

# **TREBALL EXPERIMENTAL**

---

### III. TREBALL EXPERIMENTAL

---

#### 1. EXPERIMENT 1

##### 1.1. OBJECTIUS I HIPÒTESIS

Aquest primer experiment té com a **principal objectiu**:

**Estudiar els efectes del tractament d'AEIC post-entrenament sobre un condicionament d'EV2 en rates velles (*middle-aged*, 16-17 mesos d'edat).**

Com hem comentat en l'apartat de plantejament i objectius generals a l'inici d'aquest treball, els subjectes amb un nivell d'aprenentatge inferior podrien veure's especialment beneficiats pel tractament d'AEIC post-entrenament. Així doncs, si tenim en compte que els animals vells solen presentar dèficit d'aprenentatge respecte dels animals joves, aquesta pot ser una població que es beneficiï especialment d'aquest tractament. En cap treball previ, però, s'ha estudiat l'efecte de l'AEIC post-entrenament sobre l'adquisició i la retenció d'un aprenentatge en animals vells. Aquest primer experiment ens ha de permetre comprovar, en primer lloc, si és possible observar conducta d'AEIC en animals vells, i, en segon lloc, si l'aplicació d'aquest tractament és capaç de modular l'aprenentatge d'una tasca d'EV2 en aquesta població de subjectes; és a dir, si en subjectes vells és possible modular els mecanismes de plasticitat sinàptica subjacents a l'aprenentatge d'aquesta tasca mitjançant el tractament d'AEIC post-entrenament. Ens interessarà comprovar, igualment, si la resposta observada al tractament d'AEIC és similar o diferent a la que s'obté en una població d'animals joves.

Com a tasca d'aprenentatge hem triat l'evitació activa de dos sentits (EV2) en *shuttle-box* per dos motius principals. En primer lloc, perquè aquesta és la tasca amb la que al nostre laboratori s'han estudiat els efectes de diversos tractaments facilitadors de l'aprenentatge i la memòria, com l'AEIC, en animals joves. Això fa que disposem d'un model conductual ben establert amb el què poder comparar la conducta dels animals vells. En segon lloc, perquè, tal com hem comentat en apartats anteriors (vegeu el punt 4.3.1. del marc teòric), tot i que les tasques de memòria declarativa són els més sensibles a l'envelliment, sembla que alguns tractaments preventius de l'aparició de dèficit associats a l'envelliment poden no ser efectius sobre aquest tipus de tasques. Per tant, considerem que és millor utilitzar una tasca no declarativa, com l'EV2. D'entre el conjunt de tasques no declaratives, a més a més, sembla que aquesta és de les més sensibles als efectes de l'envelliment, fins i tot en rates *middle-aged*, com les que s'utilitzen en el present experiment.

Així doncs, seguint models previs, per assolir aquest objectiu es van entrenar dos grups de rates Wistar de 16-17 mesos d'edat en una tasca d'EV2 segons un paradigma distribuït. Tots els subjectes van ser sotmesos a 5 sessions d'adquisició del condicionament, de 10 assajos cadascuna, en dies consecutius. Els subjectes del grup AEIC rebien, immediatament després de cada sessió de condicionament, una sessió de tractament d'AEIC al FPM, consistent en 1500 trens de corrent elèctric al 100% de la intensitat òptima (determinada per a cada subjecte experimental amb anterioritat a l'inici de la fase d'adquisició de l'aprenentatge). Els subjectes del grup Control no rebien cap mena de tractament després de les sessions d'EV2. L'execució dels dos grups va ser avaluada també al cap de 7 dies en una sessió de retenció del condicionament, d'ídèntiques característiques a les sessions d'adquisició.

Segons la nostra hipòtesi el tractament d'AEIC post-entrenament accelera els processos naturals subjacents a la consolidació de la memòria, per tant, en aquest primer experiment és d'esperar **que l'AEIC post-entrenament faciliti l'adquisició i la retenció del condicionament d'EV2 també en rates velles (*middle-aged*).**

## 1.2. MATERIAL I PROCEDIMENT

### 1.2.1. Subjectes

Per a la realització d'aquest experiment es van utilitzar 39 rates albines mascles de la soca Wistar procedents del nostre estabulari. A l'inici de l'experiment tenien una edat mitjana de 491.3 dies (DS=4.7) i un pes mig de 762.2 gr (DS=84.03). Al llarg de tota la fase experimental es van mantenir unes condicions òptimes de benestar i salut general dels subjectes seguint les *good laboratory practices* que recomana la normativa vigent de "Protecció dels animals utilitzats per experimentació i altres finalitats científiques"(Directrius que especifica la Llei 5/1995 (DOGC 2073-10.7.1995, del 21 de juny). Degut a l'avançada edat dels subjectes, es va controlar molt acuradament durant tot l'experiment el seu estat mitjançant un protocol de supervisió, establint *a priori* uns criteris de punt final per evitar el patiment innecessari dels animals.

Els animals varen ser criats al nostre estabulari i eren aïllats, com a mínim un dia abans de les primeres manipulacions experimentals, en gàbies individuals de plàstic de dimensions homologades (52x26x14cm), cobertes amb una tapa d'enreixat metàl·lic i amb un llit de serradures. La temperatura i la humitat de l'estabulari van ser vigilades en tot moment, oscil·lant entre 21 i 23 °C i un 40-70%, respectivament, i es va mantenir un cicle de llum-fosc constant controlat artificialment (12x12 hores, amb les llums enceses a les 8 hores del matí). Els subjectes tenien accés *ad libitum* a menjar i aigua durant tot l'experiment.

## 1.2.2. Material

### 1.2.2.1. Fabricació i implantació crònica dels elèctrodes

Es van utilitzar elèctrodes unipolars de 130 $\mu$ m de diàmetre (Plastics One Inc., USA), connectats mitjançant soldadura a una de les quatre microterminals d'alumini d'un connector de material plàstic, el qual, una vegada introduït l'elèctrode al cervell de la rata, es fixava al crani del subjecte amb ciment dental (Vertex self-curing, Dentimex, Nederland) sobre tres visos d'ancoratge. L'elèctrode de referència, consistent en un fil de coure de 200 $\mu$ m de diàmetre, anava també soldat a una de les 4 microterminals del connector i, durant la intervenció, es soldava a un dels 3 visos d'ancoratge amb la finalitat de tancar el circuit de corrent elèctric entre l'estimulador i el cervell del subjecte.

### 1.2.2.2. Aparell d'AEIC

L'equip d'AEIC utilitzat a l'experiment estava compost bàsicament per una gàbia de condicionament tipus Skinner (25 x 20 x 20 cm) amb una única palanca i dues llums de 24W, una d'il·luminació constant i l'altra que s'encenia contingentment a l'administració de cada reforçador. Aquesta gàbia estava situada dins d'una caixa insonoritzada, amb un ventilador que permetia la renovació de l'aire i funcionava també com a soroll blanc de fons. El sistema d'estimulació consistia en un temporitzador (Campden Instruments, Ltd.), un estimulador graduat entre 0 i 410  $\mu$ A (rms), un comptador de respostes, un comptador de reforçadors i un oscil·loscopi (Hameg, HM 412-5) que permetia controlar en tot moment el valor del corrent estimulant que arribava als subjectes. Cada reforçador consistia en un tren de polses sinusoidals de 50 Hz de freqüència i 0.3 seg de durada. Els reforçadors estaven separats, com a mínim, per un interval de 0.7 seg (vegeu la figura 1.2,1). D'aquesta forma, s'evitava que els animals rebessin més d'un reforçador/seg, independentment de la seva taxa de resposta. Aquests paràmetres de corrent estimulant es van mantenir fixes al llarg de tot l'experiment, variant únicament la seva intensitat.

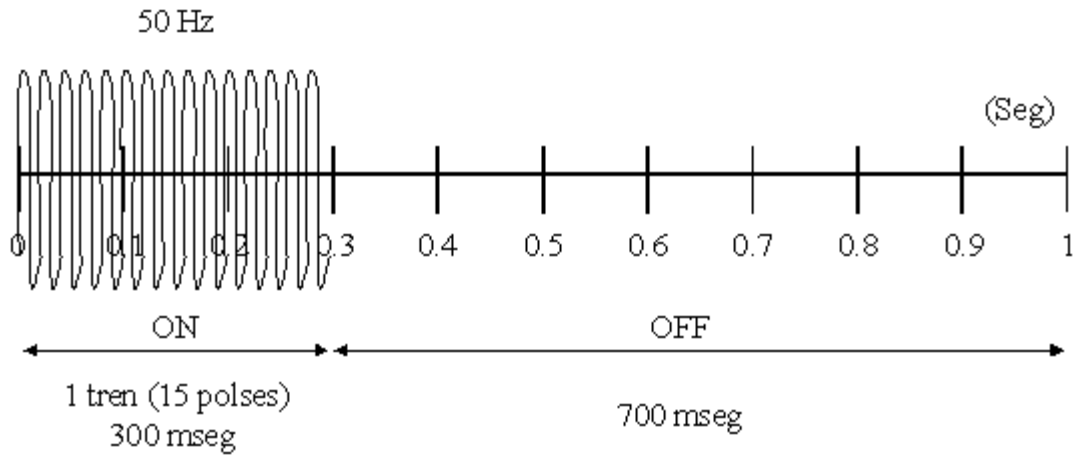


Fig. 1.2,1: Característiques del corrent estimulant d'AEIC. Cada reforçador consistia en un tren de 15 polses de 20 msec de durada cadascun.

### 1.2.2.3. Gàbia d'evitació activa de dos sentits

Es va usar una gàbia convencional *shuttle-box* (Campden Instruments, Ltd.) de 48.5 x 23.1 x 20.7 cm. L'estímul condicionat (EC) consistia en un to de 80dB d'intensitat, 1 kHz de freqüència i 3 seg de durada. L'estímul incondicionat (EI) era un xoc elèctric de 1 mA d'intensitat (corrent alterna) i com a màxim 30 seg de durada, administrat a les potes de l'animal a través del terra enreixat de la gàbia d'evitació activa (a totes les barres de forma simultània). La llum ambiental provenia de dos pilots, situats al sostre de la gàbia, de 2.8 W cadascun. Tot el dispositiu estava situat a l'interior d'una caixa d'insonorització dotada d'un extractor d'aire que produïa un so emmascarador de sorolls externs. El plafó de control dels paràmetres experimentals i de registre de les respostes del subjecte es situava a una habitació contigua, des d'on l'experimentador podia fer el seguiment de la sessió.

### 1.2.3. Procediment

#### 1.2.3.1. Cirurgia estereotàctica

La intervenció estereotàctica per implantar crònicament els elèctrodes d'estimulació es va dur a terme seguint els procediments convencionals de cirurgia i utilitzant un aparell estereotàctic (David Kopf Instruments, USA, model 1504) amb adaptador per a rates. Prèviament a la intervenció quirúrgica els subjectes foren anestesiats amb pentobarbital sòdic (50mg/kg), administrat intraperitonealment. Abans de practicar la incisió a la pell de la part superior del cap i abans també d'aplicar la sutura, es va administrar lidocaïna (Xilonibsa aerosol 10%) de forma tòpica a la zona de la ferida. Durant la intervenció el cos de l'animal es mantenia calent gràcies a una estora elèctrica. Per tal d'evitar infeccions postoperatòries s'administrava preventivament una dosi única (0.2 ml, i.m.) de gentamicina (Gevramycin, Schering-Plough), un antibiòtic d'ampli espectre. Igualment, al finalitzar la intervenció es netejava la ferida quirúrgica amb un antisèptic tòpic (Topionic-Rius).

Els elèctrodes es van implantar a les fibres del FPM, a nivell de l'HL de l'hemisferi dret. Les coordenades estereotàctiques que es van utilitzar van ser les següents: -1.8 mm posterior a bregma, +2.0 mm lateral a la línia mitja sagital i -8.5 mm de profunditat a partir de la superfície cranial (Paxinos i Watson, 1986). Durant la fase de recuperació postoperatòria (7 dies) es controlava el pes dels subjectes.

#### 1.2.3.2. Adquisició de la conducta d'AEIC

Al cap de 7 dies de la intervenció quirúrgica, els subjectes realitzaven una única sessió de moldejament de la conducta d'AEIC. Es situava el subjecte a la gàbia de Skinner i s'endollava el cable procedent de l'estimulador al connector que duia implantat. La resposta operant a moldejar era la de prémer la palanca, contingentment a la qual el subjecte rebia un reforçador (un tren d'estimulació elèctrica a l'HL) segons un programa d'interval fix 1 seg. Aquesta sessió

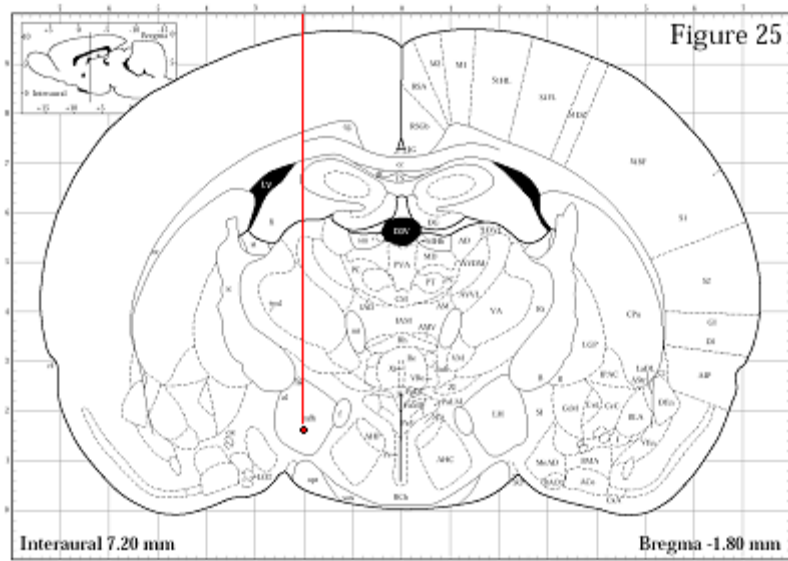


Fig. 1.2,2: Imatge de l'atles de Paxinos i Watson (1997) indicant la trajectòria de pas i la localització de l'elèctrode d'AEIC al FPM

de moldejament començava amb corrents baixos d'estimulació (de 0 a 50  $\mu$ A), que s'anaven augmentant progressivament segons les reaccions observades en el subjecte. Un cop s'aconseguia que el subjecte respongués de forma continuada a alguna intensitat de corrent, se'l permetia autoestimar-se durant 10 minuts per tal que la conducta d'AEIC s'estabilitzés, anotant el número de respostes que feia durant aquest últim període així com el número de reforçadors (trens d'estimulació elèctrica) que rebia al llarg de tota la sessió de moldejament de la conducta d'AEIC.

### 1.2.3.3. Grups

Un cop havien finalitzat la sessió de moldejament de la conducta d'AEIC els subjectes van ser distribuïts en dos grups. La raó per fer-ho en aquest moment, és que en aquesta sessió es van eliminar de l'experiment aquells animals que van patir convulsions o d'altres conductes anormals (4 subjectes en total). Els subjectes restants van ser distribuïts a l'atzar en els següents dos grups:



**AEIC:** rates que rebien una sessió de tractament d'AEIC immediatament després de cada sessió d'adquisició. Per poder determinar, per a cada animal, la intensitat del corrent d'AEIC a administrar en les sessions de tractament, tots els animals assignats a aquest grup van passar per unes sessions prèvies d'AEIC destinades a aquesta finalitat (sessions de DIO, descrites en el punt següent).

**Control:** rates que no van rebre ni tractament d'AEIC ni van passar per les sessions de DIO. Únicament van rebre AEIC en la sessió de moldejament (descrita en el punt anterior).

#### 1.2.3.4. Determinació de la intensitat òptima d'estimulació (DIO)

Després de la sessió de moldejament, els subjectes del grup AEIC realitzaven tres sessions d'AEIC (una diària durant tres dies consecutius) per tal de determinar la intensitat òptima d'autoestimulació (fase DIO). Cada sessió diària de DIO s'iniciava amb una intensitat de corrent estimulant de 10  $\mu$ A, que s'anava incrementant de 10 en 10  $\mu$ A cada 2 minuts, els quals es començaven a comptabilitzar a partir de les 3 primeres respostes realitzades pel subjecte dins d'un interval d'un minut. Per a cada intensitat es comptabilitzaven les respostes que el subjecte efectuava. En el cas que en una determinada intensitat d'estimulació el subjecte no fes cap resposta, l'experimentador administrava un màxim de 10 estimulacions amb la finalitat de provocar l'inici de la resposta, i si no s'observava cap canvi, es passava a la següent intensitat. En finalitzar les sessions de DIO, s'enregistrava el número total de reforçadors rebuts per l'animal. Les sessions de DIO finalitzaven quan es complia un d'aquests dos criteris:

- a) quan durant tres intervals o increments consecutius d'intensitat no s'observava cap augment de la taxa de resposta (considerant augment o disminució quan la variació de la taxa era de  $\pm 3$  respostes/minut). A intensitats baixes d'AEIC (inferiors a 60  $\mu$ A), encara que es pogués complir aquest criteri, es provava l'animal en un mínim de 5 intervals d'intensitat.

- b) quan s'observava una disminució de la taxa de resposta, en dues intensitats, superior al 20% de la taxa a partir de la qual va començar el decrement.

Si s'observava en la rata qualsevol índex de convulsions o d'altres conductes anòmales, s'aturava la sessió de DIO fins que es normalitzés l'estat del subjecte. En posteriors sessions es permetia al subjecte estimular-se només fins a intensitats 10  $\mu$ A inferiors a aquella en la que es van observar convulsions o les conductes anormals.

La intensitat de corrent a la qual un subjecte determinat tenia una major taxa de resposta per a cada sessió es considerava la intensitat òptima parcial d'estimulació (IOP1, IOP2 i IOP3) d'aquell subjecte. La intensitat òptima final (IO) per a cada subjecte s'obtenia fent la mitjana de les dues últimes IOP. Aquest valor d'IO va ser l'utilitzat durant les sessions de tractament post-entrenament del grup AEIC, essent susceptible de modificació en funció de l'aparició de convulsions o d'altres conductes anormals en qualsevol fase de l'experiment.

#### 1.2.3.5. Habitució a la gàbia d'evitació activa

Just abans d'iniciar el procés d'adquisició del condicionament es va dur a terme una sessió d'habitució a la gàbia d'evitació, de 10 minuts de durada. Durant aquesta sessió els subjectes deambulaven lliurement pels dos compartiments de la gàbia, enregistrant-se el número d'encreuaments (activitat locomotora durant la fase d'habitució). El fet de realitzar sessions d'habitució prèvies a l'aprenentatge ha estat relacionat amb una disminució dels efectes interferents de l'exposició a estímuls nous sobre l'aprenentatge posterior. Diferents autors han suggerit que les pre-exposicions a la gàbia d'evitació activa de dos sentits poden eliminar la relació inversa que existeix entre l'execució de la resposta d'evitació i la intensitat del xoc (Dieter, 1977; McAllister, McAllister, Dieter i James, 1979). Per altra banda, s'ha considerat també que l'exploració prèvia pot disminuir la freqüència d'aparició de pseudo-evitacions, i d'aquesta manera minimitzar o evitar la possible contaminació del número d'evitacions (McAllister et al., 1979).

### 1.2.3.6. Adquisició del condicionament d'EV2

Al cap de dos dies d'haver finalitzat les sessions de DIO i a continuació de la sessió d'habitució a la gàbia d'evitació, s'iniciava la fase d'adquisició del condicionament d'EV2. Va consistir en cinc sessions experimentals de 10 assajos cadascuna, separades per un període de 24 hores. Durant l'interval entre assajos s'enregistrava el número d'encreuaments entre compartiments (activitat locomotora durant les sessions de condicionament). El programa de condicionament era d'interval variable 1 minut ( $\pm$  10 segons), i es va usar un condicionament del tipus cap endavant: apareixia sempre primer l'EC (3 seg) seguit, sense traça ni sobreposició, per l'EI (30 seg com a màxim). L'administració de l'EI s'interrompia quan el subjecte canviava de compartiment (resposta de fugida). Si el subjecte canviava de compartiment un cop iniciat l'EC però quan encara no s'havia aplicat l'EI (resposta d'evitació), no es presentava l'EI en aquell assaig. Es va considerar que el número de respostes d'evitació representava el nivell d'adquisició de cada sessió.

### 1.2.3.7. Tractament d'AEIC

Immediatament després de cada sessió d'adquisició, els subjectes del grup d'AEIC rebien una sessió de tractament, consistent en l'autoadministració de 1500 trens (reforçadors) a la seva IO. Tot i que en treballs anteriors del nostre laboratori s'havia comprovat que en rates de 3 mesos la quantitat òptima de trens d'AEIC per facilitar un aprenentatge d'aquestes característiques és de 2500 (Segura-Torres et al., 1991), en la fase preliminar del present experiment vàrem poder comprovar que aquesta quantitat d'estimulació sovint produeix conductes anormals o convulsions en rates velles. Així doncs, vàrem decidir programar les sessions de tractament a un punt mig (1500 trens) entre els paràmetres mínim (500 trens d'AEIC al 100% de l'IO) i òptim (2500 trens al 100% de la IO) d'AEIC que s'han mostrat capaços de facilitar aquest tipus de condicionament en rates joves (3-6 mesos d'edat). Es va registrar el temps de duració d'aquesta sessió i el número total de respostes que realitzava el subjecte.

Els subjectes del grup Control eren situats a una gàbia de Skinner similar a la d'AEIC però



Fig 1.2,3: Rata en una *shuttle-box* realitzant una sessió d'EV2

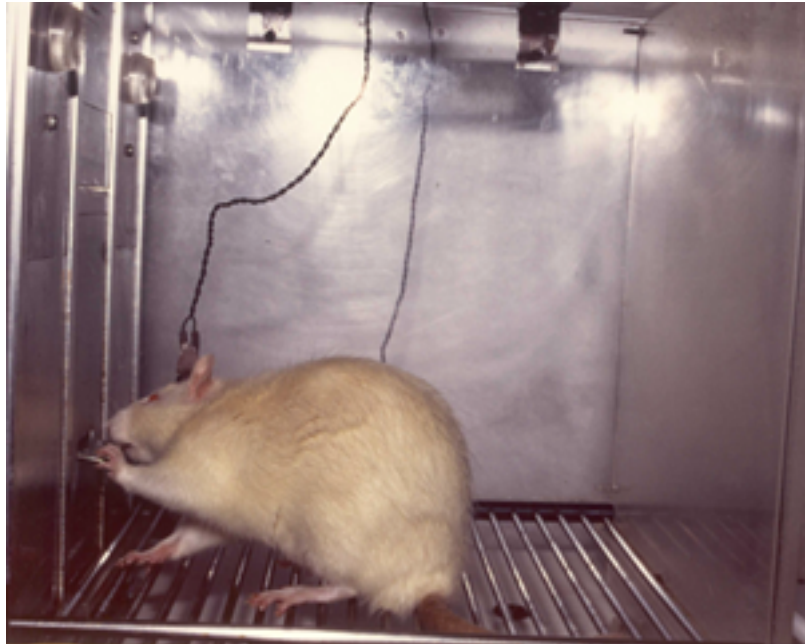


Fig. 1.2,4: Rata en una gàbia de Skinner modificada rebent el tractament d'AEIC

sense palanca, i amb un cable endollat al connector del cap de l'animal. Aquesta gàbia Control es trobava al costat de la de tractament, i els subjectes hi restaven 15 minuts. Un cop finalitzat el tractament o la permanència en la gàbia de Control, els subjectes eren retornats a les seves gàbies habituals i establats fins a la següent sessió d'aprenentatge.

#### 1.2.3.8. Retenció

Un cop finalitzades les 5 sessions d'adquisició del condicionament d'EV2, els subjectes van esperar 6 dies a les seves gàbies experimentals, sense ser sotmesos a més manipulacions que les necessàries per a la neteja i manteniment diaris. Al setè dia es va realitzar una única sessió de retenció de característiques idèntiques a les sessions d'adquisició per a tots dos grups experimentals. Es va mesurar el número total de respostes d'evitació i els encreuaments entre assajos. Ni abans ni després d'aquesta sessió cap subjecte va rebre tractament d'AEIC.

#### 1.2.3.9. Histologia

Els cervells dels subjectes d'aquest experiment van ser usats en un altre treball, pel que no disposem de l'anàlisi histològica de la localització dels elèctrodes d'estimulació. Considerem, però, que el fet de que els subjectes mostressin una conducta d'AEIC estable és un senyal evident de que la punta terminal de l'elèctrode es localitzava a les fibres del FPM a nivell de l'HL. En qualsevol cas, a més, en tots els treballs previs del nostre laboratori realitzats amb les mateixes coordenades d'implantació de l'elèctrode que les usades en el present experiment (Aldavert-Vera et al., 1996; Segura-Torres et al., 1988; 1991), no s'ha observat cap efecte significatiu de la localització de l'elèctrode sobre les diverses variables dependents estudiades.

#### 1.2.4. Anàlisi estadística

Les dades van ser processades amb el paquet estadístic SPSS 7.5.2. Per analitzar l'adquisició del condicionament i l'activitat locomotora es van realitzar anàlisis de la variància per a

dissenys mixtos, prenent la variable *Grup* com a variable independent (2 categories= Control i AEIC), i les variables *Número d'Evitacions* i *Encreuaments* com a dependents quantitatives amb mesures repetides per a les diferents sessions de condicionament, sobre les que es podien realitzar contrastos polinòmics. En el cas de l'anàlisi de les dades de la conducta d'AEIC es van realitzar anàlisis de la variància d'un sol factor, amb els corresponents contrast polinòmics, i proves t de comparació de mitjanes per a dades independents, que també van ser utilitzades per estudiar l'activitat locomotora en la fase d'habitució. Per últim, les anàlisis de correlacions es van realitzar amb la r de Pearson. El nivell de significació estadística es va fixar a  $\alpha = 0.05$ .

### 1.2.5. Resum del disseny experimental

FASE EXPERIMENTAL	Dia	GRUP	
		Control	AEIC
Estereotàxia	1	Implantació crònica elèctrode a HL	
Descans	2-8	7 dies	
Moldejament i DIO 1	9	---	Determinació Intensitat Òptima 1
DIO 2	10	---	Determinació Intensitat Òptima 2
DIO 3	11	---	Determinació Intensitat Òptima 3
Descans	12-13	2 dies	
Habitució	14	10 minuts de lliure deambulació	
Adquisició aprenentatge +	14-18	5 sessions d'EV2 de 10 assajos	
Tractament d'AEIC		---	1500 trens d'AEIC
Descans	19-24	6 dies	
Retenció	25	1 sessió d'EV2	

Taula 1.2,1: Resum del disseny de l'experiment 1

## 1.3. RESULTATS

### 1.3.1. Mostra de subjectes

#### 1.3.1.1. Mostra

Un total de 39 subjectes van ser sotmesos a cirurgia estereotàctica. D'aquests, 3 van morir a conseqüència de la intervenció quirúrgica, 2 van emmalaltir al llarg de l'experiment i 4 van ser exclosos per conductes anòmales en l'AEIC. Així doncs, la mostra final va ser de 30 subjectes. Cap d'ells va mostrar signe ningun d'anomalia que hagués pogut alterar la seva conducta. Tal com ja s'ha indicat, els subjectes van ser distribuïts aleatòriament en 2 condicions experimentals, de la següent manera:

GRUP	
<i>CONTROL</i>	<i>AEIC</i>
n=16	n=14

Taula 1.3,1: Distribució dels subjectes de la mostra final en els dos grups

#### 1.3.1.2. Estat dels subjectes

Es va dur un control continuat del pes dels subjectes donat que es considera un bon indicador de la seva salut, alhora que ens permet tenir control sobre qualsevol canvi que pugui afectar l'aprenentatge. Com es pot observar a la figura 1.3,1 els dos grups van mostrar una disminució

significativa del pes com a conseqüència de les manipulacions experimentals ( $F(10,280)=55.13$ ;  $p<0.0005$ ). Concretament, el pes va disminuir en tots dos grups després de la intervenció quirúrgica ( $t(29,0.05)=7.50$ ;  $p<0.0005$ ). A partir de la sessió de moldejament la pèrdua de pes va ser menor, i més acusada en el grup d'AEIC que en el grup Control, tal com es dedueix de la interacció significativa entre *Grup i Fase Experimental* ( $F(10,280)=2.27$ ;  $p=0.014$ ). Malgrat tot, les diferències de pes entre grups van ser petites, ja que en cap cas van arribar a ser estadísticament significatives.

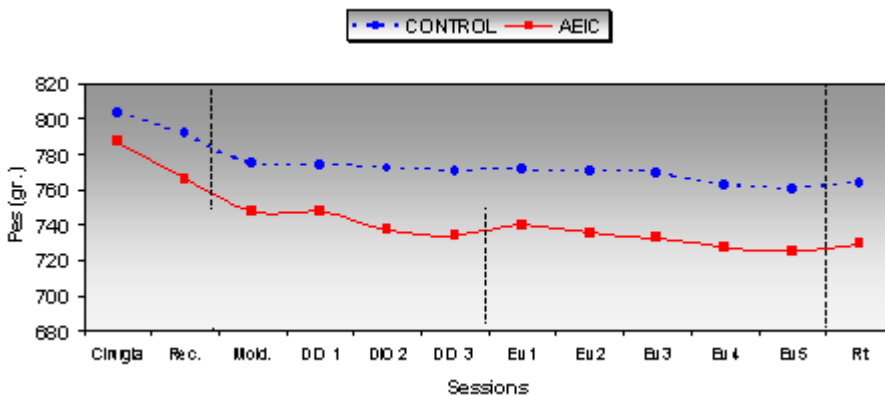


Fig. 1.3,1: Evolució del pes al llarg de les sessions experimentals

Aquesta progressiva pèrdua de pes al llarg de l'experiment va ser possiblement deguda a l'augment d'activitat després del llarg temps d'estabulació.

La major disminució de pes del grup d'AEIC pot ser atribuïda a la major activitat d'aquest grup, que rebia les sessions de tractament post-aprenentatge. Finalment, es va estudiar la correlació dels pesos amb la resta de variables experimentals (variables d'AEIC, d'activitat locomotora i d'aprenentatge), no observant-se cap correlació significativa.

### 1.3.2. Conducta d'AEIC

#### 1.3.2.1. Intensitats òptimes d'estimulació

Els subjectes del grup d'AEIC van necessitar una única sessió de moldejament, d'entre 10 i 20



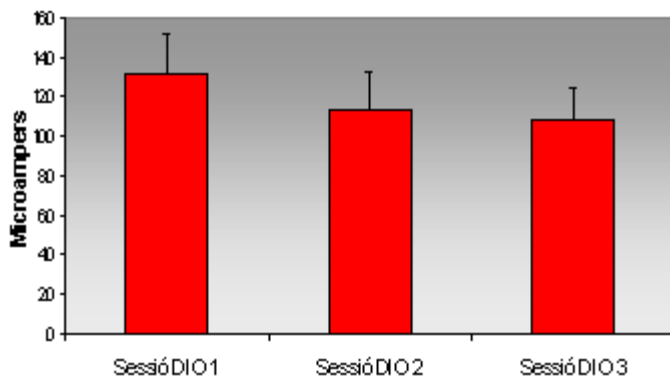


Fig. 1.3.2: Intensitats òptimes parcials d'estimulació (+EE) a les diferents sessions de DIO

minuts, per adquirir una taxa de resposta estable. Un cop adquirida es va determinar la seva intensitat òptima d'estimulació (IO) durant tres sessions de DIO. A la figura 1.3,2 es mostren els valors mitjos de les IO parcials d'AEIC per a cada sessió de DIO. Una anàlisi de la variància per a mesures repetides va posar de manifest un efecte significatiu del factor *Sessió* ( $F(2,28)=10.057$ ;

$p=0.001$ ), i en l'estudi dels contrastos polinòmics es va trobar una tendència lineal significativa ( $F(1,14)=12,747$ ;  $p=0.003$ ) que ens indica que les IO disminueixen progressivament al llarg de les sessions de DIO. La IO final, que va ser obtinguda fent la mitjana de les IO de les dues darreres sessions de DIO, va ser de 108.21 A (EE=17.96).

Per altra banda, l'anàlisi de correlacions no va trobar cap relació significativa entre els valors d'IO i les variables d'activitat locomotora i d'aprenentatge. Igualment, una prova t de comparació de mitjanes per a mostres independents no va trobar diferències significatives en els valors d'IO parcials i d'IO final entre els subjectes que van patir algun signe de convulsions i aquells que no van patir-ne (dades no mostrades).

### 1.3.2.2. Taxes de resposta

A la figura 1.3,3 es representen les taxes de resposta d'AEIC màximes (respostes/minut) per a cada sessió de DIO. Una anàlisi de la variància per a mesures repetides va indicar que el factor *Sessió* mostrava una tendència a la significació ( $F(2,26)=2.864$ ;  $p=0.075$ ). Estudiant els contrastos polinòmics es va veure que la tendència lineal era significativa ( $F(1,13)=7.004$ ;  $p=0.020$ ), reflectint l'augment en la taxa de resposta que es va donar al llarg de les sessions de DIO.

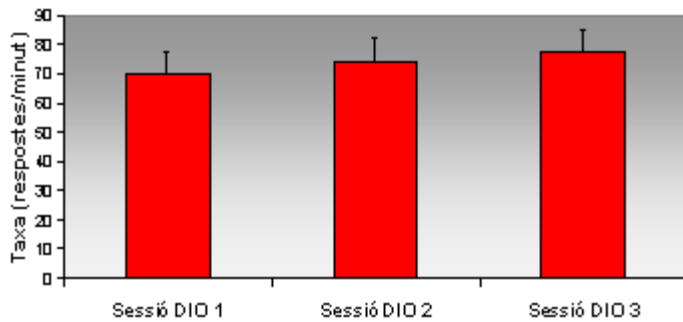


Fig. 1.3,3: Evolució de les taxes de resposta ( $\pm$ EE) al llarg de les sessions de DIO

Una prova t per a mostres independents va mostrar que els subjectes que no van presentar cap signe de convulsions en cap moment de l'experiment van obtenir una taxa de resposta en les sessions de DIO significativament més alta ( $\mu=88.4286$ ,  $EE=10.53$ ) que aquells que si van presentar algun signe de convulsions ( $\mu=58.8095$ ,  $EE=8.26$ ) ( $t(12,0.05)=-2,212$ ;  $p=0.047$ ).

Durant les sessions de tractament post-aprenentatge la taxa de resposta va ser estable, com es va comprovar amb una anàlisi de la variància per a mesures repetides. Novament, els subjectes que no van presentar cap signe de convulsions en cap fase de l'experiment, van tenir durant el tractament una taxa de resposta més alta ( $\mu=71.6454$ ,  $EE=8.19$ ) que els que si van mostrar algun signe de convulsions ( $\mu=43.5787$ ,  $EE=8.56$ ) ( $t(12,0.05)=-2,369$ ;  $p=0.035$ ). No es va observar, però, que el fet de presentar algun signe de convulsions afectés sobre l'aprenentatge posterior o l'activitat locomotora. Igualment, no es va observar que els valors de taxa de resposta durant les sessions de DIO o durant el tractament post-aprenentatge correlacionessin amb les variables d'activitat motora o d'aprenentatge.

### 1.3.2.3. Durada de les sessions de tractament

Després de cada sessió d'aprenentatge, el subjectes del grup d'AEIC rebien una sessió de tractament on s'autoadministraven 1500 trens de corrent estimulant. Van trigar 45,31 minuts ( $EE=5.50$ ) de mitjana en administrar-se el tractament, i es va comprovar amb una anàlisi de la variància per a mesures repetides que el patró d'evolució d'aquesta variable al llarg de les diferents sessions va ser estable. El temps de tractament no va correlacionar ni amb l'activitat locomotora

ni amb l'aprenentatge (dades no mostrades).

### 1.3.3. Activitat a la gàbia d'evitació activa

La variable activitat va ser avaluada mitjançant la quantitat d'encreuaments entre els dos compartiments de la gàbia d'evitació activa: 1) durant la sessió d'habitució prèvia a la primera sessió d'adquisició, consistent en deu minuts de lliure deambulació, i 2) en els intervals entre-assajos (interval variable d'un minut) de cadascuna de les sessions d'adquisició i de la sessió de retenció del condicionament.

#### 1.3.3.1. Sessió d'habitució

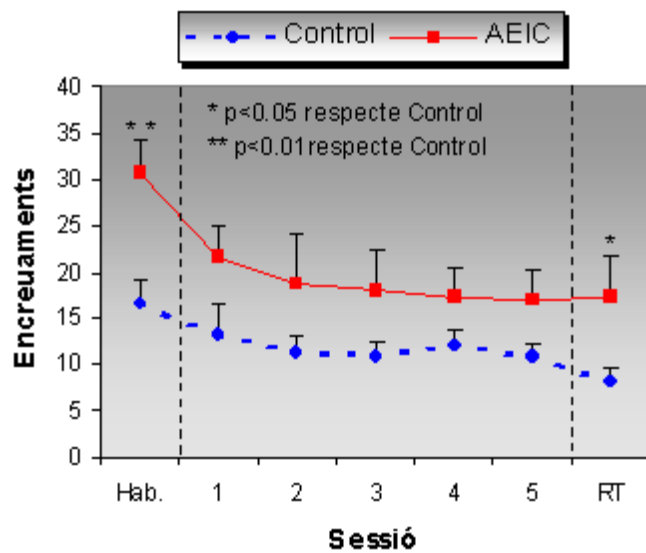


Fig. 1.3.4: Encreuaments (+EE) a la gàbia d'EV2 durant l'habitució, l'adquisició del condicionament i la retenció

Tal com es pot veure a la figura 1.3.4, en la sessió d'habitució els subjectes del grup d'AEIC van fer més encreuaments que els subjectes del grup Control ( $t(28, 0.05)=3.255$ ;  $p=0.003$ ). De tota manera, això no permet explicar les diferències en evitacions a les sessions de condicionament, ja que la correlació entre els encreuaments durant l'habitució i les evitacions a les fases d'adquisició i retenció no va ser significativa.

### 1.3.3.2. Sessions de condicionament

A la figura 1.3,4 es representa també el número d'encreuaments en les fases d'adquisició i retenció. Com va posar de manifest una anàlisi mixta de la variància, els subjectes del grup d'AEIC van fer un major número d'encreuaments que els subjectes del grup Control ( $F(1,28)=5.69$ ;  $p=0.024$ ), especialment en la sessió de retenció ( $F(1,28)=4.28$ ;  $p=0.048$ ). El factor *Sessió de Condicionament* i la seva interacció amb el factor *Grup*, però, no van ser significatius, pel que podem dir que el número d'encreuaments es va mantenir constant al llarg de totes les sessions d'adquisició i retenció pels dos grups. No es va observar cap correlació significativa amb el número d'evitacions.

### 1.3.4. Conducta d'evitació activa de dos sentits

#### 1.3.4.1. Adquisició

Com es pot veure a la figura 1.3,5, i com va mostrar una anàlisi mixta de la variància, el número d'evitacions va augmentar en ambdós grups al llarg de les sessions ( $F(4,112)=26.70$ ;  $p<0.0005$ ). El grup d'AEIC sembla beneficiar-se del tractament de manera progressiva a partir de la segona sessió d'adquisició, ja que, a partir d'aquest punt els dos grups difereixen en les seves corbes d'aprenentatge. L'estudi dels contrastos polinòmics va mostrar que tots dos grups seguien una tendència lineal, encara que significativament diferent (Contrast *Polynomial*, equació de primer ordre, *Grup x Sessió*:  $t(28,0.05)=2.533$ ;  $p=0.017$ ). L'increment en el número d'evitacions del grup d'AEIC és més accentuat, com es pot deduir dels valors de *t* i *p* (Grup AEIC: Contrast *Polynomial*, equació de primer ordre:  $t(13,0.05)=6.66209$ ;  $p<0.0005$ ), (Grup Control: Contrast *Polynomial*, equació de primer ordre:  $t(15,0.05)=3.41469$ ;  $p=0.002$ ). La diferència entre els dos grups arriba a ser màxima a la cinquena sessió d'adquisició, on el grup d'AEIC va fer significativament més evitacions que el grup Control ( $F(1,28)=5.32$ ;  $p=0.029$ ).

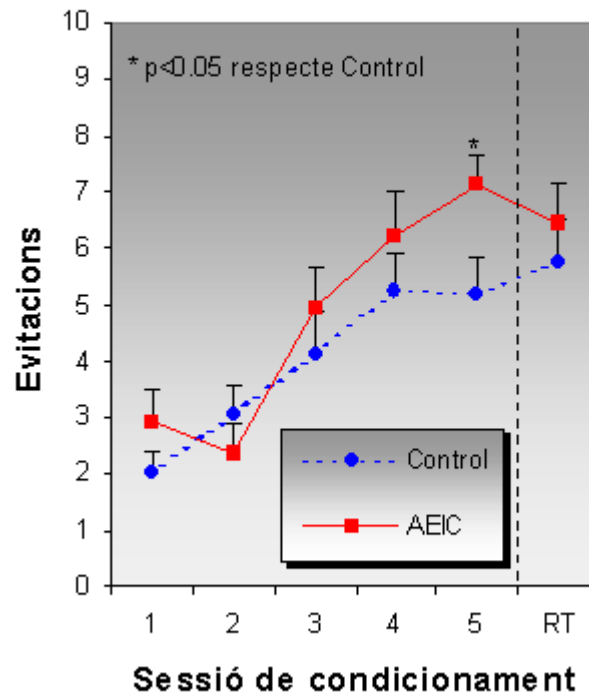


Fig. 1.3,5: Evitacions (+EE) durant l'adquisició i la retenció als 7 dies

En conclusió, podem afirmar que el tractament d'AEIC va facilitar l'aprenentatge d'EV2, ja que els subjectes tractats van fer un número d'evitacions progressivament major que els subjectes control, observant-se la diferència màxima a la cinquena sessió d'adquisició.

#### 1.3.4.2. Retenció a llarg termini (7 dies)

Els subjectes van mantenir en la retenció el número d'evitacions assolit a l'última sessió d'adquisició, no trobant-se diferències significatives entre aquestes dues fases. De tota manera, com es pot veure també a la figura 1.3,5, el número d'evitacions del grup d'AEIC va decaure lleugerament, mentre que les evitacions del grup Control van augmentar. Aquests canvis, estadísticament no significatius, van ser suficients perquè la diferència entre els dos grups no fos significativa en la fase de retenció. Per tant, si bé el tractament d'AEIC manté els seus efectes a llarg termini, no podem afirmar que hagi facilitat la retenció de l'aprenentatge d'EV2.

## 1.4. DISCUSSIÓ

### 1.4.1. Efectes de l'AEIC post-entrenament sobre l'adquisició i la retenció d'un condicionament d'EV2 en rates velles

Els resultats del present experiment mostren un efecte facilitador del tractament d'AEIC post-entrenament sobre l'adquisició del condicionament d'EV2 en rates velles (16-17 mesos), generalitzant a aquesta població d'animals els resultats obtinguts en treballs anteriors del nostre laboratori en rates joves (3-5 mesos) (Massanés-Rotger et al., 1998; Segura-Torres et al., 1988; 1991). En el present experiment, l'efecte facilitador assoleix el seu punt màxim a la cinquena i última sessió de condicionament. En canvi, a la sessió de retenció a llarg termini (7 dies), si bé tots els subjectes experimentals (AEIC i Control) mantenen el mateix nivell d'execució que a la cinquena sessió d'adquisició, la diferència entre el número d'evitacions mostrat pels animals tractats amb AEIC i els control no assoleix la significació estadística. Per aquesta raó, els resultats del present experiment no ens permeten afirmar que, en rates velles, els efectes facilitadors del tractament d'AEIC post-entrenament es mantinguin a llarg termini. Aquest resultat és contrari a l'observat en d'altres treballs del nostre laboratori realitzats amb rates joves, en els que els efectes facilitadors de l'AEIC certament sí que es mantenen a llarg termini, en proves de retenció realitzades 10 (Massanés-Rotger et al., 1998; Segura-Torres et al., 1988; 1991) o 31 dies (Segura-Torres et al., 1991) després de l'adquisició.

Els subjectes del grup d'AEIC van mostrar també una major activitat locomotora en la *shuttle-box* al llarg de les diferents fases experimentals (adaptació, adquisició i retenció a llarg termini). Aquesta major activitat locomotora en animals que han rebut AEIC ja havia estat observada en treballs previs (Schwarzberg, Roth i Sturmer, 1989), i pot ser explicada per l'increment en els nivells d'arousal simpàtic a conseqüència del tractament d'AEIC (Burgess et al., 1993). La major activitat locomotora durant la fase d'adaptació, realitzada abans de la

primera sessió de tractament d'AEIC post-entrenament és, molt possiblement, conseqüència de les sessions de determinació de la intensitat òptima d'estimulació (DIO) per les que, amb anterioritat a l'inici de les sessions de condicionament, van passar tots els subjectes del grup d'AEIC. En qualsevol cas, aquesta major activitat locomotora no pot explicar la millor adquisició del grup d'AEIC, perquè no s'ha trobat cap correlació significativa entre l'activitat locomotora i el número d'evitacions en cap de les fases experimentals. Així, mentre que l'aprenentatge augmenta de forma significativa al llarg de les sessions de condicionament, el número d'encreuaments en la *shuttle-box* es manté constant. Igualment, no s'ha observat cap correlació significativa entre les variables de la conducta d'AEIC (com la intensitat òptima d'estimulació, la taxa d'estimulació o la duració del tractament) i el nivell d'aprenentatge. Per últim, tot i que els animals del grup d'AEIC van mostrar una major pèrdua de pes després de la fase de DIO, probablement deguda a la major activitat física d'aquests subjectes a la gàbia d'AEIC, tampoc vam observar cap correlació significativa entre el pes dels animals i l'execució durant l'adquisició i la retenció del condicionament d'EV2. Per tant, considerem que la facilitació de l'aprenentatge que hem observat pot ser atribuïda al tractament d'AEIC post-entrenament i no a d'altres variables intervinents.

En dissenys distribuïts, com el del present experiment, de vegades és difícil diferenciar si un tractament post-entrenament actua sobre la consolidació de la informació adquirida en la sessió anterior o, alternativament, de forma proactiva sobre la següent sessió d'adquisició. En el nostre cas en particular, però, la distància temporal entre el final de cada sessió de tractament i l'inici de la següent sessió d'adquisició del condicionament (al voltant de 23 hores), ens porta a suggerir que la facilitació de l'adquisició del condicionament d'EV2 posada de manifest en el present experiment sembla deguda a la modulació positiva, causada pel tractament, dels processos de consolidació de la memòria entre sessions, ja que aquests estan suposadament actius en el moment en que el tractament és administrat, determinant la labilitat de la traça de memòria. Sembla, doncs, poc plausible que els efectes facilitadors observats siguin conseqüència d'un efecte proactiu del tractament d'AEIC sobre d'altres processos cognitius, com l'atenció, que poden afectar indirectament sobre l'aprenentatge i la memòria.

Com hem pogut veure, mentre que l'AEIC ha facilitat clarament la fase d'adquisició del condicionament, no ha facilitat de forma específica la seva retenció a llarg termini (en la prova de retenció realitzada 7 dies després de l'adquisició). Una possible explicació de la manca d'efecte facilitador sobre la retenció és que el número de trens d'AEIC administrats en cada sessió de tractament post-entrenament fos insuficient per mantenir els efectes a llarg termini. Aquesta hipòtesi explicativa es basa en el fet de que, tal com es va posar de manifest en un estudi paramètric realitzat al nostre laboratori (Segura-Torres et al., 1991), l'efecte facilitador de l'AEIC post-entrenament es relaciona de manera lineal i positiva amb el número de trens administrats, amb un punt màxim de facilitació als 2500 trens. En aquest mateix estudi es va observar que un tractament de 500 trens, per exemple, si bé facilitava l'adquisició del condicionament d'EV2, ho feia de manera menys potent que tractaments amb un major número de trens, i no era capaç d'afectar la retenció a llarg termini. Com hem comentat anteriorment, les rates velles del present experiment van rebre un total de 1500 trens al 100% de la seva intensitat òptima d'estimulació degut a que en experiments pilots vam observar com l'administració de 2500 trens (el tractament habitualment utilitzat en les rates joves) causava una alta freqüència de convulsions i altres conductes anòmales en aquesta població de subjectes. En conseqüència, és possible suggerir que un tractament inferior a 2500 trens, com l'utilitzat en el present experiment, sigui suficient per a facilitar l'adquisició però no la retenció a llarg termini del condicionament d'EV2. Tanmateix, no podem discernir si aquesta manca d'efecte a llarg termini és deguda a la incapacitat del tractament d'afectar específicament la consolidació a llarg termini de la informació, o bé conseqüència d'una menor facilitació de la fase d'adquisició; o fins i tot a la suma d'aquests dos factors.

#### 1.4.2. Diferències entre la facilitació de l'aprenentatge i la memòria per AEIC en rates joves (3 mesos) i en rates velles (16-17 mesos)

Per estudiar les diferències entre la facilitació de l'aprenentatge i la memòria que s'observa en animals vells i l'observada en animals joves, vam comparar els resultats d'aquest treball amb els obtinguts en un experiment d'idèntic disseny realitzat durant les mateixes dates al nostre



laboratori. Aquest segon experiment, però, va ser realitzat amb subjectes joves (3 mesos) que rebien un tractament de 2500 trens d'AEIC després de cada sessió d'adquisició (sobre un total de 5 sessions) d'un condicionament d'EV2. La resta de paràmetres experimentals eren idèntics als del present experiment. A la figura 1.4,1 es comparen aquests resultats.

Com es pot veure, mentre que en el grup de subjectes vells la facilitació només es va observar en la darrera sessió de l'adquisició, en el grup de subjectes joves l'AEIC va facilitar el condicionament d'EV2 en el conjunt de totes les sessions de la fase d'adquisició ( $F(1,74)=4.21$ ;  $p=0.044$ ), i també en la sessió de retenció ( $F(1,57)=3.70$ ;  $p=0.05$ ). A més del fet ja comentat del possible menor efecte facilitador de l'AEIC sobre l'aprenentatge i la memòria amb tractaments de menys de 2500 trens, no podem descartar la possibilitat de que el tractament d'AEIC afecti diferencialment els subjectes joves i els vells. És a dir, que faciliti l'adquisició en ambdós casos, encara que de manera més clara o potent en les rates joves, de manera que no tingui els mateixos efectes sobre la retenció a llarg termini en animals vells i joves.

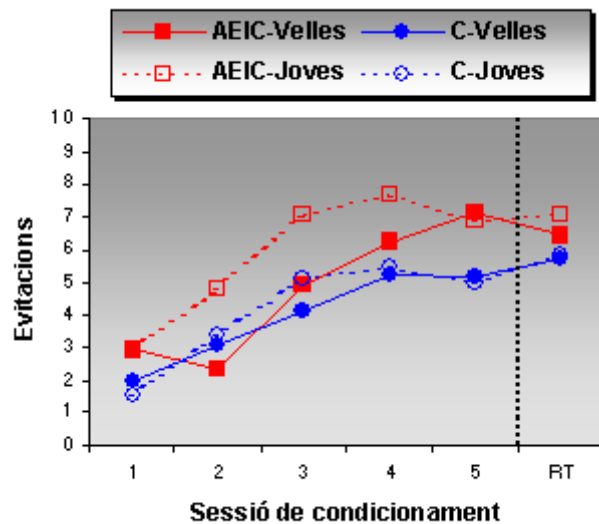


Fig. 1,4.1: Comparació del número d'evitacions per sessió ( ) entre grups de rates joves (3 mesos) i rates vells (16-17 mesos)

La possibilitat de que l'AEIC realment pogués tenir un major efecte sobre els animals joves aparentment va en contra del nostre plantejament inicial. Això podria ser degut a que, a diferència dels animals joves amb un menor nivell d'aprenentatge, els animals vells, independentment del seu nivell d'execució, presentin un substrat nerviós menys susceptible a ser afectat per tractaments moduladors. Algunes dades experimentals recolzen aquesta idea. La facilitació de l'aprenentatge i la memòria per l'AEIC del FPM s'ha relacionat amb l'activació d'alguns sistemes d'arousal central, com el colinèrgic, el dopaminèrgic o el

noradrenèrgic (Shankaranarayana Rao et al., 1998c), sistemes de neurotransmissió, tots ells afectats per l'envelliment (Finch i Roth, 1999; Wickelgren, 1996). Si bé aquestes alteracions de la bioquímica cerebral poden ser parcialment responsables dels dèficit cognitius associats a l'envelliment (Arnsten, Cai, Murphy i Goldman-Rakic, 1994; Ingram et al., 1981; Tanila, Taira, Piepponen, i Honkanen, 1994), en el present treball no semblen haver tingut un efecte significatiu sobre l'execució en la tasca d'EV2. Tanmateix, aquestes alteracions neuroquímiques poden haver determinat que l'efecte facilitador del tractament d'AEIC post-entrenament hagi estat de menor magnitud en rates velles. És a dir, tot i que els presents resultats ens permeten afirmar que el sistema nerviós dels animals vells encara conserva els mecanismes de plasticitat necessaris per a la modulació de la formació de la memòria, aquests poden ser menys efectius que els dels animals joves i, contràriament al nostre plantejament inicial, els animals vells podrien requerir un major número de trets d'AEIC per aconseguir el mateix nivell de facilitació que l'observat en els animals joves.

Un aspecte important a destacar és que l'execució dels dos grups Control, rates joves i rates velles, és gairebé idèntica. Per tant, en el present experiment l'edat no sembla haver afectat significativament al condicionament d'EV2. D'entrada es podria pensar que realment l'EV2 no és sensible a l'envelliment, però el fet que alguns autors hagin observat dèficit en l'adquisició d'aquest condicionament en rates a partir dels 18 mesos (Petkov et al., 1990), ens porta a descartar aquesta possibilitat. De fet, sembla ser que l'EV2 podria presentar dèficits relacionats amb la vellesa, però en edats més avançades que les tasques de tipus declaratiu. Així, mentre que en tasques declaratives els dèficits poden observar-se a partir dels 12 mesos d'edat (Aitken i Meaney, 1989), en la majoria de treballs en què s'han observat dèficits en l'EV2 les rates tenen edats compreses entre els 23 i els 27 mesos (Ambrosini et al., 1997; Drago et al., 1988; 1990; 1996a; Nakamura i Ishihara, 1989). Per tant, no podem descartar que en rates d'edat més avançada s'hagués pogut observar alguna mena de dèficit en l'adquisició i/o en la retenció de la tasca d'EV2 del present experiment.

En definitiva, en les condicions experimentals del present experiment, els animals vells no mostren dificultats per adquirir el condicionament d'EV2, de manera que no podem comprovar

si, en el cas de presentar dificultats d'aprenentatge, les rates velles es podrien veure especialment afavorides pel tractament d'AEIC. Per tant, malgrat que hem pogut demostrar que l'AEIC és també capaç de facilitar el condicionament d'EV2 en animals vells, no podem donar resposta al plantejament inicial de trobar uns efectes més potents del tractament d'AEIC post-entrenament en animals que partissin d'un nivell d'aprenentatge inferior, tal com s'ha observat en experiments previs del nostre laboratori (Aldavert-Vera et al., 1996). Per altra banda, tampoc podem afirmar que l'AEIC afecti diferencialment a subjectes joves i vells sense deteriorament cognitiu ja que, com hem vist i degut a raons metodològiques, ambdós grups difereixen en la quantitat de tractament administrat. Aquesta diferència creiem que pot explicar per què la facilitació del condicionament que hem obtingut en les rates velles del present experiment no és tant potent ni es manté a llarg termini com l'observada en rates joves.

#### 1.4.3. Orientacions per a posteriors treballs

Els presents resultats mostren com la relació entre l'activació del sistema del reforç del FPM i la facilitació de la memòria que s'observa en rates joves (Destrade i Jaffard, 1978, Segura-Torres et al., 1991) es pot generalitzar a la població d'animals vells, encara que els seus efectes puguin ser quantitativament diferents. Donat que l'aprenentatge d'EV2, en les nostres condicions experimentals, no s'ha mostrat sensible als efectes de l'envelliment, en posteriors treballs caldria estudiar els efectes del tractament d'AEIC en una tasca sensible a l'envelliment. Aquesta hauria de ser, molt probablement, una tasca de memòria declarativa (vegeu l'apartat 4.3. del marc teòric), però donat que no s'ha estudiat mai l'efecte del tractament d'AEIC post-entrenament sobre una tasca de memòria declarativa, seria apropiat estudiar prèviament els seus efectes en rates joves, una condició indispensable per, posteriorment, poder comparar els efectes del tractament d'AEIC sobre diferents grups d'edat. Igualment, seria convenient estudiar quines condicions són necessàries perquè el tractament d'AEIC post-entrenament produeixi en rates velles uns efectes facilitadors sobre el condicionament d'EV2 similars als observats en rates joves, és a dir, una facilitació que s'iniciï en les primeres sessions d'adquisició i es mantingui en la retenció a llarg termini.

## 2. EXPERIMENT 2

### 2.1. OBJECTIUS I HIPÒTESIS

Si, d'acord amb el plantejament general d'aquest treball, considerem que els efectes facilitadors del tractament d'AEIC post-entrenament sobre l'aprenentatge i la consolidació de la memòria són deguts als seus efectes arousalitzants, qualsevol tipus de memòria, com la memòria declarativa, s'hauria de veure també beneficiada per aquest tractament. En cap treball previ, però, s'ha estudiat l'efecte de l'AEIC post-entrenament sobre l'adquisició i retenció d'una tasca de memòria declarativa.

Per aquesta raó, aquest segon experiment té com a **principal objectiu**:

**Estudiar els efectes del tractament d'AEIC post-entrenament sobre una tasca de memòria declarativa.**

Degut a la complexitat funcional del sistema de memòria declarativa, ens hem plantejat estudiar els possibles efectes diferencials del tractament d'AEIC sobre diversos aspectes d'aquest sistema de memòria. Concretament, estudiarem els efectes de l'AEIC sobre l'adquisició d'una tasca de memòria declarativa, sobre un increment en la demanda de memòria de treball en aquesta mateixa tasca i sobre l'expressió flexible de l'aprenentatge. Finalment, també estudiarem els efectes de l'AEIC sobre la memòria a llarg termini d'aquest tipus d'aprenentatge, realitzant una prova de retenció als 15 dies.

Per assolir aquests objectius es van entrenar 3 grups de rates Wistar en un aprenentatge d'alternança en laberint en T, una tasca espacial que s'ha mostrat sensible a les lesions de

l'hipocamp (vegeu l'apartat 2.2.4. del marc teòric). Concretament, els animals havien de realitzar un aprenentatge d'alternança espacial (*non-matching to position*) demorada, segons un procediment forçat. Així, cada assaig estava compost per dues carreres; la primera d'elecció forçada (mostra) i la segona de lliure elecció (test). Els subjectes havien d'aprendre, en la segona carrera, a alternar el braç visitat en la primera. Les dues carreres estaven separades per una demora variable de temps. En el present experiment, l'aprenentatge d'aquesta tasca estava dividit en tres fases consecutives:

1. Una primera fase d'adquisició de l'alternança, amb una demora entre carreres de 10 segons (*Fase de demora 10 segons*).
2. Una segona fase on s'augmentava la demanda de memòria de treball, incrementant la demora entre carreres de 10 a 30 segons (*Fase de demora 30 segons*).
3. Una tercera fase on es valorava l'expressió flexible de l'aprenentatge invertint el punt de sortida en les carreres de lliure elecció en un 50% del assajos (*Fase de sortida inversa*).

Finalment, tots els subjectes van passar per una sessió de retenció als 15 dies de finalitzar la tercera fase. Tots els subjectes passaven per totes les fases de l'aprenentatge, canviant de fase un cop assolien un determinat criteri d'aprenentatge establert *a priori*. Els subjectes del grup d'AEIC, immediatament després de cada sessió, van rebre un tractament de 2500 trens d'AEIC al FPM, al 100% de la seva intensitat òptima d'estimulació. Els subjectes dels grups Control i Control+DIO no van passar per aquestes sessions de tractament, si bé els subjectes d'aquest últim grup van passar per les sessions de determinació de la intensitat òptima (DIO).

Si, com hem plantejat a l'inici d'aquest apartat, l'AEIC facilita l'aprenentatge i la memòria bàsicament a través dels seus efectes arousalitzants, seria d'esperar que **l'AEIC també tingués efectes facilitadors sobre la tasca de memòria declarativa utilitzada en aquest experiment.**

## 2.2. MATERIAL I PROCEDIMENT

El següent procediment experimental va ser aprovat per la *Comissió d'Ètica en l'Experimentació Animal i Humana* (CEEAH) de la Universitat Autònoma de Barcelona, i li va ser assignat el número d'ordre 781 del *Departament d'Agricultura, Ramaderia i Pesca* (DARP) de la Generalitat de Catalunya.

### 2.2.1. Subjectes

Per a la realització d'aquest experiment es van utilitzar 38 rates albines mascles de la soca Wistar procedents del nostre estabulari. A l'inici de l'experiment tenien una edat mitjana de 95.14 dies (DE=4.56) i un pes mig de 435.81 gr (DE=43.41). Al llarg de tota la fase experimental es van intentar mantenir unes condicions òptimes de benestar i salut general dels subjectes portant a terme les *good laboratory practices* que recomana la normativa vigent de "Protecció dels animals utilitzats per experimentació i altres finalitats científiques" (Directrius que especifica la Llei 5/1995 (DOGC 2073-10.7.1995, del 21 de juny), així com el decret que la regula i reglamenta (Decret 214/1997 del 30 de Juliol, DOGC 2450-7.8.97). Prenent com a referència les directrius de la *Laboratory Animal Science Association* (LASA), la severitat del procediment va ser moderada. Es va controlar l'estat dels subjectes mitjançant un protocol de supervisió, establint *a priori* uns criteris de punt final per evitar el patiment innecessari dels animals.

Els animals eren aïllats com a mínim un dia abans de les primeres manipulacions experimentals, estabulant-se en gàbies individuals de plàstic de dimensions homologades (42x26x14 cm), cobertes amb una tapa d'enreixat metàl·lic i amb un llit de serradures. La temperatura i la humitat de l'estabulari van ser controlades en tot moment, oscil·lant entre 21 i 23 °C de temperatura i un 40-70% d'humitat, i sota un cicle de llum-fosc controlat

artificialment (12x12 hores, amb les llums enceses a les 8 hores del matí). El subjectes tenien accés *ad libitum* al menjar fins a l'inici de la fase de restricció, i a l'aigua durant tot l'experiment.

## 2.2.2. Material

### 2.2.2.1. Fabricació i implantació crònica d'elèctrodes

Vegeu el punt 1.2.2.1. de Material i Procediment de l'Experiment 1.

### 2.2.2.2. Aparell d'AEIC

Vegeu el punt 1.2.2.2. de Material i Procediment de l'Experiment 1.

### 2.2.2.3. Laberint radial de vuit braços

Per avaluar l'activitat locomotora basal dels subjectes es va usar un laberint radial, elevat 60 cm del terra, amb la base de fusta negra i les parets de metacrilat transparent de 5 cm d'altura. Els braços tenien una longitud de 60 cm i 15 cm d'amplada, i partien d'una plataforma central octogonal de 37 cm de diàmetre. Entre cadascun dels braços i la plataforma central hi havia una porta de metacrilat transparent de 27 cm d'altura i 10.5 cm d'amplada, inserida en una estructura octogonal de metacrilat transparent de 35 cm d'altura que vorejava el perímetre de la plataforma central. Les portes eren controlades manualment per l'experimentador des de la posició d'observació, de manera que es podia impedir als subjectes l'entrada o la sortida de qualsevol dels braços. Els 15 cm més proximals de cada braç tenien un suplement de 10cm d'altura de metacrilat transparent afegit a la paret per tal d'evitar el pas d'un braç a l'altre sense passar per la plataforma central. El laberint estava situat a una habitació gairebé quadrada (3,60m x 3,50m x 2,90m) en una posició lleugerament desviada del centre. Una bombeta de 60W, situada 2m per sobre del punt central del laberint, il·luminava la sala. La temperatura es

mantenia constant entre 22 i 23°C.

#### 2.2.2.4. Laberint en creu

L'aprenentatge d'alternança es duia a terme en un laberint en forma de creu fet de fusta negra, amb parets de 12 cm d'altura i elevat 60 cm del terra. Els quatre braços tenien una llargada de 72 cm i una amplada de 12 cm. Els dos braços de sortida disposaven d'un compartiment de 20 cm on es podia recloure l'animal durant el temps d'espera entre carreres. Per a tal efecte, disposaven d'una porta de metacrilat negre de 27 cm d'altura, que l'experimentador controlava manualment des de la posició d'observació. Cadascun dels braços de resposta tenia una porta de metacrilat transparent de 27 cm d'altura situada a 3 cm de l'extrem proximal i controlada també manualment per l'experimentador. Aquestes portes permetien forçar l'entrada a un dels dos braços (mantenint l'altra porta tancada) i evitar el retrocés un cop el subjecte havia fet una elecció. A l'extrem distal dels braços de resposta es va fer un forat de 3 cm de diàmetre i 1.3 cm de profunditat on es col·locava el reforçador que havien de consumir els subjectes.

Per tal de disposar d'un laberint en forma de T, l'entrada a un dels dos braços de sortida estava bloquejada per un bloc de fusta negra de 20 cm d'altura i 12 cm d'amplada situat a l'extrem proximal del braç. Això obligava a que els subjectes, un cop abandonaven el compartiment de sortida, només podien triar entre els dos braços de resposta. Aquest bloc de fusta era mòbil, de forma que es podia bloquejar indistintament l'entrada a qualsevol dels dos braços de sortida. Tant a les sessions d'habitació com a les d'aprenentatge i retenció es va treballar sempre amb la disposició en forma de T. La mobilitat d'aquest bloc de separació permetia variar el punt de sortida en carreres consecutives, tal com s'explica al punt 2.2.3.4.

El laberint estava situat a la mateixa habitació que el laberint radial, descrita al punt 2.2.2.3., però per realitzar l'aprenentatge d'alternança es van col·locar diferents objectes a les parets per facilitar l'orientació dels subjectes. Una bombeta de 60W, situada 2 m per sobre del punt central del laberint, il·luminava la sala. La posició d'observació i control manual de les portes, on se situava l'experimentador, estava a un racó de la sala, actuant com un estímul més. La conducta





Fig. 2.2,1: Situació del laberint en creu a la cambra experimental. Es pot observar com està muntat a sobre del laberint radial de 8 braços i envoltat per estímuls que afavoreixen l'orientació dels subjectes. Es pot observar, també, com l'entrada al braç de sortida de la dreta està bloquejada per un bloc de fusta de dimensions superiors a les parets del laberint, el que permet obtenir una configuració de laberint en T.



Fig 2.2,2: Punt d'observació dels animals on se situava l'experimentador, amb el dispositiu de control manual d'obertura de les portes.

dels subjectes s'observava mitjançant una càmera de vídeo (Panasonic RX22) situada 2m per sobre del punt central del laberint, i connectada a un monitor (Sony Triniton KX-14CP1). La temperatura es mantenia constant entre 22-23°C. Entre els objectes que es trobaven a la sala s'inclouen els necessaris per a la realització de l'experiment, com el monitor, el taulell de control de les portes, i el propi experimentador; els propis de la sala, com dues portes, una paperera, un radiador, un aparell d'aire condicionat, un moble de fusta, un escala petita i un suport amb un rotlle de paper d'un sol ús; i una varietat d'objectes com joguines i teles de diferents formes i mides que es penjaven del sostre per quedar situats a les parets a una altura del terra d'aproximadament un metre i mig, perfectament visibles des de l'interior del laberint.

### 2.2.3. Procediment

#### 2.2.3.1. Grups

Prèviament a la implantació crònica dels elèctrodes mitjançant cirurgia estereotàctica, es va procedir a la distribució a l'atzar dels subjectes en tres condicions experimentals:

**AEIC:** implantació a l'HL dret d'un elèctrode unipolar per estimulació.

**C+DIO:** implantació a l'HL dret d'un elèctrode unipolar per estimulació. Aquests subjectes, però, només van rebre estimulació durant les sessions de DIO prèvies a l'aprenentatge (vegeu el punt 1.2.3.3.).

**CONTROL:** implantació a l'HL dret d'un elèctrode unipolar, encara que els subjectes mai van rebre estimulació.

#### 2.2.3.2. Manipulacions prèvies

##### A. Activitat locomotora basal

Per tal de controlar la possible influència del nivell d'activitat locomotora basal, abans de la

intervenció estereotàctica, aquesta variable es va mesurar en el laberint radial de vuit braços. Es va realitzar una única sessió d'una hora de durada, en la que se situava els subjectes a la plataforma central, es mantenien les portes obertes, i s'observava la seva conducta mitjançant una càmera de vídeo (Panasonic RX22) situada 2m per sobre del punt central del laberint que estava connectada a un monitor (Sony Triniton KX-14CP1) situat a un racó de la sala ocult de la visió dels subjectes per una cortina de color blanc, on se situava també l'experimentador. D'acord amb Gingras i Cools (1997), es mesuraven les següents variables:

**Exploració:** Número d'entrades als diferents braços que feia un subjecte des de l'inici de la sessió fins que s'aturava per primera vegada durant un temps de com a mínim 90 segons.

**Deambulació:** Entrades totals als diferents braços al llarg de l'hora d'observació.

Els subjectes van realitzar aquesta prova entre les 15:00h i les 18:30h per evitar diferències en l'activitat locomotora en funció dels ritmes circadianis.

## B. Cirurgia estereotàctica

La intervenció estereotàctica per implantar crònicament els elèctrodes d'estimulació es va dur a terme seguint els procediments convencionals de cirurgia i utilitzant un aparell estereotàctic (David Kopf Instruments, EUA, model 1504) amb adaptador per a rates. Prèviament a la intervenció quirúrgica, els subjectes foren anestesiats amb una combinació de ketamina al 5% (Ketolar, 50 mg., Parke Davis [Clorhidrat de 2-(o-clorofenil)-2-metilaminociclohexanona] 110mg/kg) i Rompún (Bayer [Clorhidrat de 2-(2,6-xilidino)-5,6-dihidro-4H-1,3-tiazina] 0.2 ml/kg) administrada intraperitonealment. Abans de practicar la incisió a la pell de la part superior del cap i abans també d'aplicar la sutura, es va administrar lidocaïna (Xilonibsa aerosol 10%) de forma tòpica a la zona de la ferida. El cos de l'animal es mantenia calent gràcies a una estora elèctrica. Per tal d'evitar infeccions postoperatòries s'administrava preventivament durant la intervenció una dosi única (0.2 ml, i.m.) de gentamicina (Gevramycin, Schering-Plough), un antibiòtic d'ampli espectre. Igualment, al finalitzar la

intervenció es netejava la ferida quirúrgica amb un antisèptic tòpic (Topionic-Rius). Els elèctrodes es van implantar a les fibres del FPM, a nivell de l'HL de l'hemisferi dret dels subjectes. Les coordenades estereotàctiques que es van utilitzar van ser les següents: -2.56 mm posterior a bregma, +1.8 mm lateral a la línia mitja sagital i -9.0 mm de profunditat a partir de la superfície cranial (Paxinos i Watson, 1997).

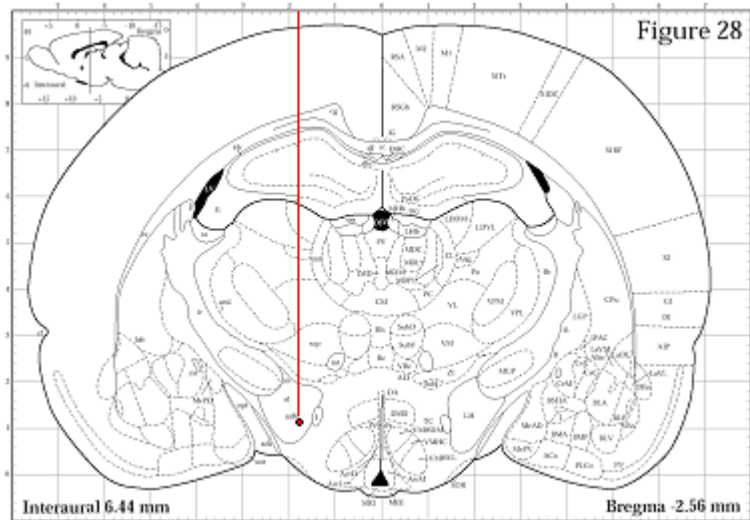


Fig. 2.2,3: Imatge de l'atles de Paxinos i Watson (1997) indicant la trajectòria de pas i la localització de l'elèctrode d'AEIC al FPM.

### C. Control de pes i handling

Durant la fase de recuperació postoperatòria, de set dies de durada, es controlava el pes dels subjectes a diari, aprofitant aquest control per fer també una sessió diària de manipulació dels animals (*handling*) per acostumar-los a ser agafats i transportats per l'experimentador. Un cop els subjectes es mostraven habituats a aquesta manipulació, simplement eren pesats cada dia al llarg de tot l'experiment.

### D. Restricció de menjar

Una setmana després de la intervenció estereotàctica s'iniciava la restricció de menjar. Per començar aquesta fase, els subjectes es mantenien durant 48 hores totalment privats.

Posteriorment, i per tal de mantenir-los al 85% del seu pes *ad libitum*, s'iniciava el programa de control de la quantitat de menjar a consumir diàriament segons la fórmula:

$$gr = 80\% ( 85\% \text{ del pes ad lib.} - \text{pes real} )$$

Els subjectes rebien un mínim de 5 gr diaris. Eren pesats cada dia a la mateixa hora de la tarda per no interferir amb les altres manipulacions experimentals, que es feien pel matí, i tot seguit es donava la quantitat de menjar que correspongués. Al llarg de tot l'experiment es va mantenir el lliure accés a l'aigua. A partir de l'inici d'aquesta fase era situada a la base de la gàbia una reixeta metàl·lica per evitar que els subjectes es mengessin el llit de flocs.

#### E. Habitució al reforçador

Durant la fase d'aprenentatge es va usar com a reforçador boletes d'arròs inflat recobertes de xocolata. Per tal d'evitar reaccions de neofòbia, durant els dos dies de privació total de menjar (vegeu apartat anterior), els subjectes tenien accés a aquest reforçador en una sessió diària d'habitució. En les dues sessions els subjectes eren col·locats a una gàbia d'establució sense serradures i amb diverses boletes escampades pel terra de la gàbia. La sessió finalitzava quan es consumien totes les boletes.

#### 2.2.3.3. Adquisició de la conducta d'AEIC i determinació de la intensitat òptima d'estimulació (DIO)

Vegeu els punts 1.2.3.2. i 1.2.3.4. de Material i Procediment de l'Experiment 1.

#### 2.2.3.4. Tasca d'alternança en laberint en T

Es va dur a terme en un laberint en creu, usant sempre, però, una configuració en forma de T (vegeu el punt 2.2.2.4.). Els animals de tots els grups van passar per les següents 3 condicions experimentals: A. Habitució, B. Adquisició de l'aprenentatge i C. Retenció de l'aprenentatge.

## A. Habitució

Prèviament a l'inici de la fase d'aprenentatge, els subjectes eren habituats a l'aparell i a les manipulacions experimentals. Tots els subjectes feien una sessió d'habitució diària, fins assolir un criteri preestablert que permetia començar la fase d'aprenentatge. Al quadre 1 s'especifiquen el procediment emprat en les sessions d'habitució. El criteri d'habitució consistia en completar cadascun dels assajos de la sessió en menys de deu segons, durant dos dies consecutius, el que indicava que un subjecte era capaç de recórrer el laberint en un temps mínim. Un cop assolit, al dia següent començava la fase d'aprenentatge. Si algun subjecte no assolía aquest criteri en 10 sessions, era eliminat de l'experiment. Només un subjecte va haver d'ésser eliminat per aquest motiu.

### **QUADRE 1. PROCEDIMENT DE LES SESSIONS D'HABITUCIÓ**

*Cada sessió es componia de deu assajos. A cada assaig se situava l'animal al compartiment de sortida del laberint en T, sense variar mai el punt de sortida. Un cop situat l'animal, s'obria la porta només d'un dels braços de resposta, que contenia el reforçador al dispensador del final del braç. La seqüència de braços reforçats era determinada per l'experimentador pseudo aleatòriament, de manera que les eleccions dels subjectes es distribuïssin per igual entre el braç de resposta dret i l'esquerra, i tenint en compte de no reforçar durant més de dos assajos consecutius el mateix braç. En els casos en que el subjecte no es movia del compartiment de sortida a l'obrir la porta, l'experimentador escampava varies boletes de reforçador pel laberint, orientant l'animal cap al braç de resposta. L'assaig es considerava finalitzat quan el subjecte consumia el reforçador del dispensador del braç de resposta.*

## B. Adquisició de l'aprenentatge d'alternança

Els subjectes havien d'aprendre una tasca d'alternança espacial (*non-matching to position*) demorada, segons un procediment forçat, guiant la seva conducta per claus al locèntriques. L'entrenament consistia en una sessió diària de 6 assajos. Cada assaig estava compost per dues carreres; la primera d'elecció forçada (mostra) i la segona de lliure elecció (test). Els subjectes havien d'aprendre, en la segona carrera, a alternar el braç visitat en la primera. Les dues carreres estaven separades per una demora variable de temps, durant la qual l'animal es mantenia reclòs al compartiment de sortida. Al quadre 2 s'explica de forma detallada el procediment emprat en les carreres d'elecció forçada i de lliure elecció. A cada sessió hi participaven dos subjectes, de grups diferents, que realitzaven alternativament els seus assajos.

En l'interval entre assajos (que coincidia amb l'execució d'un assaig de l'altre animal), cada rata restava en una gàbia d'espera. Aquest interval entre assajos fluctuava entre un i dos minuts.

#### QUADRE 2. PROCEDIMENT DE LES CARRERES D'ELECCIÓ FORÇADA

*Al començament de cada assaig es posava una boleta de reforçador al dispensador de cada braç de resposta, i s'obria la porta d'un d'aquests braços seguint un ordre pseudo aleatori prefixat que garantia la distribució dreta-esquerra al 50% i evitava que l'elecció d'un mateix braç fos correcta més de dues vegades consecutives. Se situava el subjecte al compartiment de sortida i immediatament s'obria la porta, tancant-la un cop l'animal havia sortit per tal d'evitar el retrocés. El subjecte només podia entrar a un dels dos braços de resposta, i un cop ho feia es tancava la porta al seu darrera i se'l deixava consumir el reforçador (es considerava que el subjecte havia entrat a un braç quan tenia les quatre potes dins del braç i en contacte amb el terra). Uns segons més tard, se'l treia i se'l col·locava de nou al compartiment de sortida per iniciar la carrera de lliure elecció (test).*

#### PROCEDIMENT DE LES CARRERES DE LLIURE ELECCIÓ

*A l'interval entre carreres s'obrien les dues portes dels braços de resposta. Al començar la segona carrera s'obria la porta del compartiment de sortida i es tancava un cop sortia el subjecte, que ara podia triar a quin braç de resposta entrar. Degut a que no s'havia reposat el reforçador consumit a la carrera anterior, ara només estava reforçat el braç contrari, considerant-se com un encert una entrada a aquest braç. Un cop el subjecte feia una resposta es tancava la porta al seu darrera i, si aquesta era correcta, se'l deixava consumir el reforçador. Si entrava al mateix braç que a la carrera d'elecció forçada, se'l deixava durant deu segons al braç. En qualsevol cas, posteriorment se'l tornava a la gàbia d'espera.*

L'adquisició de l'aprenentatge d'alternança es dividia en tres fases successives:

- a) **Demora 10 segons:** Interval entre carreres de 10 segons.
- b) **Demora 30 segons:** Interval entre carreres de 30 segons.
- c) **Sortida Inversa:** Interval entre carreres de 30 segons i inici de la carrera de lliure elecció des del compartiment de sortida oposat al de la carrera d'elecció forçada en un 50% dels assajos.

A les fases a) i b) el subjecte iniciava totes les carreres des del mateix compartiment de sortida, tant la d'elecció forçada com la de lliure elecció (vegeu les figures 2.2,4 i 2.2,5). La única diferència és que en el primer cas l'interval entre carreres era de 10 segons i en el segon de 30 segons. A la fase c), l'interval entre carreres era de 30 segons, però a diferència de la fase b), els subjectes iniciaven la segona carrera des del compartiment de sortida oposat al de la primera carrera en 3 dels 6 assajos de cada sessió (vegeu les figures 2.2,6 i 2.2,7 i el quadre 3).

**QUADRE 3. PROCEDIMENT DELS ASSAJOS DE SORTIDA INVERSA**

Per mantenir la configuració en T del laberint, s'aprofitava l'interval entre carreres per enretirar el bloc que impedia l'entrada al segon braç de sortida i bloquejar ara l'entrada al braç de sortida usat a la carrera d'elecció forçada. Es determinava prèviament a l'inici de la sessió quins tres assajos serien de sortida inversa a la segona carrera (assajos inversos), procurant no fer més de dos assajos inversos seguits i que en aquests assajos no fos sempre el mateix braç el reforçat a la carrera de lliure elecció.

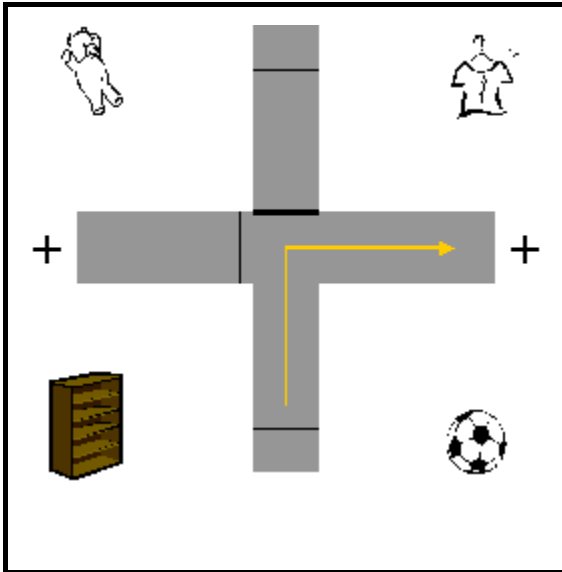


Fig. 2.2,4: Assajos no Inversos. Elecció forçada

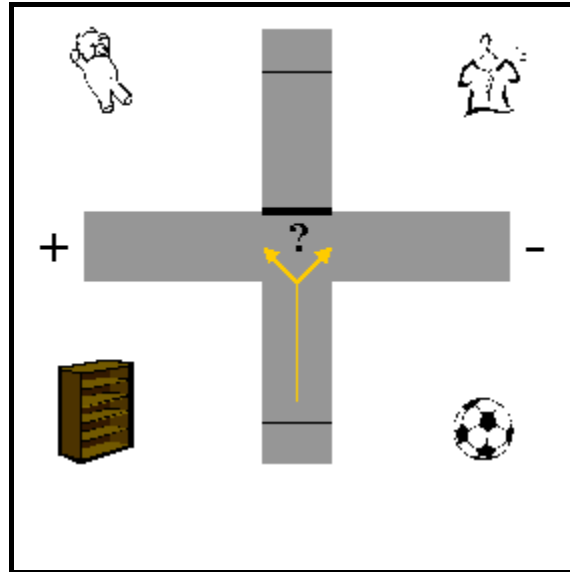


Fig. 2.2,5: Assajos no Inversos. Lliure elecció

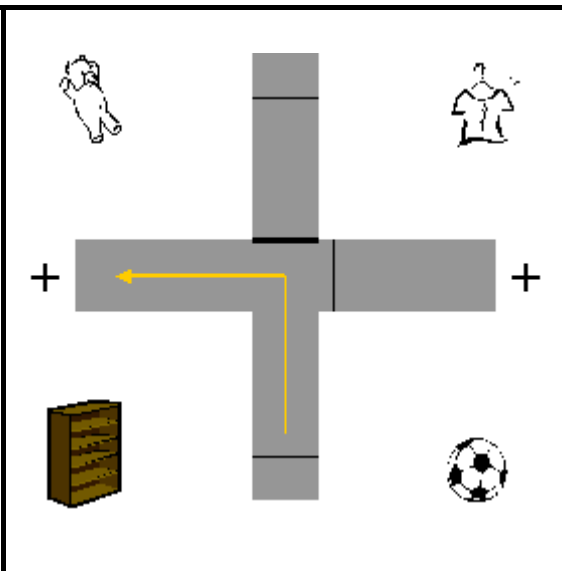


Fig. 2.2,6: Assajos Inversos. Elecció forçada

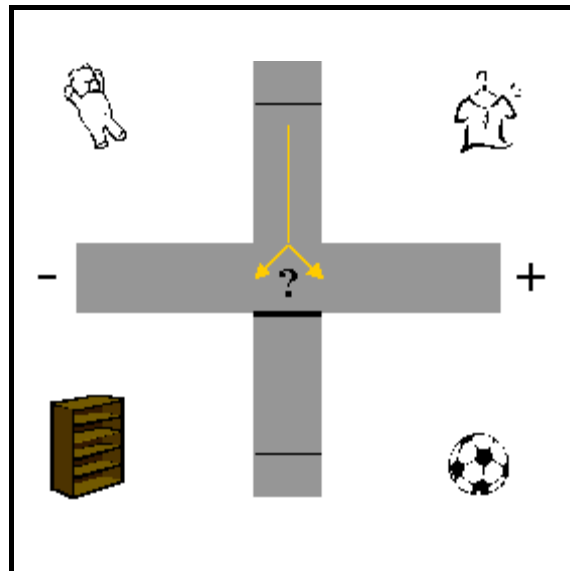


Fig. 2.2,7: Assajos Inversos. Lliure elecció



Tots els subjectes passaven per les tres fases de manera consecutiva. Per poder passar a la següent fase havien d'assolir un criteri d'aprenentatge que consistia en fer 5 eleccions correctes sobre 6 assajos, durant dues sessions consecutives. Un cop assolit el criteri, la següent sessió es feia segons les noves regles, i un cop s'assolia el criteri a la fase c), es donava per finalitzada l'adquisició de l'aprenentatge. A cada assaig s'anotava la resposta que feia el subjecte a la carrera de lliure elecció (encert o error), així com el temps invertit en completar les dues carreres. A la carrera d'elecció forçada es donava un màxim de 60 segons per respondre. Un cop transcorreguts, si el subjecte no havia fet cap resposta, es donava per finalitzat l'assaig, tornant l'animal a la gàbia d'espera. A la carrera de lliure elecció aquest temps es reduïa a 30 segons, ja que es tractava d'una prova de retenció. Com a màxim els subjectes podien realitzar 25 sessions d'adquisició de l'aprenentatge, en les quals havien de superar les fases a), b) i c).

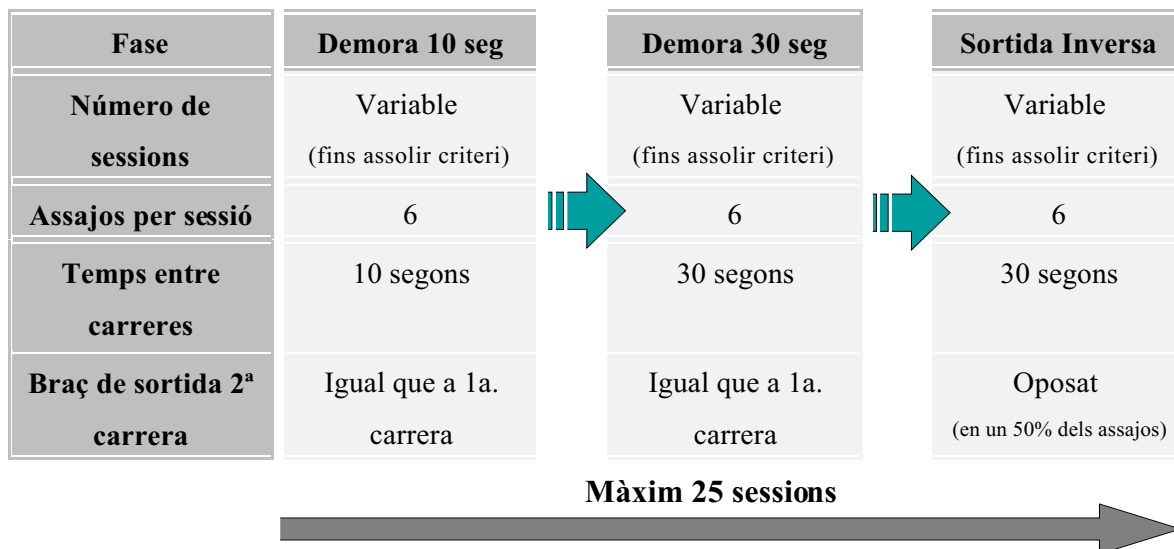


Fig. 2.2,8: Resum de l'adquisició de l'aprenentatge d'alternança

### C. Retenció de l'aprenentatge d'alternança

Un cop els subjectes havien assolit el criteri d'aprenentatge a la tercera fase de l'adquisició descansaven durant 14 dies, durant els quals no rebien cap manipulació experimental a

excepció de les necessàries per mantenir el seu pes al 85% *ad lib*. El dia 15 els subjectes feien una única sessió de retenció, que consistia en sis assajos d'iguals característiques que els de la fase de Sortida Inversa de l'adquisició. Ni abans ni després d'aquesta sessió de retenció cap subjecte va rebre tractament d'AEIC.



Fig. 2.2,9: Rata al braç de sortida del laberint en T. Aquesta fotografia correspon a una carrera d'elecció forçada, ja que només està oberta la porta d'entrada a un dels braços de resposta (el dret, situat a l'esquerra de la imatge). En primer pla, el bloc de fusta que impedeix l'entrada al braç de sortida oposat.

#### 2.2.3.5. Tractament d'AEIC

Immediatament després de cada sessió d'adquisició, els subjectes del grup AEIC rebien un tractament d'AEIC de 2500 trens de corrent a la IO de cada subjecte. S'enregistrava el temps de duració d'aquesta sessió i el número total de respostes realitzades. Els subjectes dels grups Control (Control i C+DIO) eren situats a una gàbia de Skinner com la usada pel tractament d'AEIC però sense palanca. Aquesta gàbia es trobava al costat de la de tractament, i els subjectes control hi estaven mentre un subjecte del grup d'AEIC rebia el tractament o durant un període de temps variable d'entre 30 i 45 minuts, temps habitual de duració d'una sessió

d'AEIC de 2500 trens. Un cop finalitzat el tractament, els subjectes eren retornats a les seves gàbies habituals i estabulats fins a la següent sessió d'aprenentatge.

#### 2.2.3.6. Histologia

Al final de l'experiment es va realitzar l'anàlisi histològica per verificar la localització dels elèctrodes d'AEIC. Segons procediments estàndard, es van seguir les següents fases:

- a) Perfusió del sistema vascular i fixació del teixit nerviós
- b) Extracció del cervell
- c) Obtenció de seccions seriades del teixit nerviós de 40µm de gruix mitjançant un criòstat (Cryocut 1800, JUNG)
- d) Tinció del teixit nerviós mitjançant el mètode de Violeta de Cresil
- e) Estudi de la localització intracranial de les puntes terminals dels elèctrodes d'estimulació en les diferents seccions mitjançant un negatoscopi i un aparell amplificador (SONY, model SSC-C35OP) i amb l'ajut de l'atles estereotàctic de Paxinos i Watson (1997).

#### 2.2.4. Anàlisi estadística

Les dades van ser processades amb el paquet estadístic SPSS 10.0. L'adquisició i retenció de l'aprenentatge d'alternança es va estudiar mitjançant anàlisi de la covariància per a dades mixtes, amb la variable *Grup* com a variable independent (3 categories=Control, Control+DIO, AEIC), les variables *Sessions a Criteri* i *Encerts* com a dependents quantitatives amb mesures repetides per a les diferents fases de l'aprenentatge, sobre les que es podien realitzar contrastos polinòmics, *Helmert* i *Difference* i la variable *Exploració* com a covariable. Sobre la variable independent es van estudiar els contrastos *Helmert*, *Difference* i *Simple*. La variable *Sessions a Criteri* va ser analitzada també amb l'anàlisi de la supervivència (mètode de *Kaplan-Meier*) amb els corresponents contrastos *log-rank*. L'anàlisi de la variància per a dissenys mixtos va ser

utilitzat per estudiar la conducta d'AEIC i la lateralització de la resposta. Per estudiar l'efecte d'algunes variables, com variables d'histologia o variables relacionades amb la conducta d'AEIC, en ocasions es van usar proves t de comparació de mitjanes per a dades independents i proves de  $\chi^2$  per a les variables qualitatives. Per últim, les anàlisis de correlacions es van realitzar amb la r de Pearson. El nivell de significació estadística es va fixar a  $\alpha = 0.05$ .

### 2.2.5. Resum del disseny experimental

FASE EXPERIMENTAL	GRUP		
	Control	C+DIO	AEIC
Lliure Deambulació	1 sessió de 1 hora de durada		
Descans	Entre 2 i 6 dies		
Estereotàxia	Implantació crònica d'un elèctrode a HL		
Descans	7 dies + manipulació		
Inici restricció de menjar	Dues sessions d'adaptació al reforçador		
Moldejament i DIO 1	---	Determinació Intensitat Òptima 1	
DIO 2	---	Determinació Intensitat Òptima 2	
DIO 3	---	Determinació Intensitat Òptima 3	
Habitució	Entre 2 i 10 sessions		
Adquisició aprenentatge +	Entre 7 i 25 sessions dividides en tres fases (demora 10 seg, demora 30 seg i Sortida Inversa)		
Tractament AEIC	---		2500 trens d'AEIC
Descans	14 dies		
Retenció	1 sessió tipus Sortida Inversa		

Taula 2.2,1: Resum del disseny de l'experiment 2