat física van presentar major NG que els que no havien rebut tractament, en canvi, aquest efecte no es veia pels animals en la condició *sec*; suggerint que una demanda cognitiva elevada i/o realitzar activitat física predisposava als animals que rebien AEIC a generar NG i facilitava la supervivència. Però potser la dada més interessant obtinguda, és que només el tractament d'AEIC podria fer que les neurones noves s'integressin en una xarxa neural

i fossin funcionals en animals sotmesos a una activitat d'aprenentatge. Així, vam trobar un major nombre de colocalitzacions de neurones BrdU+/c-Fos+ en animals que havien rebut tractament d'AEIC i que havien fet una tasca d'aprenentatge al LAM, mentre que els animals del grup SHAM i els que només havien nedat o que no havien tingut accés al laberint gairebé no presentaven colocalitzacions. Donat que l'estudi va ser de llarga durada (superior a 30 dies) podem considerar que la NG observada corresponia a aquelles cèl·lules que van sobreviure [34] i que el tractament podria haver generat un major nombre de neurones noves que, per aquells animals no sotmesos a una situació demandant (aprenentatge o activitat física), no haurien sobreviscut al llarg del procés experimental. Els resultats que vam obtenir concorden amb els d'altres estudis on s'havia vist que tant l'AEIC com l'aprenentatge espacial al LAM estaven relacionats amb la NG de l'HPC [32–35]. Malgrat que els resultats conductuals a la fase de retenció i els de NG no semblen concordar, Kempermann i col·laboradors [31] van trobar uns resultats similars en el seu experiment, els nivells de NG a l'HPC correlacionaven amb l'adquisició però no amb la retenció d'una tasca espacial al LAM.

En resum, els resultats de l'estudi immunohistoquímic ens indiquen que el fet que els animals estiguin exposats a una situació demandant, d'activitat física o bé d'aprenentatge que requereix fer una activitat cognitiva espacial relacional i/o associativa, potenciaria la NG a l'HPC en animals que haurien rebut AEIC. A més, sembla que l'AEIC facilitaria la supervivència i integració funcional en aquells animals sotmesos a una tasca d'aprenentatge, però aquests efectes no es van veure a nivell conductual al llarg de tot l'experiment, sinó només durant la primera setmana d'entrenament. Caldria modificar el procediment experimental, per exemple, incrementant el nombre d'assaigs per sessió o la durada de cada assaig a fi d'adequarlo a la capacitat dels animals i evitar que factors externs no controlats puguin interferir en l'efecte del tractament.

A partir dels resultats obtinguts, no podem afirmar que la durada del tractament sigui un factor important per obtenir efectes de l'AEIC sobre l'aprenentatge i la memòria, ja que els efectes a nivell conductual només es van veure els primers 5 dies d'entrenament. En canvi, sí que podem afirmar que l'AEIC va facilitar tant la supervivència com la integració funcional de les neurones noves generades a l'HPC.



**Quins efectes tindrà l'estimulació del FPM sobre l'activació neuronal en àrees cerebrals relacionades amb la memòria, el reforç, la conducta motora i l'*arousal*? Si hi ha efectes, seran diferents si l'estimulació és autoadministrada o administrada per l'experimentador?**

L'estudi immunohistoquímic d'expressió de c-Fos realitzat a l'Experiment VII no va mostrar els resultats esperats a les estructures relacionades amb l'aprenentatge i la memòria. Per exemple, a la regió CA3 els resultats no concordaven amb els obtinguts per Huguet i col·laboradors [35], que en el seu estudi van trobar una major expressió de c-Fos en aquesta àrea del GD pel grup AEIC respecte del SHAM. En el nostre cas, curiosament, el grup d'AEIC va mostrar major activació que el de DBS, en concret a CA1 de l'hemisferi contralateral. Aquestes diferències observades no s'expliquen pels resultats que vam veure a la fase conductual, no obstant, no podem descartar que puguin estar relacionades amb una consolidació de la memòria a més llarg termini per part del grup AEIC.

A les àrees estudiades relacionades amb el reforç tampoc vam trobar efectes del tractament, probablement degut a problemes metodològics durant el procés immunohistoquímic. En canvi, en relació a l'estudi d'activació d'àrees relacionades amb la conducta motora sí que vam trobar efectes dels tractaments. Concretament, el fet que al CM1 els animals que s'havien autoadministrat el tractament presentessin major activació que el grup de DBS i que el SHAM és coherent amb el fet que els animals que s'administraven l'AEIC realitzaven una activitat motora major que els que el rebien per part de l'experimentador i que els que no rebien tractament. Així mateix, també són coherents els resultats que indiquen que els animals que s'autoadministraven el tractament tenien un *arousal* més incrementat que els que l'havien rebut per part de l'experimentador o que no l'havien rebut.

En global, els resultats obtinguts a l'Experiment VII semblen indicar que l'estimulació del FPM administrada per l'experimentador tindria els mateixos efectes que un tractament autoadministrat, malgrat puguin presentar certes diferències en les regions cerebrals activades. Per tant, ambdós models d'administració els podem considerar vàlids com a base per a dissenyar les condicions i paràmetres de noves eines terapèutiques a la clínica d'humans i, així mateix, poder-ne estudiar els mecanismes subjacents.

Els treballs d'aquesta tesi doctoral ens han permès fer una aproximació a les condicions d'administració de l'AEIC en la rata com una forma de potenciar l'aprenentatge i la memòria, aportant un valor translacional per poder usar-lo en la recerca de, per una part,

les condicions d'aplicació de la DBS a la clínica d'humans, i per l'altra, dels mecanismes neurofisiològics implicats en l'efecte facilitador. A més a més, els presents resultats permeten proposar el FPM com a una possible diana d'estimulació, efectiva per facilitar la memòria també en humans.

Responent al principal objectiu plantejat en aquesta tesi, considerem que el fet d'haver demostrat efectes facilitadors de la memòria amb estimulació d'ona quadrada i aplicant el tractament de forma remota a més d'autoadministrat augmenta el valor translacional del model de recerca bàsica de facilitació de la memòria mitjançant AEIC, en la rata. Malgrat que el tractament de llarga durada no ha mostrat efectes en la memòria, sí que els ha tingut a nivell d'aprenentatge i de neurogènesi a l'hipocamp, indicant que incideix en el substrat neural de la memòria i que caldria ajustar el procediment per poder trobar efectes positius del tractament.

La principal limitació d'aquesta tesi doctoral creiem que ha estat l'ajustament del nivell de dificultat de les tasques a la capacitat dels subjectes per resoldre-les. Per la tasca de DVS al LAM vam fer un disseny de 5 sessions amb 6 assaigs cadascuna. En una tasca espacial hauria estat suficient o excessiva mentre que per la tasca de DVS va resultar insuficient per veure efectes del tractament en l'aprenentatge. A l'Experiment VI, per tal de reduir el risc d'un efecte *sostre* augmentant la durada del tractament i sessions d'entrenament vam disminuir el nombre d'assaigs per sessió resultant també massa difícil, mentre que a l'Experiment VII vam trobar un efecte *sostre* aplicant una tasca espacial al LAM amb 5 sessions de 6 assaigs cadascuna. Per altra banda, el model de tractament distribuït al llarg del dia i intercalat amb l'entrenament no va semblar adequat per traslladar-lo a la clínica d'humans, ja que semblava produir un nivell d'activació cerebral massa elevat que interferiria en l'aprenentatge i seria contraproductiu.

Tot i així, els presents resultats donen suport a la idea que el feix prosencefàlic medial a nivell de l'hipotàlem lateral podria ser un nou *target* vàlid per administrar la DBS a la clínica d'humans per a potenciar la memòria o pal·liar el seu dèficit no només en malalties neurodegeneratives com la malaltia d'Alzheimer, sinó també en altres afectacions que causen dificultats d'aprenentatge i/o memòria.



## **VI. CONCLUSIONS**

---



Els resultats obtinguts en aquesta tesi doctoral donen suport a la hipòtesi del nostre grup de recerca referent a la capacitat de l'AEIC per potenciar l'aprenentatge i la memòria. Els resultats permeten ampliar els coneixements sobre les condicions d'aplicació de l'estimulació del sistema nerviós del reforç —específicament del feix prosencefàlic medial—, com un tractament altament eficaç per a millorar aquestes capacitats cognitives.

Les principals conclusions que deriven del conjunt d'experiments d'aquest treball són:

1. L'AEIC amb ona quadrada —de baixa freqüència i polsos de llarga durada— s'ha mostrat efectiva per facilitar la retenció d'una tasca de discriminació visual simultània.
2. L'administració de l'AEIC no contingent amb l'entrenament no ha facilitat l'aprenentatge i la memòria. Els paràmetres i quantitats d'estimulació podrien ser una variable crítica a l'hora de dissenyar models d'estimulació més intensius.
3. L'AEIC ha accelerat l'aprenentatge d'una tasca espacial en condicions de molt baix entrenament i alta dificultat.
4. L'autoadministració de l'estimulació del FPM no és una variable crítica per a facilitar l'aprenentatge i la retenció d'una tasca espacial.
5. Una situació de demanda cognitiva —com sotmetre els animals a un laberint de Morris— pot potenciar la supervivència de noves neurones al gir dentat. A més, l'administració d'un tractament d'AEIC de llarga durada sembla haver facilitat la integració funcional de les neurones supervivents.

En conjunt, aquests resultats donen peu a seguir utilitzant el model animal de facilitació de la memòria mitjançant AEIC del FPM per estudiar tant les condicions d'administració com els mecanismes implicats en l'efecte facilitador, i donen suport a considerar el FPM com a una nova diana en l'administració de la DBS en humans per tractar trastorns relacionats amb l'aprenentatge i la memòria.



## VII. BIBLIOGRAFIA

---





1. Olds, J., & Milner, P. (1954). Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, *47*(6), 419–427. doi:10.1037/h0058775
2. Wise, R. A. (1996). Neurobiology of addiction. *Current Opinion in Neurobiology*, *6*(2), 243–251. doi:10.1016/S0959-4388(96)80079-1
3. Coulombe, D., & White, N. (1980). The effect of post-training lateral hypothalamic self-stimulation on aversive and appetitive classical conditioning. *Physiology & Behavior*, *25*(2), 267–272. doi:10.1016/0031-9384(80)90215-2
4. Coulombe, D., & White, N. (1982). Posttraining self-stimulation and memory: A study of some parameters. *Physiological Psychology*, *10*(3), 343–349. doi:10.3758/BF03332962
5. Redolar-Ripoll, D., Soriano-Mas, C., Guillazo-Blanch, G., Aldavert-Vera, L., Segura-Torres, P., & Morgado-Bernal, I. (2003). Posttraining intracranial self-stimulation ameliorates the detrimental effects of parafascicular thalamic lesions on active avoidance in young and aged rats. *Behavioral Neuroscience*, *117*(2), 246. doi:10.1037/0735-7044.117.2.246
6. Ruiz-Medina, J., Redolar-Ripoll, D., Morgado-Bernal, I., Aldavert-Vera, L., & Segura-Torres, P. (2008). Intracranial self-stimulation improves memory consolidation in rats with little training. *Neurobiology of Learning and Memory*, *89*(4), 574–581. doi:10.1016/j.nlm.2007.11.005
7. Soriano-Mas, C., Redolar-Ripoll, D., Aldavert-Vera, L., Morgado-Bernal, I., & Segura-Torres, P. (2005). Post-training intracranial self-stimulation facilitates a hippocampus-dependent task. *Behavioural Brain Research*, *160*(1), 141–147. doi:10.1016/J.BBR.2004.11.025
8. Ramkumar, K., Srikumar, B. N., Shankaranarayana Rao, B. S., & Raju, T. R. (2008). Self-stimulation rewarding experience restores stress-induced CA3 dendritic atrophy, spatial memory deficits and alterations in the levels of neurotransmitters in the hippocampus. *Neurochemical Research*, *33*(9), 1651–1662. doi:10.1007/s11064-007-9511-x
9. Ruiz-Medina, J., Morgado-Bernal, I., Redolar-Ripoll, D., Aldavert-Vera, L., & Segura-Torres, P. (2008). Intracranial self-stimulation facilitates a spatial learning and memory task in the Morris water maze. *Neuroscience*, *154*(2), 424–430. doi:10.1016/J.NEUROSCIENCE.2008.03.059
10. Chamorro López, J. (2012). *Potenciación del aprendizaje y la memoria por autoestimulación eléctrica intracraneal en ratas: cambios morfológicos en neuronas hipocámpales*. (Tesi doctoral). Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona. Retrieved from <https://ddd.uab.cat/record/127430>
11. Chamorro-López, J., Miguéns, M., Morgado-Bernal, I., Kastanauskaite, A., Selvas, A., Cabané-Cucurella, A., ... & Segura-Torres, P. (2015). Structural Plasticity in Hippocampal Cells Related to the Facilitative Effect of Intracranial Self-Stimulation on a Spatial Memory Task. *Behavioral neuroscience*, *129*(6), 720–730. doi:10.1037/bne0000098
12. Segura-Torres, P., Aldavert-Vera, L., Gatell-Segura, A., Redolar-Ripoll, D., & Morgado-Bernal, I. (2010). Intracranial self-stimulation recovers learning and memory capacity in basolateral amygdala-damaged rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, *93*(1), 117–126. doi:10.1016/j.nlm.2009.09.001

## Bibliografia

13. Kádár, E., Ramoneda, M., Aldavert-Vera, L., Huguet, G., Morgado-Bernal, I., & Segura-Torres, P. (2014). Rewarding brain stimulation reverses the disruptive effect of amygdala damage on emotional learning. *Behavioural Brain Research*, 274, 43–52. doi:10.1016/j.bbr.2014.07.050
14. Klepitskaya, O., Liu, Y., Sharma, S., Sillau, S. H., Tsai, J., & Walters, A. S. (2018). Deep brain stimulation improves restless legs syndrome in patients with Parkinson disease. *Neurology*, 10-1212. doi:10.1212/WNL.00000000000006162
15. Sturm, V., Lenartz, D., Koulousakis, A., Treuer, H., Herholz, K., Klein, J. C., & Klosterkötter, J. (2003). The nucleus accumbens: a target for deep brain stimulation in obsessive-compulsive- and anxiety-disorders. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 26(4), 293–299. doi:10.1016/J.JCHEMNEU.2003.09.003
16. Azimi, A., Parvaresh, M., Shahidi, G., Habibi, A., Rohani, S., Safdarian, M., ... & Rohani, M. (2018). Anteromedial GPi deep brain stimulation in Tourette syndrome: The first case series from Iran. *Clinical neurology and neurosurgery*, 172, 116–119. doi:10.1016/j.clineuro.2018.06.045
17. Bewernick, B. H., Kayser, S., Sturm, V., & Schlaepfer, T. E. (2012). Long-term effects of nucleus accumbens deep brain stimulation in treatment-resistant depression: evidence for sustained efficacy. *Neuropsychopharmacology*, 37(9), 1975–1985. doi:10.1038/npp.2012.44
18. Kennedy, S. H., Giacobbe, P., Rizvi, S. J., Placenza, F. M., Nishikawa, Y., Mayberg, H. S., & Lozano, A. M. (2011). Deep brain stimulation for treatment-resistant depression: follow-up after 3 to 6 years. *American Journal of Psychiatry*, 168(5), 502–510. doi:10.1176/appi.ajp.2010.10081187
19. Velasques, B., Diniz, C., Teixeira, S., Cartier, C., Peressutti, C., Silva, F., ... & Ribeiro, P. (2014). Deep brain stimulation: a new treatment in mood and anxiety disorders. *CNS & neurological disorders drug targets*, 13(6), 961–971.
20. Lipsman, N., Lam, E., Volpini, M., Sutandar, K., Twose, R., Giacobbe, P., ... Lozano, A. M. (2017). Deep brain stimulation of the subcallosal cingulate for treatment-refractory anorexia nervosa: 1 year follow-up of an open-label trial. *The Lancet Psychiatry*, 4(4), 285–294. doi:10.1016/S2215-0366(17)30076-7
21. Laxton, A. W., Tang-Wai, D. F., McAndrews, M. P., Zumsteg, D., Wennberg, R., Keren, R., ... & Lozano, A. M. (2010). A phase I trial of deep brain stimulation of memory circuits in Alzheimer's disease. *Annals of Neurology*, 68(4), 521–534. doi:10.1002/ana.22089
22. Smith, G. S., Laxton, A. W., Tang-Wai, D. F., McAndrews, M. P., Diaconescu, A. O., Workman, C. I., & Lozano, A. M. (2012). Increased cerebral metabolism after 1 year of deep brain stimulation in Alzheimer disease. *Archives of Neurology*, 69(9), 1141–1148. doi:10.1001/archneurol.2012.590
23. Lozano, A. M., Fossdick, L., Chakravarty, M. M., Leoutsakos, J. M., Munro, C., Oh, E., ... & Smith, G. S. (2016). A Phase II Study of Fornix Deep Brain Stimulation in Mild Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 54(2), 777–787. doi:10.3233/JAD-160017
24. Sahin, M., & Tie, Y. (2007). Non-rectangular waveforms for neural stimulation with practical electrodes. *Journal of neural engineering*, 4(3), 227–233. doi:10.1088/1741-2560/4/3/008

25. Ruiz Medina, J. (2008). *Facilitación del aprendizaje y la memoria de una tarea de referencia espacial en el Laberinto Acuático de Morris por autoestimulación eléctrica intracraneal, en ratas Wistar*. (Tesi doctoral). Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona. Retrieved from <https://ddd.uab.cat/record/37593>
26. Lee, J. E., Jeong, D. U., Lee, J., Chang, W. S., & Chang, J. W. (2016). The effect of nucleus basalis magnocellularis deep brain stimulation on memory function in a rat model of dementia. *BMC Neurology*, *16*(1), 1–9. doi:10.1186/s12883-016-0529-z
27. García-Brito, S., Morgado-Bernal, I., Biosca-Simon, N., & Segura-Torres, P. (2017). Intracranial self-stimulation also facilitates learning in a visual discrimination task in the Morris water maze in rats. *Behavioural Brain Research*, *317*, 360–366. doi:10.1016/j.bbr.2016.09.069
28. Jeong, D. U., Lee, J., Chang, W. S., & Chang, J. W. (2017). Identifying the appropriate time for deep brain stimulation to achieve spatial memory improvement on the Morris water maze. *BMC Neuroscience*, *18*(1), 1–11. doi:10.1186/s12868-017-0345-4
29. Hescham, S., Temel, Y., Schipper, S., Lagiere, M., Schönfeld, L.-M., Blokland, A., & Jahanshahi, A. (2017). Fornix deep brain stimulation induced long-term spatial memory independent of hippocampal neurogenesis. *Brain Structure & Function*, *222*(2), 1069–1075. doi:10.1007/s00429-016-1188-y
30. Hescham, S., Lim, L. W., Jahanshahi, A., Steinbusch, H. W. M., Prickaerts, J., Blokland, A., & Temel, Y. (2013). Deep brain stimulation of the fornix area enhances memory functions in experimental dementia: the role of stimulation parameters. *Brain stimulation*, *6*(1), 72–77. doi:10.1016/j.brs.2012.01.008
31. Kempermann, G., & Gage, F. H. (2002). Genetic determinants of adult hippocampal neurogenesis correlate with acquisition, but not probe trial performance, in the water maze task. *European Journal of Neuroscience*, *16*(1), 129–136. doi:10.1046/j.1460-9568.2002.02042.x
32. Drapeau, E., Mayo, W., Arousseau, C., Le Moal, M., Piazza, P. V., & Abrous, D. N. (2003). Spatial memory performances of aged rats in the water maze predict levels of hippocampal neurogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(24), 14385–90. doi:10.1073/pnas.2334169100
33. Snyder, J. S., Radik, R., Wojtowicz, J. M., & Cameron, H. A. (2009). Anatomical gradients of adult neurogenesis and activity: Young neurons in the ventral dentate gyrus are activated by water maze training. *Hippocampus*, *19*(4), 360–370. doi:10.1002/hipo.20525
34. Takahashi, T., Zhu, Y., Hata, T., Shimizu-Okabe, C., Suzuki, K., & Nakahara, D. (2009). Intracranial self-stimulation enhances neurogenesis in hippocampus of adult mice and rats. *Neuroscience*, *158*(2), 402–411. doi:10.1016/j.neuroscience.2008.10.048
35. Huguet, G., Aldavert-Vera, L., Kádár, E., Peña de Ortiz, S., Morgado-Bernal, I., & Segura-Torres, P. (2009). Intracranial self-stimulation to the lateral hypothalamus, a memory improving treatment, results in hippocampal changes in gene expression. *Neuroscience*, *162*(2), 359–374. doi:10.1016/j.neuroscience.2009.04.074
36. White, N., & Major, R. (1978). Facilitation of retention by self-stimulation and by experimenter-administered stimulation. *Canadian Journal of Psychology/Revue canadienne de psychologie*, *32*(2), 116. doi:10.1037/h0081671
37. Shankaranarayana Rao, B. S., Raju, T. R., & Meti, B. L. (1998). Alterations in the density of excrescences in CA3 neurons of hippocampus in rats subjected to self-stimulation experience. *Brain Research*, *804*(2), 320–324. doi:10.1016/S0006-8993(98)00684-2

## Bibliografía

38. Aldavert-Vera, L., Huguet, G., Costa-Miserachs, D., Ortiz, S. P. de, Kádár, E., Morgado-Bernal, I., & Segura-Torres, P. (2013). Intracranial self-stimulation facilitates active-avoidance retention and induces expression of c-Fos and Nurr1 in rat brain memory systems. *Behavioural Brain Research*, *250*, 46–57. doi:10.1016/j.bbr.2013.04.025
39. Kádár, E., Vico-Varela, E., Aldavert-Vera, L., Huguet, G., Morgado-Bernal, I., & Segura-Torres, P. (2016). Increase in c-Fos and Arc protein in retrosplenial cortex after memory-improving lateral hypothalamic electrical stimulation treatment. *Neurobiology of Learning and Memory*, *128*, 117–124. doi:10.1016/j.nlm.2015.12.012
40. Wise, R. (1996). Addictive Drugs and brain stimulation reward. *Annual Reviews of Neuroscience*, *19*(3), 19–40.
41. de la Fuente-Fernandez, R., Phillips, A. G., Zamburlini, M., Sossi, V., Calne, D. B., Ruth, T. J., & Stoessl, A. J. (2002). Dopamine release in human ventral striatum and expectation of reward. *Behavioural brain research*, *136*(2), 359–363.
42. Yoder, K. K., Morris, E. D., Constantinescu, C. C., Cheng, T. E., Normandin, M. D., O'Connor, S. J., & Kareken, D. A. (2009). When what you see isn't what you get: Alcohol cues, alcohol administration, prediction error, and human striatal dopamine. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, *33*(1), 139–149. doi:10.1111/j.1530-0277.2008.00821.x
43. Schultz, W. (1998). Predictive reward signal of dopamine neurons. *Journal of neurophysiology*, *80*(1), 1–27. doi:10.1152/jn.1998.80.1.1
44. Schultz, W., & Dickinson, A. (2000). Neuronal coding of prediction errors. *Annual review of neuroscience*, *23*, 473–500. doi:10.1146/annurev.neuro.23.1.473
45. Schultz, W. (2016). Dopamine reward prediction error coding. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, *18*(1), 23–32.  
Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4826767/>
46. Schultz, W. (2017). Reward prediction error. *Current biology : CB*, *27*(10), R369–R371. doi:10.1016/j.cub.2017.02.064
47. Wise, R. A., & Rompre, P. P. (1989). Brain dopamine and reward. *Annual review of psychology*, *40*, 191–225. doi:10.1146/annurev.ps.40.020189.001203
48. Routtenberg, A., & Lindy, J. (1965). Effects of the availability of rewarding septal and hypothalamic stimulation on bar pressing for food under conditions of deprivation. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*. *60*(2), 158. doi:10.1037/h0022365
49. Olds, J. (1958). Self-Stimulation of the Brain: its use to study local effects of hunger, sex, and drugs. *Science*, *127*(3294), 315–324.
50. Rolls, E. T. (1975). *Brain and reward*. Pergamon Press, Oxford.
51. Bishop, M. P., Elder, S. T., & Heath, R. G. (1963). Intracranial self-stimulation in man. *Science*, *140*(3565), 394–396.
52. Olds, J. (1956). Pleasure Centers in the Brain. *Scientific American*, *195*(4), 105.
53. Anand, B. K., & Brobeck, J. R. (1951). Localization of a “feeding center” in the hypothalamus of the rat. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, *77*(2), 323–324.

54. Montemurro, D. G., & Stevenson, J. A. (1957). Adipsia produced by hypothalamic lesions in the rat. *Canadian journal of biochemistry and physiology*, 35(1), 31–37.
55. Delgado, J. M. R., & Anand, B. K. (1953). Increase of food intake induced by electrical stimulation of the lateral hypothalamus. *The American journal of physiology*, 172(1), 162–168.
56. Hoebel, B. G., & Teitelbaum, P. (1962). Hypothalamic control of feeding and self-stimulation. *Science*, 135(3501), 375–377.
57. Margules, D. L., & Olds, J. (1962). Identical “feeding” and “rewarding” systems in the lateral hypothalamus of rats. *Science*, 135(3501), 374–375.
58. Easterling, K. W., Plovnick, R. M., & Holtzman, S. G. (2000). Acute opioid but not benzodiazepine dependence in rats responding for intracranial self-stimulation. *Psychopharmacology*, 148(3), 263–71. doi:<http://dx.doi.org/10.1007/s002130050050>
59. Vlachou, S., & Markou, A. (2011). Intracranial self-stimulation. In M.C. Olmstead (Ed.), *Neuromethods: Vol. 53. Animal models of drug addiction*. (pp. 3–56). Totowa, NJ, US: Humana Press. doi:10.1007/978-1-60761-934-5\_1
60. Bauer, C. T., Banks, M. L., Blough, B. E., & Negus, S. S. (2013). Use of intracranial self-stimulation to evaluate abuse-related and abuse-limiting effects of monoamine releasers in rats. *British journal of pharmacology*, 168(4), 850–862. doi:10.1111/j.1476-5381.2012.02214.x
61. Negus, S. S., & Miller, L. L. (2014). Intracranial Self-Stimulation to Evaluate Abuse Potential of Drugs. *Pharmacological Reviews*, 66(3), 869–917. doi:10.1124/pr.112.007419
62. Grauer, E., & Thomas, E. (1982). Conditioned suppression of medial forebrain bundle and septal intracranial self-stimulation in the rat: evidence for a fear-relief mechanism of the septum. *Journal of comparative and physiological psychology*, 96(1), 61–70.
63. Nielsen, C. K., Arnt, J., & Sanchez, C. (2000). Intracranial self-stimulation and sucrose intake differ as hedonic measures following chronic mild stress: interstrain and interindividual differences. *Behavioural brain research*, 107(1–2), 21–33.
64. Aldavert-Vera, L., Costa-Miserachs, D., Massanés-Rotger, E., Soriano-Mas, C., Segura-Torres, P., & Morgado-Bernal, I. (1997). Facilitation of a Distributed Shuttle-Box Conditioning with Posttraining Intracranial Self-Stimulation in Old Rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, 67(3), 254–258. doi:10.1006/nlme.1997.3760
65. Milner, P. M. (1991). Brain-stimulation reward: A review. *Canadian Journal of Psychology/Revue canadienne de psychologie*, 45(1), 1. doi:10.1037/h0084275
66. Phillips, A. G., & Fibiger, H. C. (1989). Neuroanatomical bases of intracranial self-stimulation: Untangling the Gordian knot. In J. M. Liebman & S. J. Cooper (Eds.), *Topics in experimental psychopharmacology, 1. The neuropharmacological basis of reward*. (pp. 66–105). New York, NY, US: Clarendon Press/Oxford University Press.
67. Robertson, A. (1989). Multiple reward systems and the prefrontal cortex. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 13(2), 163–170. doi:10.1016/S0149-7634(89)80026-0
68. Nieuwenhuys, R., Geeraedts, L. M., & Veening, J. G. (2018). The medial forebrain bundle of the rat. I. General introduction. *Journal of Comparative Neurology*, 206(1), 49–81. doi:10.1002/cne.902060106

## Bibliografia

69. Fuxe, K., Agnati, L. F., Kalia, M., Goldstein, M., Anderson, K., & Harstrand, A. (1985). Dopaminergic systems in the brain and pituitary. *Basic and Clinical Aspects of Neuroscience*, 11–25.
70. Stellar, J., & Stellar, E. (1985). *The Neurobiology of Motivation and Reward*. New York: Springer-Verlag. doi:10.1007/978-1-4615-8032-4
71. Rompre, P. P., & Miliaressis, E. (1985). Pontine and mesencephalic substrates of self-stimulation. *Brain research*, 359(1–2), 246–259.
72. Yeomans, J. S. (1990). *Principles of brain stimulation*. New York: Oxford University Press.
73. Ikemoto, S., & Panksepp, J. (1999). The role of nucleus accumbens dopamine in motivated behavior: a unifying interpretation with special reference to reward-seeking. *Brain research. Brain research reviews*, 31(1), 6–41.
74. Kim, K. M., Baratta, M. V., Yang, A., Lee, D., Boyden, E. S., & Fiorillo, C. D. (2012). Optogenetic mimicry of the transient activation of dopamine neurons by natural reward is sufficient for operant reinforcement. *PLoS ONE*, 7(4), 1–8. doi:10.1371/journal.pone.0033612
75. Kempadoo, K. A., Tourino, C., Cho, S. L., Magnani, F., Leininger, G. M., Stuber, G. D., ... & Bonci, A. (2013). Hypothalamic Neurotensin Projections Promote Reward by Enhancing Glutamate Transmission in the VTA. *Journal of Neuroscience*, 33(18), 7618–7626. doi:10.1523/JNEUROSCI.2588-12.2013
76. Jennings, J. H., Ung, R. L., Resendez, S. L., Stamatakis, A. M., Taylor, J. G., Huang, J., ... & Stuber, G. D. (2015). Visualizing hypothalamic network dynamics for appetitive and consummatory behaviors. *Cell*, 160(3), 516–527. doi:10.1016/j.cell.2014.12.026
77. Jennings, J. H., Rizzi, G., Stamatakis, A. M., Ung, R. L., & Stuber, G. D. (2013). The inhibitory circuit architecture of the lateral hypothalamus orchestrates feeding. *Science*, 341(6153), 1517–1521. doi:10.1126/science.1241812
78. Nakahara, D., Nakamura, M., Furukawa, H., & Furuno, N. (2000). Intracranial self-stimulation increases differentially in vivo hydroxylation of tyrosine but similarly in vivo hydroxylation of tryptophan in rat medial prefrontal cortex, nucleus accumbens and striatum. *Brain research*, 864(1), 124–129.
79. Pillolla, G., Melis, M., Perra, S., Muntoni, A. L., Gessa, G. L., & Pistis, M. (2007). Medial forebrain bundle stimulation evokes endocannabinoid-mediated modulation of ventral tegmental area dopamine neuron firing in vivo. *Psychopharmacology*, 191(3), 843–853. doi:10.1007/s00213-007-0733-z
80. Cossette, M. P., Conover, K., & Shizgal, P. (2016). The neural substrates for the rewarding and dopamine-releasing effects of medial forebrain bundle stimulation have partially discrepant frequency responses. *Behavioural brain research*, 297, 345–358. doi:10.1016/j.bbr.2015.10.029
81. Klanker, M., Feenstra, M., Willuhn, I., & Denys, D. (2017). Deep brain stimulation of the medial forebrain bundle elevates striatal dopamine concentration without affecting spontaneous or reward-induced phasic release. *Neuroscience*, 364, 82–92. doi:10.1016/j.neuroscience.2017.09.012
82. Corbett, D., & Wise, R. A. (1980). Intracranial self-stimulation in relation to the ascending dopaminergic systems of the midbrain: a moveable electrode mapping study. *Brain research*, 185(1), 1–15.

83. Phillips, A. G., Coury, A., Fiorino, D., LePiane, F. G., Brown, E., & Fibiger, H. C. (1992). Self-Stimulation of the Ventral Tegmental Area Enhances Dopamine Release in the Nucleus Accumbens: A Microdialysis Study. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *654*(1), 199–206. doi:10.1111/j.1749-6632.1992.tb25968.x
84. Hernandez, L., & Hoebel, B. G. (1988). Feeding and hypothalamic stimulation increase dopamine turnover in the accumbens. *Physiology & behavior*, *44*(4–5), 599–606.
85. Steinberg, E. E., Boivin, J. R., Saunders, B. T., Witten, I. B., Deisseroth, K., & Janak, P. H. (2014). Positive Reinforcement Mediated by Midbrain Dopamine Neurons Requires D1 and D2 Receptor Activation in the Nucleus Accumbens. *PLoS ONE*, *9*(4), e94771. doi:10.1371/journal.pone.0094771
86. Steidl, S., O’Sullivan, S., Pilat, D., Bubula, N., Brown, J., & Vezina, P. (2017). Operant responding for optogenetic excitation of LDTg inputs to the VTA requires D1 and D2 dopamine receptor activation in the NAcc. *Behavioural brain research*, *333*, 161–170. doi:10.1016/j.bbr.2017.06.045
87. Singh, J., Desiraju, T., & Raju, T. R. (1997). Dopamine receptor sub-types involvement in nucleus accumbens and ventral tegmentum but not in medial prefrontal cortex: on self-stimulation of lateral hypothalamus and ventral mesencephalon. *Behavioural brain research*, *86*(2), 171–179.
88. Nakajima, S., & McKenzie, G. M. (1986). Reduction of the rewarding effect of brain stimulation by a blockade of dopamine D1 receptor with SCH 23390. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, *24*(4), 919–923.
89. Wise, R. A. (1978). Neuroleptic attenuation of intracranial self-stimulation: Reward or performance deficits? *Life Sciences*, *22*(7), 535–542. doi:10.1016/0024-3205(78)90331-4
90. Wise, R. A. (1982). Neuroleptics and operant behavior: The anhedonia hypothesis. *Behavioral and Brain Sciences*, *5*(1), 39–53. doi:10.1017/S0140525X00010372
91. Wise, R. A., Spindler, J., deWit, H., & Gerberg, G. J. (1978). Neuroleptic-induced “anhedonia” in rats: pimozide blocks reward quality of food. *Science*, *201*(4352), 262–264.
92. Di Chiara, G. (1998). A motivational learning hypothesis of the role of mesolimbic dopamine in compulsive drug use. *Journal of psychopharmacology*, *12*(1), 54–67. doi:10.1177/026988119801200108
93. LeSage, M. G., Stafford, D., & Glowa, J. R. (1999). Preclinical research on cocaine self-administration: environmental determinants and their interaction with pharmacological treatment. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, *23*(5), 717–741.
94. Morgan, D., Grant, K. A., Gage, H. D., Mach, R. H., Kaplan, J. R., Prioleau, O., ... & Nader, M. A. (2002). Social dominance in monkeys: dopamine D2 receptors and cocaine self-administration. *Nature neuroscience*, *5*(2), 169–174. doi:10.1038/nn798
95. Schultz, W. (2007). Multiple dopamine functions at different time courses. *Annual review of neuroscience*, *30*, 259–288. doi:10.1146/annurev.neuro.28.061604.135722
96. Schultz, W. (2010). Dopamine signals for reward value and risk: basic and recent data. *Behavioral and brain functions*, *6*(1), 24. doi:10.1186/1744-9081-6-24



## Bibliografia

97. Hollerman, J. R., & Schultz, W. (1998). Dopamine neurons report an error in the temporal prediction of reward during learning. *Nature neuroscience*, *1*(4), 304–309. doi:10.1038/1124
98. Bayer, H. M., & Glimcher, P. W. (2005). Midbrain Dopamine Neurons Encode a Quantitative Reward Prediction Error Signal. *Neuron*, *47*(1), 129–141. doi:10.1016/j.neuron.2005.05.020
99. Nakahara, H., Itoh, H., Kawagoe, R., Takikawa, Y., & Hikosaka, O. (2004). Dopamine neurons can represent context-dependent prediction error. *Neuron*, *41*(2), 269–280.
100. Tobler, P. N., Fiorillo, C. D., & Schultz, W. (2005). Adaptive Coding of Reward Value by Dopamine Neurons. *Science*, *307*(5715), 1642–1645. doi:10.1126/science.1105370.
101. Zaghoul, K. A., Blanco, J. A., Weidemann, C. T., McGill, K., Jaggi, J. L., Baltuch, G. H., & Kahana, M. J. (2009). Human substantia nigra neurons encode unexpected financial rewards. *Science*, *323*(5920), 1496–1499. doi:10.1126/science.1167342
102. Beshpalov, A., & Zvartau, E. (1997). NMDA receptor antagonists prevent conditioned activation of intracranial self-stimulation in rats. *European journal of pharmacology*, *326*(2–3), 109–112. doi:10.1016/s0014-2999(97)85403-9
103. Cervo, L., & Samanin, R. (1995). Effects of dopaminergic and glutamatergic receptor antagonists on the acquisition and expression of cocaine conditioning place preference. *Brain Research*, *673*(2), 242–250. doi:10.1016/0006-8993(94)01420-M
104. Segal, D. S., Kuczenski, R., & Florin, S. M. (1995). Does dizocilpine (MK-801) selectively block the enhanced responsiveness to repeated amphetamine administration? *Behavioral neuroscience*, *109*(3), 532–546.
105. Tzschentke, T. M., & Schmidt, W. J. (1995). N-methyl-D-aspartic acid-receptor antagonists block morphine-induced conditioned place preference in rats. *Neuroscience letters*, *193*(1), 37–40.
106. You, Z. B., Chen, Y. Q., & Wise, R. . (2001). Dopamine and glutamate release in the nucleus accumbens and ventral tegmental area of rat following lateral hypothalamic self-stimulation. *Neuroscience*, *107*(4), 629–639. doi:10.1016/S0306-4522(01)00379-7
107. Lassen, M. B., Brown, J. E., Stobbs, S. H., Gunderson, S. H., Maes, L., Valenzuela, C. F., ... & Steffensen, S. C. (2007). Brain stimulation reward is integrated by a network of electrically coupled GABA neurons. *Brain research*, *1156*, 46–58. doi:10.1016/j.brainres.2007.04.053
108. Steffensen, S. C., Lee, R. S., Stobbs, S. H., & Henriksen, S. J. (2001). Responses of ventral tegmental area GABA neurons to brain stimulation reward. *Brain research*, *906*(1–2), 190–197. doi:10.1016/s0006-8993(01)02581-1
109. Nakahara, D., Ishida, Y., Nakamura, M., Furuno, N., & Nishimori, T. (2001). Intracranial self-stimulation induces Fos expression in GABAergic neurons in the rat mesopontine tegmentum. *Neuroscience*, *106*(3), 633–641. doi:10.1016/S0306-4522(01)00298-6
110. Yasushi, I., Masato, N., Kosuke, E., Kaeko, H., Hiroyuki, H., Yoshio, M., ... & Daiichiro, N. (2001). Immunohistochemical characterisation of Fos-positive cells in brainstem monoaminergic nuclei following intracranial self-stimulation of the medial forebrain bundle in the rat. *European Journal of Neuroscience*, *13*(8), 1600–1608. doi:10.1046/j.0953-816x.2001.01520.x

111. Steffensen, S. C., Svingos, A. L., Pickel, V. M., & Henriksen, S. J. (1998). Electrophysiological characterization of GABAergic neurons in the ventral tegmental area. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, *18*(19), 8003–8015.
112. Yeomans, J. S., Mathur, A., & Tampakeras, M. (1993). Rewarding brain stimulation: role of tegmental cholinergic neurons that activate dopamine neurons. *Behavioral neuroscience*, *107*(6), 1077–1087.
113. Rada, P. V., Mark, G. P., Yeomans, J. J., & Hoebel, B. G. (2000). Acetylcholine release in ventral tegmental area by hypothalamic self-stimulation, eating, and drinking. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, *65*(3), 375–379.
114. Sagara, H., Kitamura, Y., Yae, T., Shibata, K., Suemaru, K., Sendo, T., ... & Gomita, Y. (2008). Nicotinic acetylcholine  $\alpha 4\beta 2$  receptor regulates the motivational effect of intracranial self stimulation behavior in the runway method. *Journal of Pharmacological Sciences*, *108*(4), 455–461. doi:10.1254/jphs.08168FP
115. Yeomans, J., & Baptista, M. (1997). Both Nicotinic and Muscarinic Receptors in Ventral Tegmental Area Contribute to Brain-Stimulation Reward. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *57*(4), 915–921. doi:10.1016/S0091-3057(96)00467-4
116. Singh, J., Desiraju, T., & Raju, T. R. (1997). Cholinergic and GABAergic Modulation of Self-Stimulation of Lateral Hypothalamus and Ventral Tegmentum: Effects of Carbachol, Atropine, Bicuculline, and Picrotoxin. *Physiology & Behavior*, *61*(3), 411–418. doi:10.1016/S0031-9384(96)00452-0
117. Peyron, C., Tighe, D. K., van den Pol, A. N., de Lecea, L., Heller, H. C., Sutcliffe, J. G., & Kilduff, T. S. (1998). Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *Journal of neuroscience*, *18*(23), 9996–10015.
118. Nambu, T., Sakurai, T., Mizukami, K., Hosoya, Y., Yanagisawa, M., & Goto, K. (1999). Distribution of orexin neurons in the adult rat brain. *Brain research*, *827*(1–2), 243–260.
119. Korotkova, T. M., Sergeeva, O. A., Eriksson, K. S., Haas, H. L., & Brown, R. E. (2003). Excitation of ventral tegmental area dopaminergic and nondopaminergic neurons by orexins/hypocretins. *Journal of neuroscience*, *23*(1), 7–11.
120. Hata, T., Chen, J., Ebihara, K., Date, Y., Ishida, Y., & Nakahara, D. (2011). Intra-ventral tegmental area or intracerebroventricular orexin-A increases the intra-cranial self-stimulation threshold via activation of the corticotropin-releasing factor system in rats. *The European journal of neuroscience*, *34*(5), 816–826. doi:10.1111/j.1460-9568.2011.07808.x
121. Riday, T. T., Fish, E. W., Robinson, J. E., Jarrett, T. M., McGuigan, M. M., & Malanga, C. J. (2012). Orexin-1 receptor antagonism does not reduce the rewarding potency of cocaine in Swiss-Webster mice. *Brain research*, *1431*, 53–61. doi:10.1016/j.brainres.2011.11.003
122. Hollander, J. A., Lu, Q., Cameron, M. D., Kamenecka, T. M., & Kenny, P. J. (2008). Insular hypocretin transmission regulates nicotine reward. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(49), 19480–19485. doi:10.1073/pnas.0808023105
123. Muschamp, J. W., Hollander, J. A., Thompson, J. L., Voren, G., Hassinger, L. C., Onvani, S., ... & Carlezon, W. A. J. (2014). Hypocretin (orexin) facilitates reward by attenuating the antireward effects of its cotransmitter dynorphin in ventral tegmental area.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(16), 1648-1655. doi:10.1073/pnas.1315542111
124. Phillips, A. G., & LePiane, F. G. (1982). Reward produced by microinjection of (d-Ala<sup>2</sup>),Met<sup>5</sup>-enkephalinamide into the ventral tegmental area. *Behavioural Brain Research*, 5(2), 225–229. doi:10.1016/0166-4328(82)90057-2
  125. Phillips, A. G., & LePiane, F. G. (1980). Reinforcing effects of morphine microinjection into the ventral tegmental area. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 12(6), 965–968. doi:10.1016/0091-3057(80)90460-8
  126. Altarifi, A. A., & Negus, S. S. (2011). Some determinants of morphine effects on intracranial self-stimulation in rats: dose, pretreatment time, repeated treatment, and rate dependence. *Behavioural pharmacology*, 22(7), 663–673. doi:10.1097/FBP.0b013e32834aff54
  127. Izenwasser, S., & Kornetsky, C. (1989). The effect of amfonelic acid or nisoxetine in combination with morphine on brain-stimulation reward. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 32(4), 983–986. doi:10.1016/0091-3057(89)90070-1
  128. Wise, R. A. (1989). Opiate reward: sites and substrates. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 13(2–3), 129–133.
  129. Routtenberg, A. (1975). Intracranial self-stimulation pathways as substrate for memory consolidation. *Nebraska Symposium on Motivation. Nebraska Symposium on Motivation*, 22, 161–182.
  130. Routtenberg, A. (1979). Participation of brain stimulation reward substrates in memory: anatomical and biochemical evidence. *Federation proceedings*, 38(11), 2446–2453.
  131. Routtenberg, A. (1974). Intracranial self-stimulation pathways as substrate for memory consolidation. *Nebraska Symposium on Motivation*, 22 16, 1–182.
  132. Segura-Torres, P., Capdevila-Ortiz, L., Martí-Nicolovius, M., & Morgado-Bernal, I. (1988). Improvement of shuttle-box learning with pre- and post-trial intracranial self-stimulation in rats. *Behavioural brain research*, 29(1–2), 111–117.
  133. Redolar-Ripoll, D., Aldavert-Vera, L., Soriano-Mas, C., Segura-Torres, P., & Morgado-Bernal, I. (2002). Intracranial self-stimulation facilitates memory consolidation, but not retrieval: its effects are more effective than increased training. *Behavioural Brain Research*, 129(1–2), 65–75. doi:10.1016/S0166-4328(01)00325-4
  134. Huston, J. P., & Mueller, C. C. (1978). Enhanced passive avoidance learning and appetitive T-maze learning with post-trial rewarding hypothalamic stimulation. *Brain research bulletin*, 3(3), 265–270.
  135. Huston, J. P., Mueller, C. C., & Mondadori, C. (1977). Memory facilitation by posttrial hypothalamic stimulation and other reinforcers: A central theory of reinforcement. *Biobehavioral Reviews*, 1(3), 143–150. doi:10.1016/0147-7552(77)90003-1
  136. Soriano-Mas, C., Redolar-Ripoll, D., Guillazo-Blanch, G., Morgado-Bernal, I., & Segura-Torres, P. (2007). Intracranial self-stimulation after memory reactivation: Immediate and late effects. *Brain Research Bulletin*, 74(1–3), 51–57. doi:10.1016/j.brainresbull.2007.05.003
  137. Massanés-Rotger, E., Aldavert-Vera, L., Segura-Torres, P., Martí-Nicolovius, M., & Morgado-Bernal, I. (1998). Involvement of the parafascicular nucleus in the facilitative

- effect of intracranial self-stimulation on active avoidance in rats. *Brain Research*, 808(2), 220–231. doi:10.1016/S0006-8993(98)00845-2
138. Vorhees, C. V., & Williams, M. T. (2006). Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nature protocols*, 1(2), 848–858. doi:10.1038/nprot.2006.116
  139. Stemper, B., Beric, A., Welsch, G., Haendl, T., Sterio, D., & Hiltz, M. J. (2006). Deep brain stimulation improves orthostatic regulation of patients with Parkinson disease. *Neurology*, 67(10), 1781–1785. doi:10.1212/01.wnl.0000244416.30605.f1
  140. Li, D., Cao, C., Zhang, J., Zhan, S., Chen, S., & Sun, B. (2013). Subthalamic nucleus deep brain stimulation for Parkinson's disease: 8 years of follow-up. *Translational neurodegeneration*, 2(1), 11. doi:10.1186/2047-9158-2-11
  141. Hardesty, D. E., & Sackeim, H. A. (2007). Deep brain stimulation in movement and psychiatric disorders. *Biological psychiatry*, 61(7), 831–835. doi:10.1016/j.biopsych.2006.08.028
  142. Magown, P., Andrade, R. A., Soroceanu, A., & Kiss, Z. H. T. (2018). Deep brain stimulation parameters for dystonia: A systematic review. *Parkinsonism & related disorders*. doi:10.1016/j.parkreldis.2018.04.017
  143. Lilly, J. C., Hughes, J. R., Alvord, E. C. J., & Galkin, T. W. (1955). Brief, noninjurious electric waveform for stimulation of the brain. *Science*, 121(3144), 468–469.
  144. Phillips, A. G., & Fibiger, H. C. (1973). Substantia nigra: Self-stimulation and poststimulation feeding. *Physiological Psychology*, 1(3), 233–236. doi:10.3758/BF03326911
  145. Foutz, T. J., & McIntyre, C. C. (2010). Evaluation of novel stimulus waveforms for deep brain stimulation. *Journal of neural engineering*, 7(6), 66008. doi:10.1088/1741-2560/7/6/066008
  146. Grill, W. M. J., & Mortimer, J. T. (1996). The effect of stimulus pulse duration on selectivity of neural stimulation. *IEEE transactions on bio-medical engineering*, 43(2), 161–166. doi:10.1109/10.481985
  147. Montero-Pastor, A., Vale-Martínez, A., Guillazo-Blanch, G., Nadal-Alemany, R., Martí-Nicolovius, M., & Morgado-Bernal, I. (2001). Nucleus basalis magnocellularis electrical stimulation facilitates two-way active avoidance retention, in rats. *Brain Research*, 900(2), 337–341. doi:10.1016/S0006-8993(01)02325-3
  148. Giacomán, S. (2011). *Efectes de l'antagonista oreginèrgic SB-334867 sobre la conducta d'autoestimulació elèctrica intracranial* (Treball de Màster). Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona.
  149. Mondadori, C., Ornstein, K., Waser, P. G., & Huston, J. P. (1976). Post-trial reinforcing hypothalamic stimulation can facilitate avoidance learning. *Neuroscience Letters*, 2(4), 183–187. doi:10.1016/0304-3940(76)90012-4
  150. Segura-Torres, P., Portell-Cortés, I., & Morgado-Bernal, I. (1991). Improvement of shuttle-box avoidance with post-training intracranial self-stimulation, in rats: a parametric study. *Behavioural Brain Research*, 42(2), 161–167. doi:10.1016/S0166-4328(05)80007-5

## Bibliografia

151. Segura-Torres, P. (1989). *Paràmetres crítics en la facilitació d'un aprenentatge d'evitació activa per estimulació elèctrica intracranial reforçant, en rates* (Tesi doctoral). Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona.
152. Yoganarasimha, D., Shankaranarayana Rao, B. S., Raju, T. R., & Meti, B. L. (1998). Facilitation of acquisition and performance of operant and spatial learning tasks in self-stimulation experienced rats. *Behavioral Neuroscience*, *112*(3), 725. doi:10.1037/0735-7044.112.3.725
153. Destrade, C., & Jaffard, R. (1978). Post-trial hippocampal and lateral hypothalamic electrical stimulation: Facilitation on long-term memory of appetitive and avoidance learning tasks. *Behavioral Biology*, *22*(3), 354–374. doi:10.1016/S0091-6773(78)92441-0
154. Hamani, C., Dubiela, F. P., Soares, J. C. K., Shin, D., Bittencourt, S., Covolan, L., ... & Oliveira, M. G. M. (2010). Anterior thalamus deep brain stimulation at high current impairs memory in rats. *Experimental neurology*, *225*(1), 154–162. doi:10.1016/j.expneurol.2010.06.007
155. Lee, D. J., Gurkoff, G. G., Izadi, A., Seidl, S. E., Echeverri, A., Melnik, M., ... & Shahlaie, K. (2015). Septohippocampal Neuromodulation Improves Cognition after Traumatic Brain Injury. *Journal of neurotrauma*, *32*(22), 1822–1832. doi:10.1089/neu.2014.3744
156. Mann, A., Gondard, E., Tampellini, D., Milsted, J. A. T., Marillac, D., Hamani, C., ... & Lozano, A. M. (2018). Chronic deep brain stimulation in an Alzheimer's disease mouse model enhances memory and reduces pathological hallmarks. *Brain Stimulation: Basic, Translational, and Clinical Research in Neuromodulation*, *11*(2), 435–444. doi:10.1016/j.brs.2017.11.012
157. Xia, F., Yiu, A., Stone, S. S. D., Oh, S., Lozano, A. M., Josselyn, S. A., & Frankland, P. W. (2017). Entorhinal Cortical Deep Brain Stimulation Rescues Memory Deficits in Both Young and Old Mice Genetically Engineered to Model Alzheimer's Disease. *Neuropsychopharmacology*, *42*, 2493. doi:10.1038/npp.2017.100
158. Sweet, J. A., Eakin, K. C., Munyon, C. N., & Miller, J. P. (2014). Improved learning and memory with theta-burst stimulation of the fornix in rat model of traumatic brain injury. *Hippocampus*, *24*(12), 1592–1600. doi:10.1002/hipo.22338
159. Geddes, L. A. (1987). Optimal stimulus duration for extracranial cortical stimulation. *Neurosurgery*, *20*(1), 94–99.
160. Ranck, J. B. J. (1975). Which elements are excited in electrical stimulation of mammalian central nervous system: a review. *Brain research*, *98*(3), 417–440.
161. Weiner, R. D., Rogers, H. J., Davidson, J. R., & Kahn, E. M. (1986). Effects of electroconvulsive therapy upon brain electrical activity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *462*, 270–281.
162. Squire, L. R., & Zouzounis, J. A. (1986). ECT and memory: brief pulse versus sine wave. *The American journal of psychiatry*, *143*(5), 596–601. doi:10.1176/ajp.143.5.596
163. Sackeim, H. A., Prudic, J., Nobler, M. S., Fitzsimons, L., Lisanby, S. H., Payne, N., ... & Devanand, D. P. (2008). Effects of pulse width and electrode placement on the efficacy and cognitive effects of electroconvulsive therapy. *Brain stimulation*, *1*(2), 71–83. doi:10.1016/j.brs.2008.03.001

164. McGaugh, J. L., & Roozendaal, B. (2009). Drug enhancement of memory consolidation: historical perspective and neurobiological implications. *Psychopharmacology*, *202*(1–3), 3–14. doi:10.1007/s00213-008-1285-6
165. Serrano, N. (2014). *AEIC: efectos sobre la consolidación de la memoria y la neurogénesis en el GD (Treball de màster)*. Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona.
166. Major, R., & White, N. (1978). Memory facilitation by self-stimulation reinforcement mediated by the nigro-neostriatal bundle. *Physiology & Behavior*, *20*(6), 723–733. doi:10.1016/0031-9384(78)90298-6
167. Segura-Torres, P., Wagner, U., Massanes-Rotger, E., Aldavert-Vera, L., Marti-Nicolovius, M., & Morgado-Bernal, I. (1996). Tuberomammillary nucleus lesion facilitates two-way active avoidance retention in rats. *Behavioural Brain Research*, *82*(1), 113–117. doi:10.1016/S0166-4328(97)81114-X
168. Velley, L., Manciet, G., & Cardo, B. (1978). Effects of early electrical stimulation of the lateral hypothalamus on the delayed acquisition of approach and avoidance learning tasks in the rat. *Behavioural Processes*, *3*(4), 317–324. doi:10.1016/0376-6357(78)90004-9
169. Velley, L., & Cardo, B. (1979). Long-term improvement of learning after early electrical stimulation of some central nervous structures: Is the effect structure and age-dependent? *Brain Research Bulletin*, *4*(4), 459–466. doi:10.1016/0361-9230(79)90029-7
170. Ramkumar, K., Srikumar, B. N., Venkatasubramanian, D., Siva, R., Shankaranarayana Rao, B. S., & Raju, T. R. (2012). Reversal of stress-induced dendritic atrophy in the prefrontal cortex by intracranial self-stimulation. *Journal of Neural Transmission*, *119*(5), 533–543. doi:10.1007/s00702-011-0740-4
171. Rao, B. S., Desiraju, T., & Raju, T. R. (1993). Neuronal plasticity induced by self-stimulation rewarding experience in rats—a study on alteration in dendritic branching in pyramidal neurons of hippocampus and motor cortex. *Brain research*, *627*(2), 216–224.
172. Bindu, P. N., & Desiraju, T. (1990). Increase of dendritic branching of CA3 neurons of hippocampus and self-stimulation areas in subjects experiencing self-stimulation of lateral hypothalamus and substantia nigra-ventral tegmental area. *Brain research*, *527*(1), 171–175.
173. Shankaranarayana Rao, B. S., Raju, T. R., & Meti, B. L. (1999). Self-stimulation rewarding experience induced alterations in dendritic spine density in CA3 hippocampal and layer V motor cortical pyramidal neurons. *Neuroscience*, *89*(4), 1067–1077. doi:10.1016/S0306-4522(98)00394-7
174. Shankaranarayana Rao, B. S., Raju, T. R., & Meti, B. L. (1998). Long-lasting structural changes in CA3 hippocampal and layer V motor cortical pyramidal neurons associated with self-stimulation rewarding experience: A quantitative Golgi study. *Brain Research Bulletin*, *47*(1), 95–101. doi:10.1016/S0361-9230(98)00056-2
175. Marrocco, R. T., Witte, E. A., & Davidson, M. C. (1994). Arousal systems. *Current opinion in neurobiology*, *4*(2), 166–170.
176. White, N. M., & Milner, P. M. (1992). The psychobiology of reinforcers. *Annual review of psychology*, *43*, 443–471. doi:10.1146/annurev.ps.43.020192.002303
177. Bullitt, E. (1990). Expression of c-fos-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat. *The Journal of comparative neurology*, *296*(4),

## Bibliografia

- 517–530. doi:10.1002/cne.902960402
178. Kadar, E., Aldavert-Vera, L., Huguet, G., Costa-Miserachs, D., Morgado-Bernal, I., & Segura-Torres, P. (2011). Intracranial self-stimulation induces expression of learning and memory-related genes in rat amygdala. *Genes, Brain and Behavior*, *10*(1), 69–77. doi:10.1111/j.1601-183X.2010.00609.x
179. Arvanitogiannis, A., Flores, C., Pfaus, J. G., & Shizgal, P. (1996). Increased ipsilateral expression of Fos following lateral hypothalamic self-stimulation. *Brain research*, *720*(1–2), 148–154.
180. Arvanitogiannis, A., Waraczynski, M., & Shizgal, P. (1996). Effects of excitotoxic lesions of the basal forebrain on MFB self-stimulation. *Physiology & behavior*, *59*(4–5), 795–806.
181. Flores, C., Arvanitogiannis, A., & Shizgal, P. (1997). Fos-like immunoreactivity in forebrain regions following self-stimulation of the lateral hypothalamus and the ventral tegmental area. *Behavioural brain research*, *87*(2), 239–251.
182. Hunt, G. E., & McGregor, I. S. (1998). Rewarding brain stimulation induces only sparse Fos-like immunoreactivity in dopaminergic neurons. *Neuroscience*, *83*(2), 501–515.
183. Arvanitogiannis, A., Tzschentke, T. M., Riscaldino, L., Wise, R. A., & Shizgal, P. (2000). Fos expression following self-stimulation of the medial prefrontal cortex. *Behavioural brain research*, *107*(1–2), 123–132.
184. Tzingounis, A. V., & Nicoll, R. A. (2006). Arc/Arg3.1: linking gene expression to synaptic plasticity and memory. *Neuron*, *52*(3), 403–407. doi:10.1016/j.neuron.2006.10.016
185. Kadar, E., Huguet, G., Aldavert-Vera, L., Morgado-Bernal, I., & Segura-Torres, P. (2013). Intracranial self stimulation upregulates the expression of synaptic plasticity related genes and Arc protein expression in rat hippocampus. *Genes, brain, and behavior*, *12*(8), 771–779. doi:10.1111/gbb.12065
186. Mahajan, D. S., & Desiraju, T. (1988). Alterations of dendritic branching and spine densities of hippocampal CA3 pyramidal neurons induced by operant conditioning in the phase of brain growth spurt. *Experimental neurology*, *100*(1), 1–15.
187. Rao, B. S., Desiraju, T., Meti, B. L., & Raju, T. R. (1994). Plasticity of hippocampal and motor cortical pyramidal neurons induced by self-stimulation experience. *Indian journal of physiology and pharmacology*, *38*(1), 23–28.
188. Huguet, G., Tapias-Espinosa, C., Aldavert-Vera, L., Kádár, E., & Segura-Torres, P. (2017). Electrical brain stimulation at rewarding areas for improving extinction and mossy fiber synaptogenesis. *Brain Stimulation: Basic, Translational, and Clinical Research in Neuromodulation*, *10*(2), 452–453. doi:10.1016/j.brs.2017.01.329
189. Stone, S. S. D., Teixeira, C. M., Devito, L. M., Zaslavsky, K., Josselyn, S. A., Lozano, A. M., & Frankland, P. W. (2011). Stimulation of entorhinal cortex promotes adult neurogenesis and facilitates spatial memory. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, *31*(38), 13469–13484. doi:10.1523/JNEUROSCI.3100-11.2011
190. Toda, H., Hamani, C., Fawcett, A. P., Hutchison, W. D., & Lozano, A. M. (2008). The regulation of adult rodent hippocampal neurogenesis by deep brain stimulation. *Journal of Neurosurgery*, *108*(1), 132–138. doi:10.3171/JNS/2008/108/01/0132
191. Encinas, J. M., Hamani, C., Lozano, A. M., & Enikolopov, G. (2011). Neurogenic

- Hippocampal Targets of Deep Brain Stimulation. *The Journal of comparative neurology*, 519(1), 6–20. doi:10.1002/cne.22503
192. Chamaa, F., Sweidan, W., Nahas, Z., Saade, N., & Abou-Kheir, W. (2016). Thalamic Stimulation in Awake Rats Induces Neurogenesis in the Hippocampal Formation. *Brain stimulation*, 9(1), 101–108. doi:10.1016/j.brs.2015.09.006
  193. Jeong, D. U., Lee, J. E., Lee, S. E., Chang, W. S., Kim, S. J., & Chang, J. W. (2014). Improvements in memory after medial septum stimulation are associated with changes in hippocampal cholinergic activity and neurogenesis. *BioMed research international*, 2014, 568587. doi:10.1155/2014/568587
  194. Lee, E., & Son, H. (2009). Adult hippocampal neurogenesis and related neurotrophic factors. *BMB reports*, 42(5), 239–244.
  195. Benabid, A. L., Pollak, P., Gervason, C., Hoffmann, D., Gao, D. M., Hommel, M., ... & de Rougemont, J. (1991). Long-term suppression of tremor by chronic stimulation of the ventral intermediate thalamic nucleus. *Lancet*, 337(8738), 403–406.
  196. Perlmutter, J. S., & Mink, J. W. (2006). Deep brain stimulation. *Annual review of neuroscience*, 29, 229–257. doi:10.1146/annurev.neuro.29.051605.112824
  197. Lozano, A. M., & Lipsman, N. (2013). Probing and Regulating Dysfunctional Circuits Using Deep Brain Stimulation. *Neuron*, 77(3), 406–424. doi:10.1016/j.neuron.2013.01.020
  198. Huang, C., Chu, H., Zhang, Y., & Wang, X. (2018). Deep Brain Stimulation to Alleviate Freezing of Gait and Cognitive Dysfunction in Parkinson's Disease: Update on Current Research and Future Perspectives. *Frontiers in Neuroscience*, 12, 29. doi:10.3389/fnins.2018.00029
  199. Scangos, K. W., Carter, C. S., Gurkoff, G., Zhang, L., & Shahlaie, K. (2018). A pilot study of subthalamic theta frequency deep brain stimulation for cognitive dysfunction in Parkinson's disease. *Brain stimulation: Basic, Translational, and Clinical Research in Neuromodulation*, 11(2), 456–458. doi:10.1016/j.brs.2017.11.014
  200. Grubert, C., Hurlmann, R., Bewernick, B. H., Kayser, S., Hadrysiewicz, B., Axmacher, N., ... & Schlaepfer, T. E. (2011). Neuropsychological safety of nucleus accumbens deep brain stimulation for major depression: effects of 12-month stimulation. *The world journal of biological psychiatry*, 12(7), 516–527. doi:10.3109/15622975.2011.583940
  201. Alzheimer's Association (2011). 2011 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association*, 7(2), 208–244. doi:10.1016/j.jalz.2011.02.004
  202. Fontaine, D., Deudon, A., Lemaire, J. J., Razzouk, M., Viau, P., Darcourt, J., & Robert, P. (2013). Symptomatic treatment of memory decline in Alzheimer's disease by deep brain stimulation: a feasibility study. *Journal of Alzheimer's disease*, 34(1), 315–323. doi:10.3233/JAD-121579
  203. Hamani, C., McAndrews, M. P., Cohn, M., Oh, M., Zumsteg, D., Shapiro, C. M., ... & Lozano, A.M. (2008). Memory enhancement induced by hypothalamic/fornix deep brain stimulation. *Annals of Neurology*, 63(1), 119–123. doi:10.1002/ana.21295
  204. Suthana, N., Haneef, Z., Stern, J., Mukamel, R., Behnke, E., Knowlton, B., & Fried, I. (2012). Memory Enhancement and Deep-Brain Stimulation of the Entorhinal Area. *New England Journal of Medicine*, 366(6), 502–510. doi:10.1056/NEJMoa1107212



## Bibliografia

205. Freund, H. J., Kuhn, J., Lenartz, D., Mai, J., Schnell, T., Klosterkoetter, J., & Sturm, V. (2009). Cognitive functions in a patient with parkinson-dementia syndrome undergoing deep-brain stimulation. *Archives of neurology*, *66*(6), 781–785. doi:10.1001/archneurol.2009.102
206. Turnbull, I. M., McGeer, P. L., Beattie, L., Calne, D., & Pate, B. (1985). Stimulation of the basal nucleus of Meynert in senile dementia of Alzheimer's type. A preliminary report. *Applied neurophysiology*, *48*(1–6), 216–221.
207. Schlaepfer, T. E., George, M. S., & Mayberg, H. (2010). WFSBP Guidelines on Brain Stimulation Treatments in Psychiatry. *The world journal of biological psychiatry: the official journal of the World Federation of Societies of Biological Psychiatry*, *11*(1), 2–18. doi:10.3109/15622970903170835
208. Schlaepfer, T. E., & Lieb, K. (2005). Deep brain stimulation for treatment of refractory depression. *The Lancet*, *366*(9495), 1420–1422. doi:10.1016/S0140-6736(05)67582-4
209. Bewernick, B. H., Hurlmann, R., Matusch, A., Kayser, S., Grubert, C., Hadrysiewicz, B., ... & Schlaepfer, T. E. (2010). Nucleus accumbens deep brain stimulation decreases ratings of depression and anxiety in treatment-resistant depression. *Biological psychiatry*, *67*(2), 110–116. doi:10.1016/j.biopsych.2009.09.013
210. Malone, D. A. J., Dougherty, D. D., Rezai, A. R., Carpenter, L. L., Friehs, G. M., Eskandar, E. N., ... & Greenberg, B. D. (2009). Deep brain stimulation of the ventral capsule/ventral striatum for treatment-resistant depression. *Biological psychiatry*, *65*(4), 267–275. doi:10.1016/j.biopsych.2008.08.029
211. Lozano, A. M., Giacobbe, P., Hamani, C., Rizvi, S. J., Kennedy, S. H., Kolivakis, T. T., ... & Mayberg, H. S. (2012). A multicenter pilot study of subcallosal cingulate area deep brain stimulation for treatment-resistant depression. *Journal of neurosurgery*, *116*(2), 315–322. doi:10.3171/2011.10.JNS102122
212. Anderson, R. J., Frye, M. A., Abulseoud, O. A., Lee, K. H., McGillivray, J. A., Berk, M., & Tye, S. J. (2012). Deep brain stimulation for treatment-resistant depression: efficacy, safety and mechanisms of action. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, *36*(8), 1920–1933. doi:10.1016/j.neubiorev.2012.06.001
213. Vassoler, F. M., Schmidt, H. D., Gerard, M. E., Famous, K. R., Ciraulo, D. A., Kornetsky, C., ... & Pierce, R. C. (2008). Deep brain stimulation of the nucleus accumbens shell attenuates cocaine priming-induced reinstatement of drug seeking in rats. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, *28*(35), 8735–8739. doi:10.1523/JNEUROSCI.5277-07.2008
214. Kuhn, J., Möller, M., Treppmann, J. F., Bartsch, C., Lenartz, D., Gruendler, T. O. J., ... & Sturm, V. (2013). Deep brain stimulation of the nucleus accumbens and its usefulness in severe opioid addiction. *Molecular Psychiatry*, *19*, 145. doi:10.1038/mp.2012.196
215. Voges, J., Muller, U., Bogerts, B., Munte, T., & Heinze, H. J. (2013). Deep brain stimulation surgery for alcohol addiction. *World neurosurgery*, *80*(3–4), S28.e21-31. doi:10.1016/j.wneu.2012.07.011
216. Pauls, D. L., Abramovitch, A., Rauch, S. L., & Geller, D. A. (2014). Obsessive-compulsive disorder: an integrative genetic and neurobiological perspective. *Nature reviews. Neuroscience*, *15*(6), 410–424. doi:10.1038/nrn3746
217. Figeo, M., de Koning, P., Klaassen, S., Vulink, N., Mantione, M., van den Munckhof, P., ... & Denys, D. (2014). Deep brain stimulation induces striatal dopamine release in obsessive-compulsive disorder. *Biological psychiatry*, *75*(8), 647–652.

doi:10.1016/j.biopsych.2013.06.021

218. Figeo, M., Luigjes, J., Smolders, R., Valencia-Alfonso, C. E., van Wingen, G., de Kwaasteniet, B., ... & Denys, D. (2013). Deep brain stimulation restores frontostriatal network activity in obsessive-compulsive disorder. *Nature neuroscience*, *16*(4), 386–387. doi:10.1038/nn.3344
219. Denys, D., Mantione, M., Figeo, M., van den Munckhof, P., Koerselman, F., Westenberg, H., ... & Schuurman, R. (2010). Deep brain stimulation of the nucleus accumbens for treatment-refractory obsessive-compulsive disorder. *Archives of general psychiatry*, *67*(10), 1061–1068. doi:10.1001/archgenpsychiatry.2010.122
220. Greenberg, B. D., Gabriels, L. A., Malone, D. A. J., Rezai, A. R., Friehs, G. M., Okun, M. S., ... & Nuttin, B. J. (2010). Deep brain stimulation of the ventral internal capsule/ventral striatum for obsessive-compulsive disorder: worldwide experience. *Molecular psychiatry*, *15*(1), 64–79. doi:10.1038/mp.2008.55
221. Mallet, L., Polosan, M., Jaafari, N., Baup, N., Welter, M.-L., Fontaine, D., ... & Pelissolo, A. (2008). Subthalamic nucleus stimulation in severe obsessive-compulsive disorder. *The New England journal of medicine*, *359*(20), 2121–2134. doi:10.1056/NEJMoa0708514
222. Torres-Sanchez, S., Perez-Caballero, L., Mico, J. A., Celada, P., & Berrocoso, E. (2018). Effect of Deep Brain Stimulation of the ventromedial prefrontal cortex on the noradrenergic system in rats. *Brain stimulation*, *11*(1), 222–230. doi:10.1016/j.brs.2017.10.003
223. Moshe, H., Gal, R., Barnea-Ygael, N., Gulevsky, T., Alyagon, U., & Zangen, A. (2016). Prelimbic Stimulation Ameliorates Depressive-Like Behaviors and Increases Regional BDNF Expression in a Novel Drug-Resistant Animal Model of Depression. *Brain stimulation*, *9*(2), 243–250. doi:10.1016/j.brs.2015.10.009
224. Zhou, Q., Dong, J., Xu, T., & Cai, X. (2017). Synaptic potentiation mediated by L-type voltage-dependent calcium channels mediates the antidepressive effects of lateral habenula stimulation. *Neuroscience*, *362*, 25–32. doi:10.1016/j.neuroscience.2017.08.025
225. Millet, B., Jaafari, N., Polosan, M., Baup, N., Giordana, B., Haegelen, C., ... & Reymann, J. M. (2014). Limbic versus cognitive target for deep brain stimulation in treatment-resistant depression: accumbens more promising than caudate. *European neuropsychopharmacology: the journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, *24*(8), 1229–1239. doi:10.1016/j.euroneuro.2014.05.006
226. Friedman, A., Frankel, M., Flaumenhaft, Y., Merenlender, A., Pinhasov, A., Feder, Y., ... & Yadid, G. (2009). Programmed acute electrical stimulation of ventral tegmental area alleviates depressive-like behavior. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, *34*(4), 1057–1066. doi:10.1038/npp.2008.177
227. Conen, S., Matthews, J. C., Patel, N. K., Anton-Rodriguez, J., & Talbot, P. S. (2018). Acute and chronic changes in brain activity with deep brain stimulation for refractory depression. *Journal of psychopharmacology*, *32*(4), 430–440. doi:10.1177/0269881117742668
228. Schlaepfer, T. E., Bewernick, B. H., Kayser, S., Madler, B., & Coenen, V. A. (2013). Rapid effects of deep brain stimulation for treatment-resistant major depression. *Biological psychiatry*, *73*(12), 1204–1212. doi:10.1016/j.biopsych.2013.01.034

## Bibliografia

229. Russo, S. J., & Nestler, E. J. (2013). The brain reward circuitry in mood disorders. *Nature reviews. Neuroscience*, 14(9), 609–625. doi:10.1038/nrn3381
230. Park, R. J., Scaife, J. C., & Aziz, T. Z. (2018). Study Protocol: Using Deep-Brain Stimulation, Multimodal Neuroimaging and Neuroethics to Understand and Treat Severe Enduring Anorexia Nervosa. *Frontiers in psychiatry*, 9, 24. doi:10.3389/fpsy.2018.00024
231. Tulving, E., & Markowitsch, H. J. (1998). Episodic and declarative memory: role of the hippocampus. *Hippocampus*, 8(3), 198–204.
232. Maguire, E. A., Burgess, N., Donnett, J. G., Frackowiak, R. S., Frith, C. D., & O'Keefe, J. (1998). Knowing where and getting there: a human navigation network. *Science*, 280(5365), 921–924.
233. Clayton, N. S., & Dickinson, A. (1998). Episodic-like memory during cache recovery by scrub jays. *Nature*, 395(6699), 272–274. doi:10.1038/26216
234. Dere, E., Huston, J. P., & De Souza Silva, M. A. (2007). The pharmacology, neuroanatomy and neurogenetics of one-trial object recognition in rodents. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 31(5), 673–704. doi:10.1016/j.neubiorev.2007.01.005
235. Ennaceur, A. (2010). One-trial object recognition in rats and mice: methodological and theoretical issues. *Behavioural brain research*, 215(2), 244–254. doi:10.1016/j.bbr.2009.12.036
236. Eichenbaum, H. (2000). A cortical-hippocampal system for declarative memory. *Nature reviews. Neuroscience*, 1(1), 41–50. doi:10.1038/35036213
237. Deweer, B., Ergis, A. M., Fossati, P., Pillon, B., Boller, F., Agid, Y., & Dubois, B. (1994). Explicit memory, procedural learning and lexical priming in Alzheimer's disease. *Cortex; a journal devoted to the study of the nervous system and behavior*, 30(1), 113–126.
238. Tromp, D., Dufour, A., Lithfous, S., Pebayle, T., & Despres, O. (2015). Episodic memory in normal aging and Alzheimer disease: Insights from imaging and behavioral studies. *Ageing research reviews*, 24, 232–262. doi:10.1016/j.arr.2015.08.006
239. Economou, A., Routsis, C., & Papageorgiou, S. G. (2016). Episodic Memory in Alzheimer Disease, Frontotemporal Dementia, and Dementia With Lewy Bodies/Parkinson Disease Dementia: Disentangling Retrieval From Consolidation. *Alzheimer disease and associated disorders*, 30(1), 47–52. doi:10.1097/WAD.0000000000000089
240. Moreau, N., Viallet, F., & Champagne-Lavau, M. (2013). Using memories to understand others: the role of episodic memory in theory of mind impairment in Alzheimer disease. *Ageing research reviews*, 12(4), 833–839. doi:10.1016/j.arr.2013.06.005
241. Tounsi, H., Deweer, B., Ergis, A. M., Van der Linden, M., Pillon, B., Michon, A., & Dubois, B. (1999). Sensitivity to semantic cuing: an index of episodic memory dysfunction in early Alzheimer disease. *Alzheimer disease and associated disorders*, 13(1), 38–46.
242. Prados, J., & Trobalon, J. B. (1998). Locating an invisible goal in a water maze requires at least two landmarks. *Psychobiology*, 26(1), 42–48. doi:10.3758/BF03330589
243. Rodrigo, T., Chamizo, V. D., McLaren, I. P. L., & Mackintosh, N. J. (1997). Blocking in the spatial domain. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, 23(1), 110. doi:10.1037/0097-7403.23.1.110

244. Terry AV Jr. (2009). Spatial Navigation (Water Maze) Tasks. In J. J. Buccafusco (Ed.), *Frontiers in neuroscience. Methods of Behavior Analysis in Neuroscience* (pp. 267-280). Boca Raton, FL, US: CRS Press. doi:10.1097/YPG.0b013e3282f60320
245. Morris, R. (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of neuroscience methods*, 11(1), 47–60.
246. Morris, R. G. M. (1981). Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learning and Motivation*. doi:10.1016/0023-9690(81)90020-5
247. Dieter, S. E. (1977). Preexposure to situational cues and shock intensity in two-way avoidance learning. *Animal Learning & Behavior*, 5(4), 403–406. doi:10.3758/BF03209587
248. Crabbe, J. C., Wahsten, D., & Dudek, B. C. (1999). Genetics of mouse behavior: interactions with laboratory environment. *Science*, 284(5420), 1670–1672.
249. Korz, V. (2006). Water maze swim path analysis based on tracking coordinates. *Behavior Research Methods*, 38(3), 522–528. doi:10.3758/BF03192807
250. Harris, A. P., D'Eath, R. B., & Healy, S. D. (2009). Environmental enrichment enhances spatial cognition in rats by reducing thigmotaxis (wall hugging) during testing. *Animal Behaviour*, 77(6), 1459–1464. doi:10.1016/j.anbehav.2009.02.019
251. Treit, D., & Fundytus, M. (1988). Thigmotaxis as a test for anxiolytic activity in rats. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 31(4), 959–962.
252. Whishaw, I. Q. (1995). A comparison of rats and mice in a swimming pool place task and matching to place task: Some surprising differences. *Physiology & Behavior*, 58(4), 687–693. doi:10.1016/0031-9384(95)00110-5
253. Brandeis, R., Brandys, Y., & Yehuda, S. (1989). The use of the Morris Water Maze in the study of memory and learning. *The International journal of neuroscience*, 48(1–2), 29–69.
254. Means, L. W., Alexander, S. R., & O'Neal, M. F. (1992). Those cheating rats: male and female rats use odor trails in a water-escape “working memory” task. *Behavioral and neural biology*, 58(2), 144–151.
255. Dalm, S., Grootendorst, J., De Kloet, E. R., & Oitzl, M. S. (2000). Quantification of swim patterns in the morris water maze. *Behavior Research Methods, Instruments, & Computers*, 32(1), 134–139. doi:10.3758/BF03200795
256. Rogers, J., Churilov, L., Hannan, A. J., & Renoir, T. (2017). Search strategy selection in the Morris water maze indicates allocentric map formation during learning that underpins spatial memory formation. *Neurobiology of learning and memory*, 139, 37–49. doi:10.1016/j.nlm.2016.12.007
257. Weitzner, D. S., Engler-Chiurazzi, E. B., Kotilinek, L. A., Ashe, K. H., & Reed, M. N. (2015). Morris Water Maze Test: Optimization for Mouse Strain and Testing Environment. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (100), 52706. doi:10.3791/52706
258. Poucet, B., Thinus-Blanc, C., & Muller, R. U. (1994). Place cells in the ventral hippocampus of rats. *Neuroreport*, 5(16), 2045–2048.
259. Thompson, L. T., & Best, P. J. (1989). Place cells and silent cells in the hippocampus of freely-behaving rats. *The Journal of neuroscience*, 9(7), 2382–2390.

## Bibliografia

260. O'Keefe, J., & Nadel, L. (1979). Précis of O'Keefe & Nadel's The hippocampus as a cognitive map. *Behavioral and Brain Sciences*, 2(4), 487-494.  
doi:10.1017/S0140525X00063949
261. Astur, R. S., Taylor, L. B., Mamelak, A. N., Philpott, L., & Sutherland, R. J. (2002). Humans with hippocampus damage display severe spatial memory impairments in a virtual Morris water task. *Behavioural brain research*, 132(1), 77-84.
262. Pearce, J. M., Roberts, A. D., & Good, M. (1998). Hippocampal lesions disrupt navigation based on cognitive maps but not heading vectors. *Nature*, 396(6706), 75-77.  
doi:10.1038/23941
263. de Bruin, J. P., Moita, M. P., de Brabander, H. M., & Joosten, R. N. (2001). Place and response learning of rats in a Morris water maze: differential effects of fimbria fornix and medial prefrontal cortex lesions. *Neurobiology of learning and memory*, 75(2), 164-178.  
doi:10.1006/nlme.2000.3962
264. Ploeger, G. E., Spruijt, B. M., & Cools, A. R. (1994). Spatial localization in the Morris water maze in rats: acquisition is affected by intra-accumbens injections of the dopaminergic antagonist haloperidol. *Behavioral neuroscience*, 108(5), 927-934.
265. D'Hooge, R., & De Deyn, P. P. (2001). Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain research reviews*, 36(1), 60-90.
266. Cook, D., & Kesner, R. P. (1988). Caudate nucleus and memory for egocentric localization. *Behavioral and neural biology*, 49(3), 332-343.
267. McNaughton, B. L., Barnes, C. A., Meltzer, J., & Sutherland, R. J. (1989). Hippocampal granule cells are necessary for normal spatial learning but not for spatially-selective pyramidal cell discharge. *Experimental brain research*, 76(3), 485-496.
268. Cressant, A., Muller, R. U., & Poucet, B. (1997). Failure of centrally placed objects to control the firing fields of hippocampal place cells. *The Journal of neuroscience*, 17(7), 2531-2542.
269. Mogensen, J., Pedersen, T. K., Holm, S., & Bang, L. E. (1995). Prefrontal cortical mediation of rats' place learning in a modified water maze. *Brain research bulletin*, 38(5), 425-434.
270. Granon, S., & Poucet, B. (1995). Medial prefrontal lesions in the rat and spatial navigation: evidence for impaired planning. *Behavioral neuroscience*, 109(3), 474-484.
271. Eichenbaum, H. (2009). *The Cognitive Neuroscience of Memory: An Introduction*. Oxford University Press. doi:10.1093/acprof:oso/9780195141740.001.0001
272. Hawkins, R. D., & Byrne, J. H. (2015). Associative Learning in Invertebrates. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(5), a021709. doi:10.1101/cshperspect.a021709
273. Thompson, R. F., & Krupa, D. J. (1994). Organization of memory traces in the mammalian brain. *Annual review of neuroscience*, 17, 519-549.  
doi:10.1146/annurev.ne.17.030194.002511
274. LeDoux, J. E. (1993). Emotional memory systems in the brain. *Behavioural Brain Research*, 58(1), 69-79. doi:10.1016/0166-4328(93)90091-4
275. Fleischman, D. A. (2007). Repetition priming in aging and Alzheimer's disease: an integrative review and future directions. *Cortex; a journal devoted to the study of the*

- nervous system and behavior*, 43(7), 889–897.
276. Fleischman, D. A., Wilson, R. S., Gabrieli, J. D. E., Schneider, J. A., Bienias, J. L., & Bennett, D. A. (2005). Implicit memory and Alzheimer's disease neuropathology. *Brain : a journal of neurology*, 128(9), 2006–2015. doi:10.1093/brain/awh559
  277. Gawrys, L., Szatkowska, I., Jamrozik, Z., Janik, P., Friedman, A., & Kaczmarek, L. (2008). Nonverbal deficits in explicit and implicit memory of Parkinson's disease patients. *Acta neurobiologiae experimentalis*, 68(1), 58–72.
  278. Gamble, K. R., Cummings Jr., T. J., Lo, S. E., Ghosh, P. T., Howard Jr., J. H., & Howard, D. V. (2014). Implicit sequence learning in people with Parkinson's disease. *Frontiers in Human Neuroscience*, 8, 563. doi:10.3389/fnhum.2014.00563
  279. Allain, H., Lieury, A., Thomas, V., Reymann, J. M., Gandon, J. M., & Belliard, S. (1995). Explicit and procedural memory in Parkinson's disease. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 49(4), 179–186. doi:10.1016/0753-3322(96)82618-7
  280. LeDoux, J. E. (2000). Emotion circuits in the brain. *Annual review of neuroscience*, 23, 155–184. doi:10.1146/annurev.neuro.23.1.155
  281. Olton, D. S., & Isaacson, R. L. (1968). Hippocampal lesions and active avoidance. *Physiology & Behavior*, 3(5), 719–724. doi:10.1016/0031-9384(68)90142-X
  282. Soriano Mas, C. (2003). *Facilitació de l'aprenentatge i la memòria per AEIC envelliment i memòria declarativa* (tesi doctoral). Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona. Retrieved from <https://ddd.uab.cat/record/37595?ln=ca&of=hm>
  283. Savonenko, A., Werka, T., Nikolaev, E., Zielinski, K., & Kaczmarek, L. (2003). Complex effects of NMDA receptor antagonist APV in the basolateral amygdala on acquisition of two-way avoidance reaction and long-term fear memory. *Learning & memory*, 10(4), 293–303. doi:10.1101/lm.58803
  284. Quillfeldt, J. A. (2016). Behavioral Methods to Study Learning and Memory in Rats. In M. L. Andersen & S. Tufik (Eds.), *Rodent Model as tools in Ethical Biomedical Research* (pp. 271-311). Springer, Cham. doi:10.1007/978-3-319-11578-8\_17
  285. LeDoux, J. E., Iwata, J., Cicchetti, P., & Reis, D. J. (1988). Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear. *The Journal of neuroscience*, 8(7), 2517–2529.
  286. Fanselow, M. S. (1994). Neural organization of the defensive behavior system responsible for fear. *Psychonomic bulletin & review*, 1(4), 429–438. doi:10.3758/BF03210947
  287. Maren, S. (2001). Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. *Annual review of neuroscience*, 24, 897–931. doi:10.1146/annurev.neuro.24.1.897
  288. McNally, G. P., Johansen, J. P., & Blair, H. T. (2011). Placing prediction into the fear circuit. *Trends in neurosciences*, 34(6), 283–292. doi:10.1016/j.tins.2011.03.005
  289. Cardinal, R. N., Parkinson, J. A., Hall, J., & Everitt, B. J. (2002). Emotion and motivation: the role of the amygdala, ventral striatum, and prefrontal cortex. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 26(3), 321–352.
  290. McAllister, W. R., McAllister, D. E., & Douglass, W. K. (1971). The inverse relationship between shock intensity and shuttle-box avoidance learning in rats: A reinforcement

- explanation. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 74(3), 426–433. doi:10.1037/h0030579
291. Amorapanth, P., Nader, K., & LeDoux, J. E. (1999). Lesions of periaqueductal gray dissociate-conditioned freezing from conditioned suppression behavior in rats. *Learning & memory*, 6(5), 491–499.
292. Choi, J. S., Cain, C. K., & LeDoux, J. E. (2010). The role of amygdala nuclei in the expression of auditory signaled two-way active avoidance in rats. *Learning & memory*, 17(3), 139–147. doi:10.1101/lm.1676610
293. Robbins, T. W., Cador, M., Taylor, J. R., & Everitt, B. J. (1989). Limbic-striatal interactions in reward-related processes. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 13(2–3), 155–162.
294. Viaud, M. D., & White, N. M. (1989). Dissociation of visual and olfactory conditioning in the neostriatum of rats. *Behavioural brain research*, 32(1), 31–42.
295. El Massioui, N., & Van Golf Racht-Delatour, B. (1997). Contrasting effects of central nucleus of the amygdala and dorsal striatum lesions on active avoidance learning and its contextual modification. *Neuroscience Research Communications*, 21(2), 103–111.
296. Prado-Alcalá, R. A., Cepeda, G., Verduzco, L., Jiménez, A., & Vargas-Ortega, E. (1984). Effects of cholinergic stimulation of the caudate nucleus on active avoidance. *Neuroscience Letters*, 51(1), 31–36. doi:10.1016/0304-3940(84)90258-1
297. White, N. M., & Viaud, M. (1991). Localized intracaudate dopamine D2 receptor activation during the post-training period improves memory for visual or olfactory conditioned emotional responses in rats. *Behavioral and neural biology*, 55(3), 255–269.
298. Ramirez, F., Moscarello, J. M., LeDoux, J. E., & Sears, R. M. (2015). Active Avoidance Requires a Serial Basal Amygdala to Nucleus Accumbens Shell Circuit. *The Journal of Neuroscience*, 35(8), 3470–3477. doi:10.1523/JNEUROSCI.1331-14.2015
299. Cain, C. K., & LeDoux, J. E. (2008). Brain mechanisms of Pavlovian and instrumental aversive conditioning. In R. J. Blanchard, D. C. Blanchard, G. Griebel, & D. J. Nutt (Eds.), *Handbook of Anxiety and Fear* (pp. 103–124). Elsevier. doi:10.1016/S1569-7339(07)00007-0
300. Lichtenberg, N. T., Kashtelyan, V., Burton, A. C., Bissonette, G. B., & Roesch, M. R. (2014). Nucleus accumbens core lesions enhance two-way active avoidance. *Neuroscience*, 258, 340–346. doi:10.1016/j.neuroscience.2013.11.028
301. Whishaw, I. Q., & Petrie, B. F. (1988). Cholinergic blockade in the rat impairs strategy selection but not learning and retention of nonspatial visual discrimination problems in a swimming pool. *Behavioral neuroscience*, 102(5), 662–677.
302. Selden, N. R., Cole, B. J., Everitt, B. J., & Robbins, T. W. (1990). Damage to ceruleo-cortical noradrenergic projections impairs locally cued but enhances spatially cued water maze acquisition. *Behavioural brain research*, 39(1), 29–51.
303. Packard, M. G., & McGaugh, J. L. (1992). Double dissociation of fornix and caudate nucleus lesions on acquisition of two water maze tasks: further evidence for multiple memory systems. *Behavioral neuroscience*, 106(3), 439–446.
304. Moreau, P. H., Tsenkina, Y., Lecourtier, L., Lopez, J., Cosquer, B., Wolff, M., ... Cassel, J. C. (2013). Lesions of the anterior thalamic nuclei and intralaminar thalamic nuclei: place

- and visual discrimination learning in the water maze. *Brain structure & function*, 218(3), 657–667. doi:10.1007/s00429-012-0419-0
305. Robinson, L., Bridge, H., & Riedel, G. (2001). Visual discrimination learning in the water maze: a novel test for visual acuity. *Behavioural brain research*, 119(1), 77–84.
306. Hyde, L. A., Stavnezer, A. J., Bimonte, H. A., Sherman, G. F., & Denenberg, V. H. (2002). Spatial and nonspatial Morris maze learning: impaired behavioral flexibility in mice with ectopias located in the prefrontal cortex. *Behavioural brain research*, 133(2), 247–259.
307. Kozak, R., Bruno, J. P., & Sarter, M. (2006). Augmented prefrontal acetylcholine release during challenged attentional performance. *Cerebral cortex*, 16(1), 9–17. doi:10.1093/cercor/bhi079
308. Berry, A. S., Blakely, R. D., Sarter, M., & Lustig, C. (2015). Cholinergic capacity mediates prefrontal engagement during challenges to attention: evidence from imaging genetics. *NeuroImage*, 108, 386–395. doi:10.1016/j.neuroimage.2014.12.036
309. Hagan, J. J., Tweedie, F., & Morris, R. G. (1986). Lack of task specificity and absence of posttraining effects of atropine on learning. *Behavioral neuroscience*, 100(4), 483–493.
310. Dotigny, F., Ben Amor, A. Y., Burke, M., & Vaucher, E. (2008). Neuromodulatory role of acetylcholine in visually-induced cortical activation: behavioral and neuroanatomical correlates. *Neuroscience*, 154(4), 1607–1618. doi:10.1016/j.neuroscience.2008.04.030
311. Hao, S., Tang, B., Wu, Z., Ure, K., Sun, Y., Tao, H., ... & Tang, J. (2015). Forniceal deep brain stimulation rescues hippocampal memory in Rett syndrome mice. *Nature*, 526(7573), 430–434. doi:10.1038/nature15694
312. Shirvalkar, P. R., Rapp, P. R., & Shapiro, M. L. (2010). Bidirectional changes to hippocampal theta-gamma comodulation predict memory for recent spatial episodes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(15), 7054–7059. doi:10.1073/pnas.0911184107
313. Kuncel, A. M., & Grill, W. M. (2004). Selection of stimulus parameters for deep brain stimulation. *Clinical Neurophysiology*, 115(11), 2431–2441. doi:10.1016/j.clinph.2004.05.031
314. Rizzone, M., Lanotte, M., Bergamasco, B., Tavella, A., Torre, E., Faccani, G., ... & Lopiano, L. (2001). Deep brain stimulation of the subthalamic nucleus in Parkinson's disease: effects of variation in stimulation parameters. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 71(2), 215–219.
315. Bregman, T., Reznikov, R., Diwan, M., Raymond, R., Butson, C. R., Nobrega, J. N., & Hamani, C. (2015). Antidepressant-like Effects of Medial Forebrain Bundle Deep Brain Stimulation in Rats are not Associated With Accumbens Dopamine Release. *Brain Stimulation*, 8(4), 708–713. doi:10.1016/j.brs.2015.02.007
316. Edemann-Callesen, H., Voget, M., Empl, L., Vogel, M., Wieske, F., Rummel, J., ... & Winter, C. (2015). Medial Forebrain Bundle Deep Brain Stimulation has Symptom-specific Anti-depressant Effects in Rats and as Opposed to Ventromedial Prefrontal Cortex Stimulation Interacts With the Reward System. *Brain stimulation*, 8(4), 714–723. doi:10.1016/j.brs.2015.02.009
317. Furlanetti, L. L., Coenen, V. A., Aranda, I. A., & Döbrössy, M. D. (2015). Chronic deep brain stimulation of the medial forebrain bundle reverses depressive-like behavior in a hemiparkinsonian rodent model. *Experimental Brain Research*, 233(11), 3073–3085.



## Bibliografia

doi:10.1007/s00221-015-4375-9

318. Furlanetti, L., Döbrössy, M., A. Aranda, I., & Coenen, V. (2015). *Feasibility and Safety of Continuous and Chronic Bilateral Deep Brain Stimulation of the Medial Forebrain Bundle in the Naïve Sprague-Dawley Rat*. *Behavioural neurology* (Vol. 2015). doi:10.1155/2015/256196
319. Furlanetti, L., Coenen, V., & Döbrössy, M. (2015). *Ventral tegmental area dopaminergic lesion-induced depressive phenotype in the rat is reversed by deep brain stimulation of the medial forebrain bundle*. *Behavioural Brain Research* (Vol. 299). doi:10.1016/j.bbr.2015.11.036
320. Paxinos, G., & Watson, C. (2006). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* (Sixth edition). Elsevier Academic Press.
321. Thiele, S., Furlanetti, L., Pfeiffer, L. M., Coenen, V. A., & Döbrössy, M. D. (2018). The effects of bilateral, continuous, and chronic Deep Brain Stimulation of the medial forebrain bundle in a rodent model of depression. *Experimental Neurology*, 303, 153–161. doi:10.1016/j.expneurol.2018.02.002
322. Temel, Y., Cao, C., Vlamings, R., Blokland, A., Ozen, H., Steinbusch, H. W. M., ... & Visser-Vandewalle, V. (2006). Motor and cognitive improvement by deep brain stimulation in a transgenic rat model of Huntington's disease. *Neuroscience Letters*, 406(1), 138–141. doi:10.1016/j.neulet.2006.07.036
323. Hamani, C., Diwan, M., Isabella, S., Lozano, A. M., & Nobrega, J. N. (2010). Effects of different stimulation parameters on the antidepressant-like response of medial prefrontal cortex deep brain stimulation in rats. *Journal of Psychiatric Research*, 44(11), 683–687. doi:10.1016/j.jpsychires.2009.12.010
324. Lozano, A. M., Dostrovsky, J., Chen, R., & Ashby, P. (2002). Deep brain stimulation for Parkinson's disease: disrupting the disruption. *The Lancet Neurology*, 1(4), 225–231. doi:10.1016/S1474-4422(02)00101-1
325. Vitek, J. L. (2002). Mechanisms of deep brain stimulation: excitation or inhibition. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 17(3), 69-72.
326. Warner, T. A., Stafford, N. P., Rompala, G. R., Van Hoogenstyn, A. J., Elgert, E., & Drugan, R. C. (2013). Intermittent swim stress causes Morris water maze performance deficits in a massed-learning trial procedure that are exacerbated by reboxetine. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 113, 12–19. doi:10.1016/j.pbb.2013.09.014
327. Francis, D. D., Zaharia, M. D., Shanks, N., & Anisman, H. (1995). Stress-induced disturbances in Morris water-maze performance: interstrain variability. *Physiology & behavior*, 58(1), 57–65.
328. Kim, J. J., Lee, H. J., Han, J. S., & Packard, M. G. (2001). Amygdala is critical for stress-induced modulation of hippocampal long-term potentiation and learning. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 21(14), 5222–5228.
329. Drugan, R. C., Eren, S., Hazi, A., Silva, J., Christianson, J. P., & Kent, S. (2005). Impact of water temperature and stressor controllability on swim stress-induced changes in body temperature, serum corticosterone, and immobility in rats. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 82(2), 397–403. doi:10.1016/j.pbb.2005.09.011
330. de Quervain, D. J., Roozendaal, B., & McGaugh, J. L. (1998). Stress and glucocorticoids impair retrieval of long-term spatial memory. *Nature*, 394(6695), 787–790. doi:10.1038/29542

331. Bernardis, L. L., & Bellinger, L. L. (1996). The lateral hypothalamic area revisited: ingestive behavior. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, *20*(2), 189–287. doi:10.1016/0149-7634(95)00015-1
332. Steinbaum, E. A., & Miller, N. E. (1965). Obesity from eating elicited by daily stimulation of hypothalamus. *American Journal of Physiology*, *208*, 1–5.
333. Folkow, B., & Rubinstein, E. H. (1966). The functional role of some autonomic and behavioral patterns evoked from the lateral hypothalamus of the cat. *Acta physiologica Scandinavica*, *66*(1), 182–188. doi:10.1111/j.1748-1716.1966.tb03183.x
334. Akerman, B., Anderson, B., Fabricius, E., & Svensson, L. (1960). Observations on central regulation of body temperature and of food and water intake in the pigeon (*Columba livia*). *Acta physiologica Scandinavica*, *50*, 328–336. doi:10.1111/j.1748-1716.1960.tb00187.x
335. Quaade, F., Yærnet, K., & Larsson, S. (1974). Stereotaxic stimulation and electrocoagulation of the lateral hypothalamus in obese humans. *Acta Neurochirurgica*, *30*(1), 111–117. doi:10.1007/BF01405759
336. de Haan, S., Rietveld, E., Stokhof, M., & Denys, D. (2015). Effects of Deep Brain Stimulation on the Lived Experience of Obsessive-Compulsive Disorder Patients: In-Depth Interviews with 18 Patients. *PloS one*, *10*(8), e0135524. doi:10.1371/journal.pone.0135524
337. Morgane, P. J. (1961). Electrophysiological studies of feeding and satiety centers in the rat. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, *201*(5), 838–844. doi:10.1152/ajplegacy.1961.201.5.838
338. Sasaki, K., Ono, T., Muramoto, K., Nishino, H., & Fukuda, M. (1984). The effects of feeding and rewarding brain stimulation on lateral hypothalamic unit activity in freely moving rats. *Brain research*, *322*(2), 201–211.
339. Andronova, L. M., Kudriavtsev, R. V., Konstantinopol'skii, M. A., & Stanishevskaja, A. V. (1984). Self-stimulation characteristics and endogenous ethanol in rats of different sexes. *Bulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny*, *97*(6), 688–690.
340. McNaughton, N., Ruan, M., & Woodnorth, M. A. (2006). Restoring theta-like rhythmicity in rats restores initial learning in the Morris water maze. *Hippocampus*, *16*(12), 1102–1110. doi:10.1002/hipo.20235
341. Ellman, S. J., Ackermann, R. F., Bodnar, R. J., Jackler, F., & Steiner, S. S. (1975). Comparison of behaviors elicited by electrical brain stimulation in dorsal brain stem and hypothalamus of rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*. doi:10.1037/h0076395
342. Carlezon Jr, W. A., & Chartoff, E. H. (2007). Intracranial self-stimulation (ICSS) in rodents to study the neurobiology of motivation. *Nature protocols*, *2*(11), 2987. doi:10.1038/nprot.2007.441
343. Liebman, J. M. (1983). Discriminating between reward and performance: A critical review of intracranial self-stimulation methodology. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *7*(1), 45–72. doi:10.1016/0149-7634(83)90007-6
344. Farris, S. M., & Giroux, M. L. (2016). Rapid assessment of gait and speech after subthalamic deep brain stimulation. *Surgical Neurology International*, *7*(19), 545–550. doi:10.0.16.7/2152-7806.187532

## Bibliografia

345. Jiang, L. L., Liu, J. L., Fu, X. L., Xian, W. B., Gu, J., Liu, Y. M., ... & Chen, L. (2015). Long-term Efficacy of Subthalamic Nucleus Deep Brain Stimulation in Parkinson's Disease: A 5-year Follow-up Study in China. *Chinese Medical Journal*, *128*(18), 2433–2438. doi:10.4103/0366-6999.164925
346. Mendonca, M. D., Meira, B., Fernandes, M., Barbosa, R., & Bugalho, P. (2018). Deep brain stimulation for lesion-related tremors: A systematic review and meta-analysis. *Parkinsonism & related disorders*, *47*, 8–14. doi:10.1016/j.parkreldis.2017.12.014
347. Dupre, D. A., Nangunoori, R., Koduri, S., Angle, C., Cantella, D., & Whiting, D. (2018). Disease Stabilization of DYT1-Positive Primary Generalized Dystonia With Deep Brain Stimulation of the Globus Pallidus Interna: A 15-Year Follow-up. *Operative neurosurgery*, *14*(5), 597. doi:10.1093/ons/opx137
348. Butson, C. R., Cooper, S. E., Henderson, J. M., & McIntyre, C. C. (2007). Patient-Specific Analysis of the Volume of Tissue Activated During Deep Brain Stimulation. *NeuroImage*, *34*(2), 661–670. doi:10.1016/j.neuroimage.2006.09.034
349. Feddersen, B., Vercueil, L., Noachtar, S., David, O., Depaulis, A., & Deransart, C. (2007). Controlling seizures is not controlling epilepsy: a parametric study of deep brain stimulation for epilepsy. *Neurobiology of disease*, *27*(3), 292–300. doi:10.1016/j.nbd.2007.05.005
350. Ramasubbu, R., Anderson, S., Haffenden, A., Chavda, S., & Kiss, Z. H. T. (2013). Double-blind optimization of subcallosal cingulate deep brain stimulation for treatment-resistant depression: a pilot study. *Journal of psychiatry & neuroscience*, *38*(5), 325–332. doi:10.1503/jpn.120160
351. Rea, P. (2015). Essential Anatomy and Function of the Brain. In *Essential clinical anatomy of the nervous system*. (pp. 51–76). San Diego: Academic Press. doi:10.1016/B978-0-12-802030-2.00002-9
352. Settell, M. L., Testini, P., Cho, S., Lee, J. H., Blaha, C. D., Jo, H. J., ... & Min, H. K. (2017). Functional Circuitry Effect of Ventral Tegmental Area Deep Brain Stimulation: Imaging and Neurochemical Evidence of Mesocortical and Mesolimbic Pathway Modulation. *Frontiers in neuroscience*, *11*, 104. doi:10.3389/fnins.2017.00104
353. García-Brito, S. (2018). *Effects of orexin-A blockade on memory facilitation by intracranial self-stimulation* (Tesi doctoral). Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona.
354. McAllister, W. R., McAllister, D. E., Dieter, S. E., & James, J. H. (1979). Preexposure to situational cues produces a direct relationship between two-way avoidance learning and shock intensity. *Animal Learning & Behavior*, *7*(2), 165–173. doi:10.3758/BF03209266
355. Pan, X., Jiang, T., Zhang, L., Zheng, H., Luo, J., & Hu, X. (2017). Physical Exercise Promotes Novel Object Recognition Memory in Spontaneously Hypertensive Rats after Ischemic Stroke by Promoting Neural Plasticity in the Entorhinal Cortex. *Frontiers in behavioral neuroscience*, *11*, 185. doi:10.3389/fnbeh.2017.00185
356. de Senna, P. N., Bagatini, P. B., Galland, F., Bobermin, L., do Nascimento, P. S., Nardin, P., ... & Xavier, L. L. (2017). Physical exercise reverses spatial memory deficit and induces hippocampal astrocyte plasticity in diabetic rats. *Brain research*, *1655*, 242–251. doi:10.1016/j.brainres.2016.10.024
357. Aguiar, A. S. J., Castro, A. A., Moreira, E. L., Glaser, V., Santos, A. R. S., Tasca, C. I., ... & Prediger, R. D. S. (2011). Short bouts of mild-intensity physical exercise improve spatial learning and memory in aging rats: involvement of hippocampal plasticity via AKT, CREB and BDNF signaling. *Mechanisms of ageing and development*, *132*(11–12), 560–567.

doi:10.1016/j.mad.2011.09.005

358. Vedovelli, K., Silveira, E., Velho, E., Stertz, L., Kapczinski, F., Schroder, N., & Bromberg, E. (2011). Effects of increased opportunity for physical exercise and learning experiences on recognition memory and brain-derived neurotrophic factor levels in brain and serum of rats. *Neuroscience*, *199*, 284–291. doi:10.1016/j.neuroscience.2011.08.012
359. dos Santos, F. V., Targa, A. D. S., Hammerschmidt, I., Zanata, S. M., Maia, F. G., Visentainer, J. V., ... & Ferraz, A. C. (2018). Fish oil supplementation reverses behavioral and neurochemical alterations induced by swimming exercise in rats. *Physiology & Behavior*, *194*, 95–102. doi:10.1016/j.physbeh.2018.05.001
360. Shih, P. C., Yang, Y. R., & Wang, R. Y. (2013). Effects of exercise intensity on spatial memory performance and hippocampal synaptic plasticity in transient brain ischemic rats. *PloS one*, *8*(10), e78163. doi:10.1371/journal.pone.0078163
361. Kennard, J. A., & Woodruff-Pak, D. S. (2012). A comparison of low- and high-impact forced exercise: effects of training paradigm on learning and memory. *Physiology & behavior*, *106*(4), 423–427. doi:10.1016/j.physbeh.2012.02.023
362. Doyle, B., & Zimmer, M. (2014). The effect of exercising intensity on learning and memory in humans (LB828). *The FASEB Journal*, *28*(1), 828. doi:10.1096/fasebj.28.1\_supplement.lb828
363. Arent, S. M., & Landers, D. M. (2003). Arousal, anxiety, and performance: a reexamination of the Inverted-U hypothesis. *Research quarterly for exercise and sport*, *74*(4), 436–444. doi:10.1080/02701367.2003.10609113
364. Tuller, M., & Pinto, J. (2005). Effects of anxiety on attention and visual memory. *Journal of Vision*, *5*(8), 389. doi:10.1167/5.8.389
365. Zhang, J. G., Zhang, C., Hu, W. H., Wu, D. L., & Zhang, K. (2015). Behavioral Effects of Deep Brain Stimulation of the Anterior Nucleus of Thalamus, Entorhinal Cortex and Fornix in a Rat Model of Alzheimer's Disease. *Chinese Medical Journal*, *128*(9), 1190. doi:10.4103/0366-6999.156114
366. Small, B. J., Herlitz, A., Fratiglioni, L., Almkvist, O., & Backman, L. (1997). Cognitive predictors of incident Alzheimer's disease: a prospective longitudinal study. *Neuropsychology*, *11*(3), 413–420.
367. Bierer, L. M., Haroutunian, V., Gabriel, S., Knott, P. J., Carlin, L. S., Purohit, D. P., ... & Davis, K. L. (1995). Neurochemical correlates of dementia severity in Alzheimer's disease: relative importance of the cholinergic deficits. *Journal of neurochemistry*, *64*(2), 749–760.
368. Baxter, M. G., & Chiba, A. A. (1999). Cognitive functions of the basal forebrain. *Current opinion in neurobiology*, *9*(2), 178–183.
369. Schafe, G. E., Doyère, V., & LeDoux, J. E. (2005). Tracking the Fear Engram: The Lateral Amygdala Is an Essential Locus of Fear Memory Storage. *The Journal of Neuroscience*, *25*(43), 10010–10014.
370. Baysinger, A. N., Kent, B. A., & Brown, T. H. (2012). Muscarinic receptors in amygdala control trace fear conditioning. *PloS one*, *7*(9), 45720. doi:10.1371/journal.pone.0045720
371. Herrera, D. G., Yague, A. G., Johnsen-Soriano, S., Bosch-Morell, F., Collado-Morente, L., Muriach, M., ... & Garcia-Verdugo, J. M. (2003). Selective impairment of hippocampal

- neurogenesis by chronic alcoholism: protective effects of an antioxidant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(13), 7919–7924. doi:10.1073/pnas.1230907100
372. Kempermann, G., Gast, D., Kronenberg, G., Yamaguchi, M., & Gage, F. H. (2003). Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. *Development*, 130(2), 391–399.
373. Santiago, H. P., Leite, L. H. R., Lima, P. M. A., Rodovalho, G. V., Szawka, R. E., & Coimbra, C. C. (2016). The improvement of exercise performance by physical training is related to increased hypothalamic neuronal activation. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*, 43(1), 116–124. doi:10.1111/1440-1681.12507
374. Kim, T. K., & Han, P. L. (2016). Chronic stress and moderate physical exercise prompt widespread common activation and limited differential activation in specific brain regions. *Neurochemistry international*, 99, 252–261. doi:10.1016/j.neuint.2016.08.007
375. Liu, W., Wu, W., Lin, G., Cheng, J., Zeng, Y., & Shi, Y. (2018). Physical exercise promotes proliferation and differentiation of endogenous neural stem cells via ERK in rats with cerebral infarction. *Molecular medicine reports*, 18(2), 1455–1464. doi:10.3892/mmr.2018.9147
376. Guzowski, J. F., Setlow, B., Wagner, E. K., & McGaugh, J. L. (2001). Experience-dependent gene expression in the rat hippocampus after spatial learning: a comparison of the immediate-early genes Arc, c-fos, and zif268. *The Journal of Neuroscience*, 21(14), 5089–5098.
377. Teather, L. A., Packard, M. G., Smith, D. E., Ellis-Behnke, R. G., & Bazan, N. G. (2005). Differential induction of c-Jun and Fos-like proteins in rat hippocampus and dorsal striatum after training in two water maze tasks. *Neurobiology of Learning and Memory*, 84(2), 75–84. doi:10.1016/j.nlm.2005.03.006
378. Nakahara, D., Ishida, Y., Nakamura, M., Kuwahara, I., Todaka, K., & Nishimori, T. (1999). Regional differences in desensitization of c-Fos expression following repeated self-stimulation of the medial forebrain bundle in the rat. *Neuroscience*, 90(3), 1013–1020.
379. Gould, E., Beylin, A., Tanapat, P., Reeves, A., & Shors, T. J. (1999). Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nature neuroscience*, 2(3), 260–265. doi:10.1038/6365
380. Garthe, A., Behr, J., & Kempermann, G. (2009). Adult-generated hippocampal neurons allow the flexible use of spatially precise learning strategies. *PLoS ONE*, 4(5). doi:10.1371/journal.pone.0005464
381. Luyck, K., Tambuyzer, T., Deprez, M., Rangarajan, J., Nuttin, B., & Luyten, L. (2017). Electrical stimulation of the bed nucleus of the stria terminalis reduces anxiety in a rat model. *Translational psychiatry*, 7(2), e1033. doi:10.1038/tp.2017.2
382. Aldavert-Vera, L., Segura-Torres, P., Costa-Miserachs, D., & Morgado-Bernal, I. (1996). Shuttle-box memory facilitation by posttraining intracranial self-stimulation: differential effects in rats with high and low basic conditioning levels. *Behavioral neuroscience*, 110(2), 346–352.
383. Hosp, J. A., Mann, S., Wegenast-Braun, B. M., Calhoun, M. E., & Luft, A. R. (2013). Region and task-specific activation of Arc in primary motor cortex of rats following motor skill learning. *Neuroscience*, 250, 557–564. doi:10.1016/j.neuroscience.2013.06.060

384. McDonald, R. J., & White, N. M. (2013). A triple dissociation of memory systems: Hippocampus, amygdala, and dorsal striatum. *Behavioral neuroscience*, *127*(6), 835–853. doi:10.1037/a0034883
385. Kelley, A. E., Smith-Roe, S. L., & Holahan, M. R. (1997). Response-reinforcement learning is dependent on N-methyl-d-aspartate receptor activation in the nucleus accumbens core. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(22), 12174–12179.
386. Maldonado-Irizarry, C. S., & Kelley, A. E. (1995). Excitotoxic lesions of the core and shell subregions of the nucleus accumbens differentially disrupt body weight regulation and motor activity in rat. *Brain research bulletin*, *38*(6), 551–559.
387. Rebec, G. V., Christensen, J. R., Guerra, C., & Bardo, M. T. (1997). Regional and temporal differences in real-time dopamine efflux in the nucleus accumbens during free-choice novelty. *Brain research*, *776*(1–2), 61–67.
388. Rebec, G. V., Grabner, C. P., Johnson, M., Pierce, R. C., & Bardo, M. T. (1997). Transient increases in catecholaminergic activity in medial prefrontal cortex and nucleus accumbens shell during novelty. *Neuroscience*, *76*(3), 707–714.
389. Waraczynski, M. A. (2006). The central extended amygdala network as a proposed circuit underlying reward valuation. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, *30*(4), 472–496. doi:10.1016/j.neubiorev.2005.09.001
390. Miller, J. P., Sweet, J. A., Bailey, C. M., Munyon, C. N., Luders, H. O., & Fastenau, P. S. (2015). Visual-spatial memory may be enhanced with theta burst deep brain stimulation of the fornix: a preliminary investigation with four cases. *Brain: a journal of neurology*, *138*(Pt 7), 1833–1842. doi:10.1093/brain/awv095
391. Klur, S., Muller, C., Pereira de Vasconcelos, A., Ballard, T., Lopez, J., Galani, R., ... & Cassel, J.-C. (2009). Hippocampal-dependent spatial memory functions might be lateralized in rats: An approach combining gene expression profiling and reversible inactivation. *Hippocampus*, *19*(9), 800–816. doi:10.1002/hipo.20562
392. Rossetti, Z. L., Marcangione, C., & Wise, R. A. (1998). Increase of extracellular glutamate and expression of Fos-like immunoreactivity in the ventral tegmental area in response to electrical stimulation of the prefrontal cortex. *Journal of neurochemistry*, *70*(4), 1503–1512.
393. Nyberg, L., Petersson, K. M., Nilsson, L. G., Sandblom, J., Aberg, C., & Ingvar, M. (2001). Reactivation of motor brain areas during explicit memory for actions. *NeuroImage*, *14*(2), 521–528. doi:10.1006/nimg.2001.0801
394. Morishita, T., & Inoue, T. (2017). Need for multiple biomarkers to adjust parameters of closed-loop deep brain stimulation for Parkinson's disease. *Neural regeneration research*, *12*(5), 747–748. doi:10.4103/1673-5374.206642
395. Dayal, V., Limousin, P., & Foltynie, T. (2017). Subthalamic Nucleus Deep Brain Stimulation in Parkinson's Disease: The Effect of Varying Stimulation Parameters. *Journal of Parkinson's disease*, *7*(2), 235–245. doi:10.3233/JPD-171077
396. Holt, A. B., Wilson, D., Shinn, M., Moehlis, J., & Netoff, T. I. (2016). Phasic Burst Stimulation: A Closed-Loop Approach to Tuning Deep Brain Stimulation Parameters for Parkinson's Disease. *PLoS computational biology*, *12*(7), e1005011.

## Bibliografia

doi:10.1371/journal.pcbi.1005011

397. Yoshida, F., Martinez-Torres, I., Pogosyan, A., Holl, E., Petersen, E., Chen, C. C., ... Brown, P. (2010). Value of subthalamic nucleus local field potentials recordings in predicting stimulation parameters for deep brain stimulation in Parkinson's disease. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, *81*(8), 885–889. doi:10.1136/jnnp.2009.190918
398. Schoenberg, M. R., Mash, K. M., Bharucha, K. J., Francel, P. C., & Scott, J. G. (2008). Deep brain stimulation parameters associated with neuropsychological changes in subthalamic nucleus stimulation for refractory Parkinson's disease. *Stereotactic and functional neurosurgery*, *86*(6), 337–344. doi:10.1159/000163554
399. Francel, P., Ryder, K., Wetmore, J., Stevens, A., Bharucha, K., Beatty, W. W., & Scott, J. (2004). Deep brain stimulation for Parkinson's disease: association between stimulation parameters and cognitive performance. *Stereotactic and functional neurosurgery*, *82*(4), 191–193. doi:10.1159/000082208
400. Kuncel, A. M., Turner, D. A., Ozelius, L. J., Greene, P. E., Grill, W. M., & Stacy, M. A. (2009). Myoclonus and tremor response to thalamic deep brain stimulation parameters in a patient with inherited myoclonus-dystonia syndrome. *Clinical neurology and neurosurgery*, *111*(3), 303–306. doi:10.1016/j.clineuro.2008.10.015
401. Jaseja, H. (2013). Deep brain stimulation in intractable epilepsy: postulated optimal stimulation parameters. *Epilepsy & Behavior*, *29*(3), 597–598. doi:10.1016/j.yebeh.2013.09.017
402. Costa-Miserachs, D., Portell-Cortés, I., Aldavert-Vera, L., Torras-Garcia, M., & Morgado-Bernal, I. (1993). Facilitation of a distributed shuttlebox conditioning with post-training epinephrine in rats. *Behavioral and neural biology*, *60*(1), 75–78.
403. Baldi, E., & Bucherelli, C. (2005). The inverted “u-shaped” dose-effect relationships in learning and memory: modulation of arousal and consolidation. *Nonlinearity in biology, toxicology, medicine*, *3*(1), 9–21. doi:10.2201/nonlin.003.01.002
404. Martel, G., Blanchard, J., Mons, N., Gastambide, F., Micheau, J., & Guillou, J. L. (2007). Dynamic interplays between memory systems depend on practice: the hippocampus is not always the first to provide solution. *Neuroscience*, *150*(4), 743–753. doi:10.1016/j.neuroscience.2007.10.004
405. Harrison, F. E., Hosseini, A. H., & McDonald, M. P. (2009). Endogenous anxiety and stress responses in water maze and Barnes maze spatial memory tasks. *Behavioural brain research*, *198*(1), 247–251. doi:10.1016/j.bbr.2008.10.015
406. Jeffrey, D. B. (1974). A comparison of the effects of external control and self-control on the modification and maintenance of weight. *Journal of abnormal psychology*, *83*(4), 404–410.

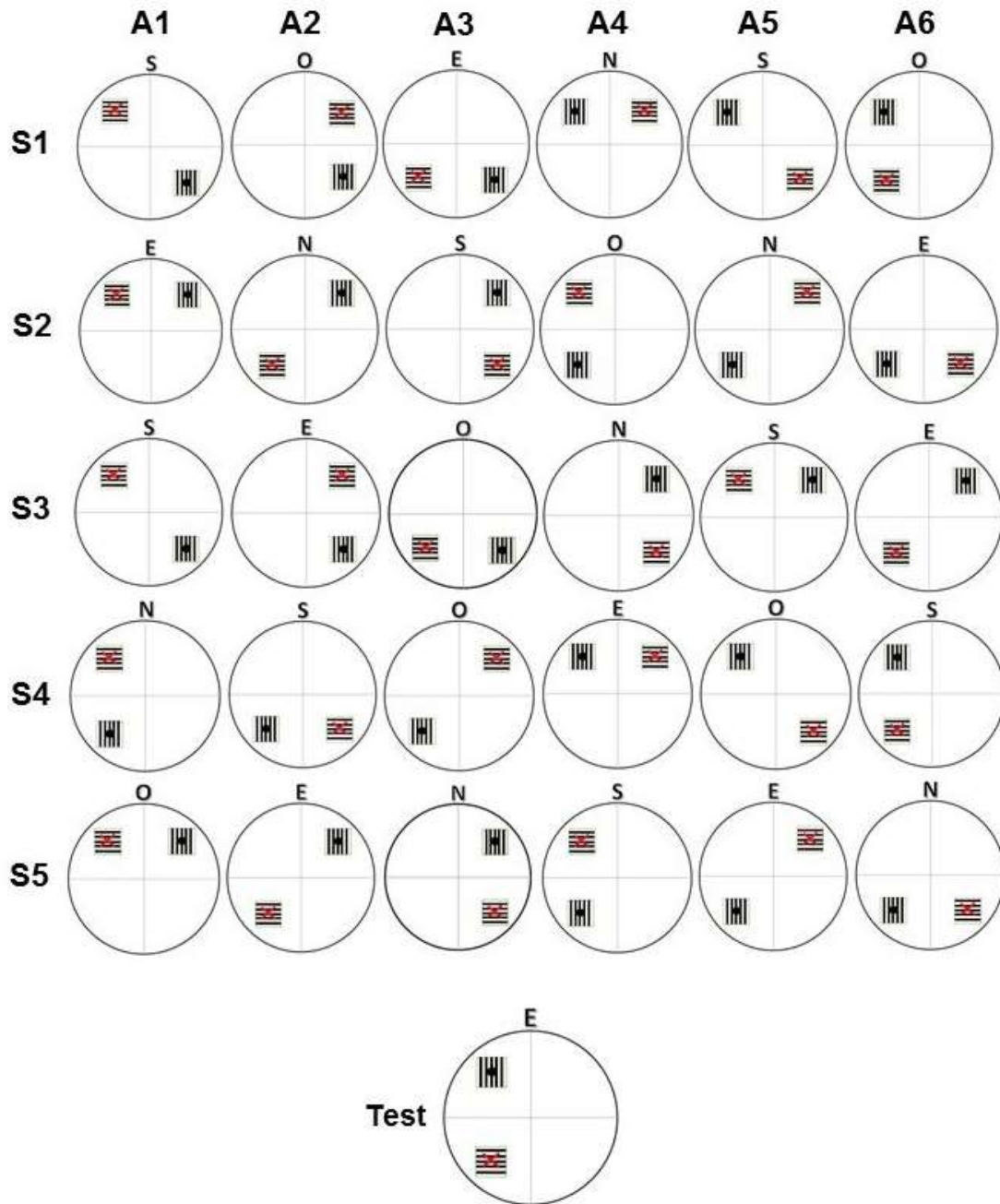
## **VIII. ANNEXOS**

---





## Annex 1. Protocol de la tasca de DVS al LAM.



**Annex 1. Protocol de la tasca de DVS al LAM.** Es mostren les configuracions de cada assaig (A1 a A6) aplicades durant les sessions d'adquisició (S1 a S5) i test de retenció. Els patrons de línies verticals amb punt negre representen la presència de plataforma/senyal correcte mentre que les horitzontals amb creu vermella representen l'absència de plataforma/senyal incorrecte. Es mostren els punts de partida de cada assaig (N, E, S, O).

## Annex 2. Protocol immunohistoquímic per doble marcatge BrdU/c-Fos

### Dia 1

1. Cada recipient *eppendorf* es va emplenar amb 5 ml de solució TBS 1X en el moment de treure les seccions del congelador a -80°C.
2. Es van rentar les seccions 2 vegades amb SSC 2X, durant 15 minuts cada vegada, en un agitador constant.
3. Les seccions es van incubar en SSC 2X amb una dissolució amb 50% Formamida durant 2 hores a 65°C en agitador constant a 70 rpm.
4. Es van rentar els talls amb 2X SSC durant 10 minuts.
5. Es van rentar els talls amb HCl 2M, prèviament temperat a 37°C, durant 30 minuts.
6. Es van rentar els talls amb Buffer Borat 0,1M durant 10 minuts en agitador constant.
7. Es van rentar les seccions dues vegades amb 5ml de TBS-T 1X durant 15 minuts cada vegada en agitador constant.
8. Es van pre-incubar amb 0,1% BSA TBS-T 1X, 30 minuts en agitador constant.
9. Les seccions es van incubar amb anticossos primaris (anti-BrdU de rata, 1:75 + anti-cFos de conill diluït 1:2000) en 0,2%BSA TBS-T 1X, els primers 60 minuts a temperatura ambient i 1 nit a 4°C en agitador constant.

### Dia 2

1. Es van rentar les seccions 3 vegades amb solució TBS-T/TBS/TBS-T 1X durant 15 minuts cada vegada, en agitador constant.
2. Es van incubar les seccions amb anticòs secundari (Alexa Fluor 488 anti-rata de ruc 1/500) 0,1% BSA TBS-T 1X durant 60 minuts a temperatura ambient en agitador constant (protegit de la llum a partir d'aquell moment).
3. Es van rentar les seccions 3 vegades amb solució TBS-T/TBS/TBS-T durant 15 minuts cada vegada en agitador constant.
4. Es van incubar les seccions amb l'anticòs secundari (Cy3 anti-conill diluït 1:400) tota la nit.

**Dia 3**

- |  |
|--|
| 1. Es van rentar les seccions 3 vegades amb solució TBS 1X durant 15 minuts cada vegada, en agitador constant.   |
| 2. Es va realitzar durant 3 minuts la contraincinció de nuclis amb DAPI 1:10.000 en solució TBS.   |
| 3. Es van rentar les seccions 2 vegades amb solució TBS 1X durant 15 minuts cada vegada, en agitador constant.   |
| 4. Es van muntar les seccions amb medi fluorescent Dako, segellant els marges amb pintura unglés, posteriorment es van guardar a 4°C i fosc per ser analitzat el més aviat possible. |

**Annex 3. Protocol de marcatge enzimàtic AChE**

- |   |
|---|
| 1. Es van recollir mostres en solució tampó (pH 7.4) consistent en una dissolució H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> i Sodium Acetate.   |
| 2. Les seccions es van incubar en solució stock coure (pH 5.0 - compost de 1mg/ml CuSO <sub>4</sub> i 1.2mg/ml de glicina) junt amb 0.03mg/ml d' <i>ethopropazine hydrochloride</i> i 1.16mg/ml d' <i>acetylcholine iodide</i> , durant 4h30m protegit de la llum i en agitació suau. |
| 3. A continuació es van realitzar 7 rentats d'un minut en PBS.  |
| 4. Es fa realitzar la reacció enzimàtica en solució tampó (pH 5.0) amb un 1% de Na <sub>2</sub> S en 0.1M de <i>sodium acetate buffer</i> durant 15 minuts a la fosc.   |
| 5. A continuació es van fer 7 rentats d'un minut en PSB.  |
| 6. Les seccions es van muntar en portaobjectes gelatinitzats, usant PBS.  |
| 7. Es van deixar assecar durant 24 hores.   |
| 8. Es van deshidratar seguint el protocol de l'annex 5 i cobrir amb Histomount per observar al microscopi.  |

**Annex 4. Protocol de deshidratació de les mostres AChE.**

1	Etanol	50%	3 min
2	Etanol	50%	3 min
3	Etanol	70%	3 min
4	Etanol	70%	3 min

## Annexos

5	Etanol	96%	3 min
6	Etanol	96%	3 min
7	Etanol	96%	3 min
8	Etanol	100%	5 min
9	Etanol	100%	5 min
10	Histoclear	(Xilol)	5 min
11	Histoclear	(Xilol)	5 min
12	Muntatge amb Histomount		

### Annex 5. Protocol immunohistoquímic de marcatge per c-Fos

#### Dia 1

1. Els talls coronals es van incubar amb 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en *Tris-buffered saline* (TBS) durant 30 minuts.
2. A continuació es van incubar en 0.1% de Bovine Serum Albumin (BSA) en 0.3% Triton X-100 en TBS durant 30 minuts.
3. Els talls es van incubar en l'anticòs primari de conill anti-cFos (Santa Cruz Biotechnology Inc. Santa Cruz, CA, US; ref.: sc-166940) a 1:2000 en 0.1% BSA en 0.3% Triton X-100 en TBS, durant 60 minuts a temperatura ambient.
4. Es va deixar tota la nit a 4°C.

#### Dia 2

1. Les seccions es van incubar amb l'anticòs secundari de cabra biotinitat *anti-Rabbit-IgG* (Jackson ImmunoResearch Inc., USA; ref.: 111-066-144) a 1:5000 en 0.1% BSA en 0.3% Triton X-100 en TBS durant 60 minuts.
2. A continuació es va tractar amb Streptavidin-HRP (Pelkin Elmer ® Life Science Inc., USA) a 1:3600 en 0.3% Triton X-100 en TBS durant 2 hores.
3. Posteriorment es va tractar amb solució 3,3'-Diaminobenzide (DAB) (Vector ®) durant 7 minuts.
4. Les mostres es van muntar en portaobjectes gelatinitzats en una solució de TBS.