



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**CARACTERIZACIÓN  
ELECTROENCEFALOGRÁFICA DE LA  
RUTA SUBCORTICAL COLÍCULO  
SUPERIOR – AMÍGDALA, VÍA TÁLAMO,  
DURANTE LA ASOCIACIÓN DE  
ESTÍMULOS CONDICIONADO E  
INCONDICIONADO**

**Evaluación de la integración sensorial multimodal en  
colículo superior y amígdala**

**Melissa Andrea Netsash Cárdenas Molano**

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina

Maestría en Neurociencias

Bogotá, Colombia 2020



**CARACTERIZACIÓN  
ELECTROENCEFALOGRÁFICA DE LA  
RUTA SUBCORTICAL COLÍCULO  
SUPERIOR – AMÍGDALA, VÍA TÁLAMO,  
DURANTE LA ASOCIACIÓN DE  
ESTÍMULOS CONDICIONADO E  
INCONDICIONADO**

**Evaluación de la integración sensorial multimodal en  
colículo superior y amígdala**

**Melissa Andrea Netsash Cárdenas Molano**

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:

**Magister en Neurociencias**

Director:

Alejandro Múnera Galarza

Co-directores:

Manuel Rojas Barreto

Fernando Cardenas P.

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina, Maestría en Neurociencias

Bogotá, D.C., Colombia

2020

*Dedico este trabajo a mi familia, amigos y todo aquél que esté en este campo de conocimiento*

# Agradecimientos

Agradezco la elaboración de este trabajo a todas las personas que participaron de manera activa o pasiva en el mismo:

Fernando Cárdenas, Alejandro Múnera, Manuel Rojas, Rodrigo Martínez, Marisol Lamprea, Manuel Suárez, Jonathan Muñoz, Karen Corredor, Alexandra Elbakyan, Amori Molina, Io Catalina Gezeth Cárdenas, Jorge Martínez, Christian Camilo García, Víctor Huerta, Cécile Gauthier, Magda López y Comité Asesor de la Maestría en Neurociencias de la Universidad Nacional.

# Resumen

El Colículo Superior (CS) tiene gran relevancia para la supervivencia de los vertebrados pues es capaz de desencadenar comportamientos reflejos ante estímulos visuales sorprendidos. Se asocia anatómico-funcionalmente a otras estructuras encargadas del procesamiento emocional de estímulos potencialmente aversivos, como la Amígdala (AM). Sin embargo, a la fecha poco se sabe de la actividad electrofisiológica de dichas estructuras ante la presentación emparejada de estímulos visuales y somatosensoriales en ratas anestesiadas. El objetivo de esta investigación fue comparar la respuesta electrofisiológica en CS y AM frente a la presentación emparejada y no-emparejada de estímulos visuales y somatosensoriales en ratas bajo anestesia (uretano, 1,5 g/kg). Se utilizaron 8 ratas Wistar ( $380 \pm 20$ gr, con comida y agua *ad libitum*, ciclo luz-oscuridad de 12:12h y temperatura  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ) con electrodos de registro unilateralmente implantados en CS y AM y electrodos de estimulación en el parche de vibrisas contralateral. Se caracterizaron los componentes estables de los potenciales provocados en CS y AM por estímulos luminosos (destello de luz) y somatosensoriales (choque eléctrico en las vibrisas) no-emparejados. La presentación emparejada del estímulo visual con el somatosensorial indujo cambios en los potenciales provocados visuales en AM, pero no en CS, con respecto a la presentación no-emparejada: 1) aumento significativo de la amplitud pico a pico del componente P1N1a; y 2) aumento significativo de la potencia espectral absoluta en todas las bandas de frecuencia (a excepción de la banda theta). Al volver a presentar el estímulo visual de forma no-emparejada, los cambios anteriormente citados se revirtieron, llegando al nivel basal; además, esta segunda presentación no-emparejada del estímulo visual, provocó: 1) aumento significativo del área bajo la curva del componente N2 en CS; y 2) disminución significativa del área bajo la curva del componente P2 en AM. Estos resultados indican que los componentes tempranos del potencial provocado en AM son sensibles al emparejamiento del estímulo visual, mientras que los componentes tardíos de los potenciales provocados en CS y AM son sensibles al desemparejamiento del mismo.

## Palabras clave

Rata, Aprendizaje, Amígdala, Colículo superior, Electrofisiología

# Abstract

Superior Colliculus (SC) is a crucial structure for vertebrate survival given its role in organizing behavioral responses to unexpected visual stimuli. SC is anatomically and functionally connected with aversive stimuli processing structures such as the amygdala (AM). However, little is known about their electrophysiological activity in response to paired presentation of visual and somatosensory stimuli in anaesthetized rats. The main purpose of the present study was to compare electrophysiological activity in SC and AM during paired and unpaired presentation of visual and somatosensory stimuli in rats under anesthesia (urethane, 1,5 g/kg) Eight males Wistar rats ( $380 \pm 20$ gr, with *ad libitum* access to food and water, 12:12h light-dark cycle and temperature  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ) were implanted with unilateral recording electrodes in SC and AM and stimulating electrodes at the contralateral whisker pad. Stable components of unpaired visual (light flash) and somatosensory (whisker pad electric shock) stimuli evoked potentials in SC and AM were characterized. Paired presentation of visual and somatosensory stimuli induced significant changes in AM, but no SC visual-evoked potential: 1) increasing of P1N1a peak-to-peak amplitude; and, 2) increasing of absolute spectral power for all frequency band (except theta). A second round of unpaired presentations of visual stimuli induced reversion of the above mentioned changes; in addition, unpairing of visual stimuli induced another significant changes: 1) increased N2 area under the curve in SC; and, 2) diminished P2 area under the curve in AM. Taken together such results indicate that early components of AM evoked potential are sensitive to visual stimuli pairing, while late components of both SC and AM evoked potentials are sensitive to visual stimuli unpairing.

## Key words

Rat, Learning, Amygdala, Superior colliculus, Electrophysiology

## Tabla de Contenidos

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>X</b>
<b>LISTA DE TABLAS .....</b>	<b>XII</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>14</b>
<b>CAPÍTULO 1: CONSIDERACIONES PARTICULARES SOBRE EL SISTEMA VISUAL.....</b>	<b>18</b>
<b>CAPÍTULO 2: CONSIDERACIONES ANATOMOFISIOLÓGICAS DE LAS RESPUESTAS EMOCIONALES.....</b>	<b>22</b>
RUTA SUBCORTICAL COLÍCULO SUPERIOR – AMÍGDALA VÍA TÁLAMO: UNA APROXIMACIÓN ANATÓMICA Y ELECTROFISIOLÓGICA .....	24
<b>DEFINICIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....</b>	<b>35</b>
OBJETIVO GENERAL.....	36
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	36
HIPÓTESIS.....	37
DEFINICIÓN DE VARIABLES .....	38
<i>Variables independientes.....</i>	<i>38</i>
<i>Variables dependientes.....</i>	<i>38</i>
<b>METODOLOGÍA .....</b>	<b>39</b>
MATERIALES Y MÉTODOS .....	40
<i>Sujetos.....</i>	<i>40</i>
<i>Cirugía.....</i>	<i>40</i>
<i>Instrumentos.....</i>	<i>41</i>
<i>Procedimiento.....</i>	<i>42</i>
<i>Extracción de cerebros para análisis histológico .....</i>	<i>44</i>
<i>Análisis estadístico.....</i>	<i>45</i>
<i>Consideraciones bioéticas.....</i>	<i>45</i>
<i>Productos esperados.....</i>	<i>46</i>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>47</b>
HISTOLOGÍA .....	47
EFECTO DE LA DURACIÓN DEL ESTÍMULO LUMINOSO Y LA INTENSIDAD DEL ESTÍMULO SOMATOSENSORIAL SOBRE LOS POTENCIALES PROVOCADOS EN EL COLÍCULO SUPERIOR Y EN LA AMÍGDALA BASOLATERAL .....	48
<i>Estimulación lumínica 10 ms vs 20 ms.....</i>	<i>48</i>
<i>Estimulación eléctrica en parche de vibrisas 0,5 mA vs 2 mA.....</i>	<i>51</i>
EVOLUCIÓN DEL POTENCIAL PROVOCADO EN LA AMÍGDALA Y EL COLÍCULO SUPERIOR COMO FUNCIÓN DE LA PRESENTACIÓN NO-EMPAREJADO DE UN ESTÍMULO VISUAL QUE PREVIAMENTE HABÍA SIDO EMPAREJADO .....	55
COMPARACIÓN DE LOS PODERES ESPECTRALES .....	57
<i>Potencias Relativas .....</i>	<i>57</i>
<i>Potencias absolutas .....</i>	<i>62</i>
EVOLUCIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA AMÍGDALA Y EL COLÍCULO SUPERIOR COMO FUNCIÓN DE LA PRESENTACIÓN NO-EMPAREJADA DE UN ESTÍMULO VISUAL QUE PREVIAMENTE HABÍA SIDO EMPAREJADO – SEÑAL TRATADA CON TRANSFORMADA Z.....	67
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>76</b>
SELECCIÓN DE LA DURACIÓN DEL ESTÍMULO LUMÍNICO .....	76



SELECCIÓN DE LA INTENSIDAD DEL ESTÍMULO ELÉCTRICO.....	77
CAMBIOS EN LA RESPUESTA LUEGO DEL EMPAREJAMIENTO .....	78
PODER ESPECTRAL .....	83
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>84</b>
<b>LIMITACIONES.....</b>	<b>85</b>
<b>TRABAJOS A FUTURO .....</b>	<b>86</b>
<b>ANEXO A - ADMINISTRACIÓN DE SUSTANCIAS – PROTOCOLO.....</b>	<b>100</b>
<b>ANEXO B - CIRUGÍA ESTEREOTÁXICA PARA IMPLANTACIÓN DE ELECTRODOS– PROTOCOLO.....</b>	<b>105</b>
<b>ANEXO C – EMPAREJAMIENTO DE ESTÍMULOS– PROTOCOLO .....</b>	<b>110</b>
<b>ANEXO D - EUTANASIA POR INYECCIÓN DE KCL – PROTOCOLO .....</b>	<b>114</b>
<b>ANEXO E - CARTA AVAL COMITÉ DE BIOÉTICA.....</b>	<b>117</b>
<b>ANEXO F – TABLAS DE RESULTADOS ESTADÍSTICOS .....</b>	<b>120</b>

# Lista de Figuras

<b>FIGURA 1.</b> ESQUEMA DE LAS VÍAS VISUALES DESDE LA RETINA HASTA LOS DIFERENTES CENTROS ENCEFÁLICOS DE PROCESAMIENTO VISUAL EN HUMANOS (TOMADO Y MODIFICADO DE (MIROCHNIK & PEZARIS, 2019) .....	20
<b>FIGURA 2.</b> ESQUEMA DE LAS DIVISIONES PRINCIPALES DE LA AMÍGDALA (MIROLI, MANNELLA, & BALDASSARRE, 2010). .....	27
<b>FIGURA 3.</b> ESQUEMA DE VÍAS AMÍGDALO-CORTICALES Y AMÍGDALO-TALÁMICA RELACIONADAS DURANTE EL CONDICIONAMIENTO AVERSIVO VISUAL (SHI & DAVIS, 2001). .....	31
<b>FIGURA 4.</b> POTENCIALES EVOCADOS POR ESTÍMULO AUDITIVO DE 82 dB Y DE 102 dB (GARCIA, PAQUEREAU, VOUMBA & JAFFARD, 1998). .....	33
<b>FIGURA 5.</b> ARREGLO EXPERIMENTAL PARA LA ESTIMULACIÓN LUMINOSA .....	42
<b>FIGURA 6.</b> UBICACIÓN DE LOS ELECTRODOS EN (A) COLÍCULO SUPERIOR (40X) Y EN (B) AMÍGDALA (20X).....	47
<b>FIGURA 7.</b> PROMEDIOS INTERSUJETOS DE LOS POTENCIALES PROVOCADOS POR UN ESTÍMULO LUMINOSO DE 20MS .....	49
<b>FIGURA 8.</b> POTENCIAL PROVOCADO POR ESTÍMULOS LUMINOSOS DE DIFERENTE DURACIÓN (10 VS. 20MS).....	50
<b>FIGURA 9.</b> GRANDES PROMEDIOS DE LA SEÑAL COMPARANDO EL EFECTO DE UN ESTÍMULO ELÉCTRICO EN PARCHES DE VIBRISAS (0,5 VS 2 MA) EN (A) CS Y (B) AM.....	52
<b>FIGURA 10.</b> GRANDES PROMEDIOS DE LA SEÑAL COMPARANDO LOS SP (SPIKE POTENTIAL) DE UN ESTÍMULO ELÉCTRICO EN PARCHES DE VIBRISAS (0,5 VS 2 MA) EN (A) CS Y (B) AM.....	54
<b>FIGURA 11.</b> GRANDES PROMEDIOS DE LA SEÑAL COMPARANDO EL EFECTO DE UN ESTÍMULO LUMÍNICO 20 MS PARA NO EMPAREJADO 1, EMPAREJADO Y NO EMPAREJADO 2, EN CS (A) Y AM (B). (A). .....	56
<b>FIGURA 12.</b> COMPARACIÓN DE POTENCIAS RELATIVAS PARA LAS SEÑALES CAPTADAS EN CS Y AM DURANTE LA APLICACIÓN DE DIFERENTES ESTÍMULOS, LUZ 10 MS Y 20 MS (A Y B).....	58
<b>FIGURA 13.</b> COMPARACIÓN DE POTENCIAS RELATIVAS DE LAS SEÑALES CAPTADAS DURANTE LA PRESENTACIÓN DE UN ESTÍMULO LUMÍNICO DE 20 MS DE DURACIÓN EN CS VS AM.....	59
<b>FIGURA 14.</b> COMPARACIÓN DE POTENCIAS RELATIVAS PARA LAS SEÑALES REGISTRADAS EN CS Y AM DURANTE LA APLICACIÓN DE UN ESTÍMULO LUMÍNICO NO EMPAREJADO 1, EMPAREJADO Y NO EMPAREJADO 2 (A Y B).....	61
<b>FIGURA 15.</b> COMPARACIÓN DE POTENCIAS ABSOLUTAS PARA LAS SEÑALES CAPTADAS EN CS Y ABL DURANTE LA APLICACIÓN DE DIFERENTES ESTÍMULOS, LUZ 10 MS Y 20 MS (A Y B).....	63
<b>FIGURA 16.</b> COMPARACIÓN DE POTENCIAS ABSOLUTAS DE LAS SEÑALES REGISTRADAS DURANTE LA PRESENTACIÓN DE UN ESTÍMULO LUMÍNICO DE 20 MS DE DURACIÓN EN CS VS AM. ....	64
<b>FIGURA 17.</b> COMPARACIÓN DE POTENCIAS ABSOLUTAS PARA LAS SEÑALES REGISTRADAS EN CS Y AM DURANTE LA APLICACIÓN DE ESTÍMULO LUMÍNICO NO EMPAREJADO 1, EMPAREJADO Y NO EMPAREJADO 2 (A Y B).....	66
<b>FIGURA 18.</b> GRANDES PROMEDIOS DE LA SEÑAL LUEGO DE LA TRANSFORMADA Z COMPARANDO EL EFECTO DE UN ESTÍMULO LUMÍNICO 20 MS PARA NO EMPAREJADO 1, EMPAREJADO Y NO EMPAREJADO 2 EN CS (A) Y AM (B).....	67
<b>FIGURA 19.</b> COMPARACIÓN DEL EFECTO DE UN ESTÍMULO LUMÍNICO 20 MS PARA NO EMPAREJADO 1, EMPAREJADO Y NO EMPAREJADO 2 EN CS PARA P1N1(A), N1P2 (B), P2N2 (C). .....	69
<b>FIGURA 20.</b> COMPARACIÓN DEL EFECTO DE UN ESTÍMULO LUMÍNICO 20 MS PARA NO EMPAREJADO 1, EMPAREJADO Y NO EMPAREJADO 2 EN AM PARA P1N1A (A), N1A1B (B), N1BP2 (C).....	70
<b>FIGURA 21.</b> GRANDES PROMEDIOS DE LA SEÑAL POSITIVA LUEGO DE LA TRANSFORMADA Z COMPARANDO EL EFECTO DE UN ESTÍMULO LUMÍNICO 20 MS PARA NO EMPAREJADO 1, EMPAREJADO Y NO EMPAREJADO 2 EN CS (A) Y ABL (B). .....	71
<b>FIGURA 22.</b> COMPARACIÓN DEL EFECTO DE UN ESTÍMULO LUMÍNICO 20 MS EN LA SEÑAL POSITIVA PARA NO EMPAREJADO 1, EMPAREJADO Y NO EMPAREJADO 2 EN CS PARA P1N1(A), N1P2 (B), P2N2 (C). .....	72
<b>FIGURA 23.</b> COMPARACIÓN DEL EFECTO DE UN ESTÍMULO LUMÍNICO 20 MS EN LA SEÑAL POSITIVA PARA NO EMPAREJADO 1, EMPAREJADO Y NO EMPAREJADO 2 EN AM PARA P1N1A (A), N1A1B (B), N1BP2 (C). .....	73
<b>FIGURA 24.</b> COMPARACIÓN DEL EFECTO DE UN ESTÍMULO LUMÍNICO 20 MS EN EL ÁREA BAJO LA CURVA PARA NO EMPAREJADO 1, EMPAREJADO Y NO EMPAREJADO 2 EN CS PARA P1N1(A), N1P2 (B), P2N2 (C).....	74

**FIGURA 25.** COMPARACIÓN DEL EFECTO DE UN ESTÍMULO LUMÍNICO 20 MS EN EL ÁREA BAJO LA CURVA PARA NO EMPAREJADO 1, EMPAREJADO Y NO EMPAREJADO 2 EN ABL PARA P1N1A (A), N1AN1B (B), N1BP2 (C). .....75

## Lista de Tablas

<b>TABLA 1.</b> COMPARACIONES DE LA AMPLITUD PICO A PICO DE LOS DIFERENTES COMPONENTES DEL POTENCIAL EVOCADO POR DOS ESTÍMULOS LUMÍNICOS EN COLÍCULO SUPERIOR.....	121
<b>TABLA 2.</b> COMPARACIONES DE LA AMPLITUD PICO A PICO DE LOS DIFERENTES COMPONENTES DEL POTENCIAL EVOCADO POR DOS ESTÍMULOS LUMÍNICOS EN AMÍGDALA .....	121
<b>TABLA 3.</b> COMPARACIONES DE LA AMPLITUD PICO A PICO DEL COMPONENTE NP1 DEL POTENCIAL EVOCADO POR DOS ESTÍMULOS LUMÍNICOS EN COLÍCULO SUPERIOR Y EN AMÍGDALA.....	121
<b>TABLA 4.</b> COMPARACIONES DE LA AMPLITUD PICO A PICO DE LOS POTENCIALES DE ACCIÓN POBLACIONALES SUSCITADOS POR DOS ESTÍMULOS ELÉCTRICOS EN COLÍCULO SUPERIOR Y EN AMÍGDALA.....	122
<b>TABLA 5.</b> COMPARACIONES DE LOS COMPONENTES DE LOS POTENCIALES EVOCADOS SUSCITADOS POR UN ESTÍMULO LUMÍNICO DE 20 MS NO EMPAREJADO 1, EMPAREJADO Y NO EMPAREJADO 2 PARA COLÍCULO SUPERIOR .....	122
<b>TABLA 6.</b> COMPARACIONES DE LOS COMPONENTES DE LOS POTENCIALES EVOCADOS SUSCITADOS POR UN ESTÍMULO LUMÍNICO DE 20 MS NO EMPAREJADO 1, EMPAREJADO Y NO EMPAREJADO 2 PARA COLÍCULO SUPERIOR .....	122
<b>TABLA 7.</b> COMPARACIONES DE LAS BANDAS DE FRECUENCIA RELATIVAS ENTRE UN ESTÍMULOS LUMÍNICOS (10 MS VS 20 MS) Y LUZ DE DURACIÓN 20 MS EN LAS FASES DE NO EMPAREJADO 1, EMPAREJADO Y NO EMPAREJADO 2 PARA COLÍCULO SUPERIOR .....	123
<b>TABLA 8.</b> COMPARACIONES DE LAS BANDAS DE FRECUENCIA RELATIVAS ENTRE UN ESTÍMULOS LUMÍNICOS (10 MS VS 20 MS) Y LUZ DE DURACIÓN 20 MS EN LAS FASES DE NO EMPAREJADO 1, EMPAREJADO Y NO EMPAREJADO 2 PARA AMIGDALA .....	123
<b>TABLA 9.</b> COMPARACIONES DE LAS BANDAS DE FRECUENCIA RELATIVAS DURANTE UN ESTÍMULO LUMÍNICO DE 20 MS DE DURACIÓN PARA COLÍCULO SUPERIOR VS AMIGDALA .....	124
<b>TABLA 10.</b> COMPARACIONES DE LAS BANDAS DE FRECUENCIA ABSOLUTAS ENTRE UN ESTÍMULOS LUMÍNICOS (10 MS VS 20 MS) Y LUZ DE DURACIÓN 20 MS EN LAS FASES DE NO EMPAREJADO 1, EMPAREJADO Y NO EMPAREJADO 2 PARA COLÍCULO SUPERIOR .....	124
<b>TABLA 11.</b> COMPARACIONES DE LAS BANDAS DE FRECUENCIA ABSOLUTAS ENTRE UN ESTÍMULOS LUMÍNICOS (10 MS VS 20 MS) Y LUZ DE DURACIÓN 20 MS EN LAS FASES DE NO EMPAREJADO 1, EMPAREJADO Y NO EMPAREJADO 2 PARA AMIGDALA .....	124
<b>TABLA 12.</b> COMPARACIONES DE LAS BANDAS DE FRECUENCIA ABSOLUTAS DURANTE UN ESTÍMULO LUMÍNICO DE 20 MS DE DURACIÓN PARA COLÍCULO SUPERIOR Y AMÍGDALA .....	125
<b>TABLA 13.</b> COMPARACIONES DE AMPLITUD PICO A PICO DE TRES DIFERENTES RANGO DE LA SEÑAL REGISTRADA EN COLÍCULO SUPERIOR (40 -70 MS, 70 150 MS Y 150 300 MS) DURANTE LA PRESENTACIÓN DE UN ESTÍMULO LUMINOSO DE 20 MS NO EMPAREJADO 1, EMPAREJADO Y NO EMPAREJADO 2.....	125
<b>TABLA 14.</b> COMPARACIONES DE AMPLITUD PICO A PICO DE TRES DIFERENTES RANGO DE LA SEÑAL REGISTRADA EN AMÍGDALA (30 - 60 MS, 60- 100 MS Y 100 - 200MS) DURANTE LA PRESENTACIÓN DE UN ESTÍMULO LUMINOSO DE 20 MS NO EMPAREJADO 1, EMPAREJADO Y NO EMPAREJADO 2 .....	125
<b>TABLA 15.</b> COMPARACIONES DE AMPLITUD PICO A PICO DE TRES DIFERENTES RANGO DE LA SEÑAL POSITIVA REGISTRADA EN COLÍCULO SUPERIOR (40 -70 MS, 70 150 MS Y 150 300 MS) DURANTE LA PRESENTACIÓN DE UN ESTÍMULO LUMINOSO DE 20 MS NO EMPAREJADO 1, EMPAREJADO Y NO EMPAREJADO 2 .....	126
<b>TABLA 16.</b> COMPARACIONES DE AMPLITUD PICO A PICO DE TRES DIFERENTES RANGO DE LA SEÑAL POSITIVA REGISTRADA EN AMÍGDALA (30 - 60 MS, 60- 100 MS Y 100 - 200MS) DURANTE LA PRESENTACIÓN DE UN ESTÍMULO LUMINOSO DE 20 MS NO EMPAREJADO 1, EMPAREJADO Y NO EMPAREJADO 2.....	126
<b>TABLA 17.</b> COMPARACIONES DEL AREA BAJO LA CURVA DEL PICO A PICO DE TRES DIFERENTES RANGO DE LA SEÑAL POSITIVA REGISTRADA EN COLÍCULO SUPERIOR (40 -70 MS, 70 150 MS Y 150 300 MS) DURANTE LA PRESENTACIÓN DE UN ESTÍMULO LUMINOSO DE 20 MS NO EMPAREJADO 1, EMPAREJADO Y NO EMPAREJADO 2.....	126
<b>TABLA 18.</b> COMPARACIONES DEL AREA BAJO LA CURVA DEL PICO A PICO DE TRES DIFERENTES RANGO DE LA SEÑAL POSITIVA REGISTRADA EN AMÍGDALA (30 - 60 MS, 60- 100 MS, 100 - 200MS Y 200 A 300MS) DURANTE LA PRESENTACIÓN DE UN ESTÍMULO LUMINOSO DE 20 MS NO EMPAREJADO 1, EMPAREJADO Y NO EMPAREJADO 2. ....	127



## **Introducción**

La relación que el animal establece con su medio ambiente se da a partir de sus sistemas sensoriales, los cuales son muy variados, dependiendo en gran medida de las características de los nichos en que se desarrollaron. Existen de diferentes entradas sensoriales que facilitan la interacción del sujeto con su ambiente, estas permiten que la información llegue a estructuras que pueden integrar diferentes modalidades sensoriales de los estímulos externos y esto en últimas está relacionado con los procesos de aprendizaje. El sistema visual de los vertebrados posee diferentes características propias a la adaptación del sujeto a su entorno. El procesamiento visual es realizado en diferentes regiones del encéfalo. La información captada por los fotorreceptores presentes en la retina (conos y bastones) es transmitida en paralelo, por el nervio óptico, hacia varios centros encefálicos de procesamiento. Cada uno de estos diferentes centros de procesamiento (corteza occipital, colículos superiores, núcleo supraquiasmático del hipotálamo, núcleos motores del tronco cerebral y núcleo pretectal) posee una función particular (Purves, Augustine, Fitzpatrick, Klajn, & Argüelles Luis, 2017).

En general, el procesamiento realizado en la corteza occipital lleva a la percepción consciente y la función discriminativa visual, mientras que el procesamiento en los colículos superiores permite la realización de reflejos rápidos de acomodación de ojos y cabeza ante estímulos sorpresivos. El procesamiento realizado en las otras estructuras se relaciona con el control de los ritmos circadianos – para el núcleo supraquiasmático – con reflejos oculares de acomodación a la luz y a la distancia – en el caso del núcleo pretectal – y con la ejecución de otros reflejos visuales (Lent, 2010; Splittgerber & Snell, 2019).

Por su parte, la vía que parte de la retina llegando hasta el colículo superior, se relaciona con la ejecución de movimientos reflejos de orientación de la cabeza, el cuello y el cuerpo, hacia objetos presentes en el campo visual (Dean & Redgrave, 1984; Westby, Keay, Redgrave, Dean, & Bannister, 1990). La información que da inicio a estas actividades reflejas es específicamente el cambio súbito de las representaciones retinianas, que pueden estar señalizando el movimiento de aproximación rápida de un objeto (Boehnke et al., 2011; Maior et al., 2011). Por esta razón, los estímulos que más efectivamente excitan las neuronas del colículo superior son cambios muy rápidos de la iluminación (destellos lumínicos) y no cambios en la intensidad de los estímulos (Overton, Dean, & Redgrave, 1985; Dyer & Annau, 1977).

Se ha demostrado que la organización laminar del colículo superior (que será analizada en mayor detalle posteriormente), implica que las capas profundas reciben específicamente información proveniente de la retina, mientras que en las capas profundas confluye información visual y de otras modalidades sensoriales, tales como auditiva y somatosensorial. Esta organización, permite una primera integración polimodal en las capas profundas, pero no en las superiores. Esta especialización funcional fue reportada por Gharaei y colaboradores en 2018, al demostrar que las neuronas de las capas superficiales responden exclusivamente ante estímulos visuales, mientras que en las capas profundas existen neuronas que pueden responder ante estímulos visuales y somatosensoriales (en este caso, provenientes del parche de vibrisas), permitiendo suponer así una posible integración polimodal en las capas intermedias y profundas (Gharaei, Arabzadeh, & Solomon, 2018).

El hecho de que una gran parte de la información proveniente de la retina esté relacionada con la realización de reflejos visuales, mientras que otra parte se relacione con la emisión de respuestas instrumentales, implica que los estímulos visuales suscitan reacciones

emocionales que eventualmente pueden estar implicadas en la activación de estructuras de integración multimodal como la amígdala y el colículo superior (Josselyn & Frankland, 2018). Es bien sabido que estos estímulos visuales han sido utilizados para generar respuestas emocionales una vez condicionados (Koutalidis, Foster, & Weisz, 1988; Leal-Campanario, Delgado-Garcia, & Gruart, 2006; Debiec & LeDoux, 2004; LeDoux, Iwata, Pearl, & Reis, 1986; Root et al., 2009), esto puede ser evaluado a través de diferentes medidas como por ejemplo el sobresalto o de vocalizaciones (Pezze, Marshall, Domonkos, & Cassaday, 2016; Walker et al., 2009).

En relación con la emisión de respuestas emocionales, se sabe que la amígdala es la estructura crucial, ya que a ella llega información de todas las modalidades sensoriales (Splittgerber & Snell, 2019; Purves et al., 2017) y es a partir de ella que surgen algunos de los comandos emocionales (LeDoux, 2012), sobre todo los relacionados con las reacciones de miedo (Mobbs et al., 2019; Wigstrand, Schiff, Fyhn, LeDoux, & Sears, 2017; Campese et al., 2016; LeDoux, 2014). Así, estudiando el sistema auditivo, Joseph LeDoux determinó que el circuito de comunicación cuerpo geniculado medial, amígdala lateral, amígdala central y sustancia gris periacueductal central, era el encargado, no sólo del procesamiento aversivo de los estímulos auditivos, sino también de su aprendizaje y de su memorización (LeDoux, Sakaguchi, Iwata, & Reis, 1986; LeDoux, Sakaguchi, Iwata, & Reis, 1985).

Igualmente, se han realizado estudios que involucran otros circuitos subcorticales relacionados con las rutas y estructuras de procesamiento de estímulos visuales o de integración multimodal. Muchos de estos estudios utilizaron lesiones a nivel cortical o estimulación específica de ciertos tipos celulares (p. ej. utilizando optogenética) e inclusive ablación de las estructuras de relevo sináptico subcortical (Le et al., 2019; Wei et al., 2015; Shi & Davis, 2001).



En todos estos estudios se ha propuesto la existencia de áreas o incluso neuronas particulares capaces de modificar (mediante la presentación repetida y contingente) sus patrones de actividad para responder polimodalmente.

Pese a la aparente similitud anatómica, en cuanto a la participación de los colículos – inferiores en el caso de la audición y superiores en el caso de la visión – y de los cuerpos geniculados del tálamo – mediales en el caso de la audición y laterales en el caso de la visión – existe una diferencia crucial entre los dos sistemas: en el caso del sistema visual, la proyección iniciada en los cuerpos geniculados laterales solamente alcanza la corteza occipital para el procesamiento discriminativo y no tiene conexión con el colículo superior, contrario a la relación que hay entre el colículo inferior y el tálamo medial (Purves et al., 2017; Redolar Ripoll, 2017). Además, en el caso de la vía auditiva, el paso por el colículo inferior puede ser considerado como parte de un sistema de comunicación serial, mientras que, en el caso de la vía visual, el paso por el colículo superior hace parte de una comunicación en paralelo.

De hecho, hasta este momento no es totalmente claro cómo las rutas subcorticales que llevan información a la amígdala están implicadas en la mediación de los procesos plásticos requeridos para el aprendizaje y memoria de las cualidades emocionales asociadas a eventos visuales, mediados por esta estructura (Wei et al., 2015; De & Codispoti, 2015; Harris et al., 2015; Maior et al., 2011; Doron & LeDoux, 1999). En este punto vale la pena mencionar los trabajos realizados por Rüdiger Linke y colaboradores (Linke, De Lima, Schwegler, & Pape, 1999; Yilmazer-Hanke, Faber-Zuschratter, Linke, & Schwegler, 2002), quienes, con el uso de marcadores anterógrados y retrógrados demostraron la existencia de una proyección desde el colículo superior hasta el núcleo supragenículado y algunos núcleos talámicos adyacentes y desde todos ellos hasta la amígdala lateral. Esta vía podría ser una de las responsables de la

transmisión de la información visual hacia la amígdala para su procesamiento emocional. Sin embargo, hasta la fecha no se tienen datos en profundidad sobre su funcionamiento de estas rutas subcorticales en ratas Wistar. Sin embargo, se sabe que la estimulación de neuronas particulares de las capas superficiales del colículo superior ocasiona cambios electrofisiológicos en regiones del tálamo, tales como el geniculado lateral posterior como en la amígdala lateral en ratones (Wei et al., 2015).

De acuerdo con este vacío en el conocimiento en este trabajo se buscó determinar los cambios electrofisiológicos en la ruta que va de colículo superior hacia la amígdala luego de la presentación asociativa de un estímulo lumínico y un estímulo eléctrico en el parche de vibrisas. La existencia de este cambio de la actividad electrofisiológica indicaría un proceso de plasticidad sináptica en dicha estructura que podría permitir una mejor comprensión de los mecanismos celulares que median la formación de memorias aversivas, ya que se ha demostrado que la amígdala es la estructura crucial para la formación de dichas memorias (LeDoux, 2003). Buscando comprender mejor el papel de la amígdala en el procesamiento de estímulos potencialmente aversivo, se realizará a continuación una breve revisión de este particular.

## **Capítulo 1: Consideraciones particulares sobre el sistema visual**

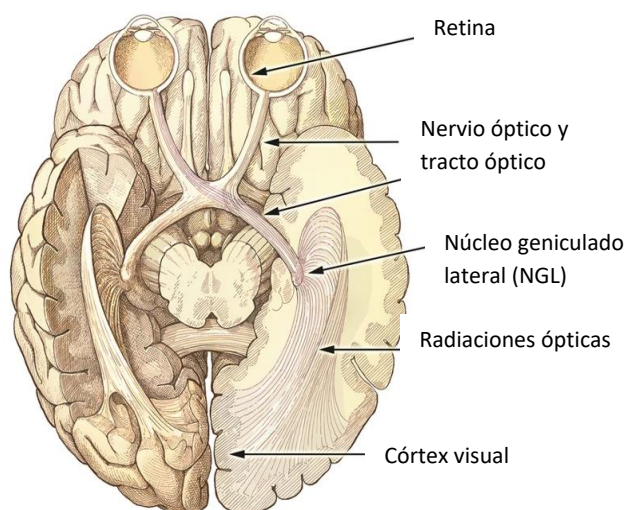
El sistema visual de los vertebrados corresponde a un sistema de percepción de distancia y por tanto posee algunas características particulares compartidas por otros sistemas de distancia, tal como el auditivo y el olfativo. Una de estas características es la presencia de receptores sensoriales capaces de activarse diferencialmente por una amplia variedad de

estímulos, en este caso estímulos visuales, correspondientes específicamente a una pequeña porción de la radiación electromagnética, denominada “radiación luminiscente”. Para cada especie, dependiendo de las cualidades de sus propios fotorreceptores, la gama de esta radiación que es percibida puede variar (Schiffman, 2004; Goldstein, Blanco, & Sampedro Suárez, 2009). Además de la visión de características como los bordes, los contrastes y el movimiento, muchos animales pueden ver el color. Para la visión del color, los fotorreceptores poseen algunos pigmentos particulares que les permiten reaccionar selectivamente ante determinadas longitudes de onda. En el caso de los seres humanos, los conos pueden poseer uno de tres pigmentos y a partir de las diversas combinaciones de fotorreceptores alcanzados por los estímulos visuales, se obtiene la visión de color, llamada visión cromática (Goldstein et al., 2009; Schiffman, 2004). En el caso de las ratas, por ejemplo, el único pigmento existente en sus fotorreceptores le hace que su visión no sea cromática, de forma que no hay visión de color, salvo algunas tonalidades de rojo oscuro y grises (Whishaw & Kolb, 2005).

Las retinas de los mamíferos poseen, varias capas de células, organizadas de forma tal que son las células ganglionares, las que poseen axones largos que, al salir de la retina, forman el nervio óptico (Splittgerber & Snell, 2019). De esa forma, una vez realizado el proceso de transducción de la estimulación visual en los fotorreceptores, se da un procesamiento local en la retina que alcanza a esta capa de células ganglionares. Existen tres diferentes tipos de células ganglionares denominadas X, Y e W, presentes en muchos mamíferos. Las células ganglionares del tipo W predominan en la periferia de la retina y su función es la detección de movimientos rápidos, mientras que las células ganglionares del tipo X, predominan en la mácula y su función se relaciona más con la percepción del color. Ya las células del tipo Y se relacionan más con la percepción de las variaciones súbitas de la intensidad lumínica (Purves et al., 2017). Dentro de

esta diversidad de células ganglionares de la retina, existe un grupo de células ganglionares que mandan información únicamente a cuerpo geniculado lateral y al colículo superior (Kay et al., 2011).

Entonces, esta salida de información desde la retina, origina un sistema de procesamiento distribuido o en paralelo que garantiza el procesamiento simultáneo de diversos aspectos visuales por diferentes regiones del encéfalo (Purves et al., 2017). La figura 1 muestra un dibujo de las vías visuales desde la retina hasta los diferentes centros encefálicos de procesamiento.



**Figura 1.** Esquema de las vías visuales desde la retina hasta los diferentes centros encefálicos de procesamiento visual en humanos (tomado y modificado de (Mirochnik & Pezaris, 2019))

En concreto, el nervio óptico avanza por la base del cerebro formando el quiasma óptico y dando lugar a varias proyecciones:

- Una primera vía termina, luego de un relevo en el núcleo geniculado lateral del tálamo, en la corteza occipital. El procesamiento en la corteza occipital permite la percepción “consciente” del estímulo visual, generando el proceso de discriminación visual (Reinagel, 2001; Petruno, Clark, & Reinagel, 2013; Reinagel, 2001) y permitiendo percepción de tridimensionalidad y de colores (Kraft et al., 2014), los

cuales se dan más allá de la corteza visual primaria, en las cortezas extraestriadas (Redolar Ripoll, 2017; Purves et al., 2017).

- Una segunda vía, termina en el núcleo supraquiasmático del hipotálamo y es la encargada del control de los ritmos circadianos de actividad principalmente endocrina (Urtubia, 2006; Redolar Ripoll, 2017).
- Existe una tercera vía que termina en los núcleos pretectales, o *pretectum* mesencefálico (núcleo pretectal anterior, núcleo pretectal medial, núcleo pretectal posterior, núcleo del tracto óptico, núcleo limitante posterior, núcleo olivar pretectal y el área comisural pretectal). Esta vía está encargada de la generación de varios reflejos visuales incluyendo, por ejemplo, aquellos relacionados con la acomodación a la luz y a la distancia, por medio del control parasimpático del núcleo de Edinger-Westphal (Purves et al., 2017); con la coordinación del movimiento y los ajustes necesarios para el mantenimiento de la imagen en la mácula, a través del núcleo del tracto óptico (Konno & Ohtsuka, 1997); con la mediación de los reflejos vestibulo-oculares, por medio del núcleo el tracto óptico y su comunicación con el núcleo reticular tegmental pontino (Watanabe, Kato, Sato, & Norita, 1993; Kyojimaekawa, Toshiakitakeda, Maekawa, & Takeda, 1975). Los núcleos pretectales están relacionados incluso con los movimientos oculares rápidos presentes durante el sueño (Miller, Miller, Obermeyer, Behan, & Benca, 1999).
- La última vía que inicia también en las neuronas ganglionares de la retina termina en las capas superficiales de los colículos superiores (CS). Esta vía está principalmente encargada de otros aspectos reflejos tales como la acomodación de cabeza, cuello y cuerpo a través del tracto tecto-espinal (Dean & Redgrave, 1984; Goodale &

Murison, 1975). Algunos reflejos que involucran movimientos de tipo sacádico también son realizados por activación de neuronas en los colículos superiores (Redolar Ripoll, 2017).

Como se verá posteriormente, por sus conexiones particulares con la amígdala, esta última vía puede estar ampliamente implicada en el procesamiento y aprendizaje de reflejos visuales de connotación emocional. La actividad eléctrica del colículo superior en ratas se ha caracterizado electrofisiológicamente desde 1969, año en que Jervin Sefton estimuló eléctricamente el nervio óptico y registró la actividad en CS (Sefton, 1969). Años después, Dyer y Annau (1977), estimularon lumínicamente la retina de ratas y registraron la actividad eléctrica de la capa gris superficial del CS. El potencial evocado generado por dicha estimulación posee cinco picos positivos y nodos negativos (P1-28.3ms, N3-34ms, P3-40.2ms, N4-51.7ms, P4-61.2ms, N5-69.2ms, P5-173.2), extendiéndose el potencial hasta los 240 ms (Dyer & Annau, 1977). Adicionalmente, existen estudios que apuntan a que el colículo superior procesa información de forma multimodal. Las capas superficiales, como ya visto, responden a estímulos visuales, pero, de forma interesante, las capas profundas además de responder a estímulos auditivos y también responden a estímulos somatosensoriales en las vibrisas (Gharaei et al., 2018; Ito & Feldheim, 2018).

## **Capítulo 2: Consideraciones anatomofisiológicas de las respuestas emocionales**

La respuesta emocional frente a estímulos ambientales ofrece un aporte muy importante para la supervivencia. Por lo general los reflejos rápidos que involucran los sistemas

neurovegetativos (sistema nervioso autónomo), normalmente con mayor actividad en la rama simpática que en la parasimpática (por ejemplo, aumento del ritmo cardíaco o presión arterial) pueden estar ligados con las respuestas emocionales, las cuales poseen también un componente cognitivo y uno motor. Estos tres componentes de la emoción son llamados a menudo canales de expresión emocional, siendo el componente cognitivo, por lo general, sinónimo del aspecto subjetivo de la emoción (Purves et al., 2017).

Uno de los primeros estudios que relacionan el papel de la amígdala y la actividad simpática fue llevado a cabo en 1968 por Holdstock, quien realizó lesiones en la amígdala y en área septal en ratas Wistar y evaluó características de la respuesta simpática tales como la frecuencia cardíaca y la respuesta galvánica de la piel. Sus resultados mostraron que la respuesta galvánica de la piel se veía disminuida luego de la remoción de la amígdala y del área septal, en comparación al grupo control (Holdstock, 1969). Las respuestas emocionales relacionadas con la activación autónoma iniciarían por vías de proyección desde la amígdala central hasta estructuras como el hipotálamo lateral (LeDoux, Iwata, Cicchetti, & Reis, 1988). De cualquier forma, estos resultados son controversiales debido a que actualmente se asume que la respuesta galvánica de la piel es mediada por el nivel de sudoración, al disminuir la resistencia de ésta al paso de corriente y las ratas carecen de glándulas sudoríparas. Sin embargo, es posible que existan algunos factores de humedad relativa de la piel asociados a cambios en el flujo sanguíneo que no fueron evaluados en este estudio.

Debido a que en este trabajo se indagó por la integración de dos estímulos pertenecientes a dos modalidades sensoriales distintas (visual y táctil) en la ABL, luego de la presentación asociativa repetida, se realizará a continuación una breve revisión de los principios teóricos que tradicionalmente se emplean para la comprensión de este proceso de integración. En

la literatura se encuentran varios reportes que sugieren la existencia de aprendizaje y condicionamiento durante la anestesia, tanto en humanos como en otros animales (Samuel, Taub, Paz, & Raz, 2018; Cork, Heaton, Campbell, & Kihlstrom, 1996; Bonebakker et al., 1996; Deeptose, Andrade, Varma, & Edwards, 2004) de forma que resulta de interés determinar si es posible que en la ABL se dé un proceso de plasticidad e integración polimodal bajo anestesia.

### **Ruta subcortical Colículo Superior – Amígdala vía tálamo: una aproximación anatómica y electrofisiológica**

Quizá el primer reporte que se tiene acerca del papel de la amígdala en el procesamiento emocional sea el trabajo de Brown y Schäffer, de 1888, en el cual se reportan los efectos de la lesión de los lóbulos temporales en el mono (Brown & Schäffer, 1888). Posteriormente, en 1956, Weiskrantz demostró la importancia de la amígdala en el aprendizaje asociativo al generar una lesión bilateral de dicha estructura en *Macaca mulatta* (Weiskrantz, 1956). Sin embargo, podemos afirmar que fueron los trabajos clásicos de Kluver y Bucy (1955) los que abrieron la puerta al estudio acerca del papel de la amígdala en el procesamiento emocional.

Anatómicamente, la amígdala es una estructura compuesta por diferentes núcleos, divididos en dos grandes regiones: la región *cortico-medial* (núcleos cortical, central y medial) y la región *basolateral* (núcleos lateral, accesorio basal y basal). La región basolateral está compuesta por neuronas glutamatérgicas de tipo piramidal (en su mayoría, ubicadas perpendicularmente a la corteza) e interneuronas de tipo GABAérgicas (Rosenkranz & Urban, 2020), que a su vez, pueden ser de dos tipos, las de *feed-back* y las *feed-forward*, según sus características electrofisiológicas (Sah, Faber, Lopez de, & Power, 2003). Por ejemplo, Woodson y colaboradores, 2000, mostraron que algunas conexiones entre el tálamo y amígdala lateral pueden estar dadas en las interneuronas GABAérgicas, desencadenando una inhibición de tipo



*feed-forward*. Dichas conexiones se encontraron entre el tálamo auditivo y las dendritas distales de las interneuronas (Woodson, Farb, & LeDoux, 2000). Los investigadores presumen que este tipo de inhibición de los circuitos locales es importante para controlar la actividad de la amígdala lateral frente a estímulos externos. Otros estudios revelaron que existen allí interneuronas bipolares positivas para colina acetil transferasa e incluso otros tres tipos de neuronas no piramidales, positivas para colesistoquinina, somatostatina – calbindina y para parvalbumina – calbindina (Rosenkranz & Urban, 2020).

El soma y los segmentos iniciales de los axones de las neuronas del complejo basolateral de la amígdala están inervados por axones en su mayoría provenientes de interneuronas GABAérgicas, los cuales forman sinapsis simétricas, que tienen un papel inhibitorio o neuromodulador. De igual forma, proyecciones monoaminérgicas provenientes desde el tallo cerebral y proyecciones colinérgicas desde el prosencéfalo basal forman sinapsis simétricas en la amígdala basolateral. Por otra parte, están las entradas excitatorias o sinapsis asimétricas que se forman a partir de los axones terminales glutamatérgicos provenientes de la corteza cerebral, línea media y núcleos intralaminares del tálamo, además de las conexiones intra e internucleares de la amígdala (Rosenkranz & Urban, 2020).

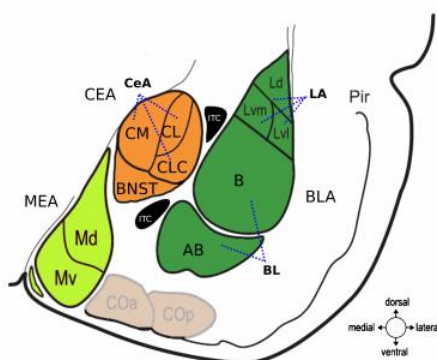
Debido a que esta región perisomática (soma, cono axónico y dendritas proximales) es el lugar en que se generan los potenciales de acción dependientes de sodio, se presenta una gran cantidad de entradas GABAérgicas encargadas de la regulación de la actividad excitatoria de estas células. En contraste, en las dendritas más distales las entradas inhibitorias regulan principalmente la interacción dendrítica (Rosenkranz & Urban, 2020) y la plasticidad sináptica (Freund & Katona, 2007).

Josselyn y Frankland, en 2018 sugieren que el conjunto de neuronas de tipo piramidal en la amígdala lateral son grupos de neuronas con la capacidad de hacer una interconectividad en red (engrama) y se asocian a la formación de aprendizajes asociativos, como es en el caso del condicionamiento aversivo auditivo o, inclusive, el condicionamiento apetitivo. A un nivel neuronal el condicionamiento al miedo involucra una convergencia de un estímulo nociceptivo, como el choque y uno auditivo hacia el complejo basolateral (Josselyn & Frankland, 2018). Aunque la mayoría de dichas neuronas de tipo piramidal reciben esta convergencia de entradas, el engrama se encuentra principalmente en aquellas que exhiben una mayor excitabilidad (Rosenkranz & Urban, 2020; Josselyn & Frankland, 2018). Se presume que dicho engrama involucra fortalecimiento de la sinapsis y esto aumenta la probabilidad de que el mismo patrón de actividad (o similar) dentro de este conjunto de células se puede reconstruir en un momento posterior, lo que resulta en la recuperación de esa memoria (Josselyn & Frankland, 2018; Josselyn, Kohler, & Frankland, 2015; Josselyn, Kohler, & Frankland, 2017; Schacter, 2011; Tonegawa, Liu, Ramirez, & Redondo, 2015).

La mayoría de las entradas del sistema sensorial que se comunican con la amígdala lateral vienen de las áreas de asociación, más que directamente de núcleos talámicos, sin embargo su transmisión sináptica es relativamente demorada por la cantidad de sinapsis involucradas (LeDoux, 2007). La figura 2 muestra un esquema de la organización de la amígdala en la rata.

La diferenciación anatómica de la amígdala tiene correspondencia con la funcionalidad de los núcleos que la componen. Se ha reportado que la amígdala lateral es la más implicada en una tarea de aprendizaje emocional (LeDoux, Cicchetti, Xagoraris, & Romanski, 1990), sin embargo la amígdala central también es importante para este proceso y, sobre todo, para la

generación de la respuesta emocional ya que posee conexiones con el hipotálamo y tallo cerebral que a su vez se conectan con áreas relacionadas con comportamientos como respuestas emocionales ante miedo (Wilensky, Schafe, Kristensen, & LeDoux, 2006). Adicionalmente, estudios como los de Maren (1999), mostraron que la lesión de la amígdala lateral no impide la adquisición del miedo condicionado cuando este es suscitado mediante un sobreentrenamiento, resultado que dirigió la atención de los investigadores a la búsqueda de otras estructuras candidatas. Posteriormente Zimmerman y colaboradores (Zimmerman, Rabinak, McLachlan, & Maren, 2007), realizaron lesiones en la amígdala central y demostraron la importancia de esta estructura para la adquisición y la expresión de las respuestas condicionadas clásicamente (Rabinak, Orsini, Zimmerman, & Maren, 2009). Además, la amígdala central está estrechamente involucrada con un tipo de condicionamiento particular que involucra el cerebelo, denominado “condicionamiento de parpadeo del ojo dependiente de cerebelo”. Además, la amígdala central está conectada con el tálamo medial (Farley, Albazboz, De Corte, Radley, & Freeman, 2018) lo cual podría explicar porque está implicada en ciertos tipos de condicionamientos si los estímulos condicionados son de tipo auditivo.



**Figura 2.** Esquema de las divisiones principales de la amígdala (Mirolli, Mannella, & Baldassarre, 2010). En verde, el complejo amigdalino basolateral (BLAc) que está compuesto por amígdala lateral (LA), basal (B) y accesorio basal (AB), que, a su vez, estos dos últimos B y AB conforman el núcleo basolateral (BL). En anaranjado, complejo

amigdalino central (CEAc) dividido en, central medial (CM), central lateral (CL), subdivisión capsular lateral (CLC) y núcleo basal de la estría terminal (BNST). En amarillo la amígdala medial (MEA) compuesta por amígdala medial dorsal (Md) y amígdala medial ventral (Mv).

Muchos reportes pueden encontrarse en la literatura acerca del papel de diferentes estructuras cerebrales en la mediación del comportamiento emocional. Entre ellas, la amígdala ha sido particularmente estudiada en la mediación, procesamiento, adquisición y evocación de las respuestas emocionales en muchas especies (Cisler & Koster, 2010; Freitas-Ferrari et al., 2010; Pechtel & Pizzagalli, 2011; Rosen & Rich, 2010; Sharpley, 2010; Teicher & Samson, 2016; Bindi, Baldo, & Canteras, 2018; Canteras, Resstel, Bertoglio, Carobrez, & Guimaraes, 2010), respuestas que pueden ser desencadenadas por varios tipos de estímulos, entre ellos, estímulos visuales.

Estudios electrofisiológicos en humanos han mostrado un aumento de la potencia de la banda Gamma en la amígdala luego de la presentación de imágenes con valencia emocional negativa, lo que evidencia su participación en el procesamiento y reconocimiento de emociones. También ha sido reportado que existe una disminución en la banda Delta al ser presentadas imágenes dinámicas de la misma naturaleza (Oya, Kawasaki, Howard, III, & Adolphs, 2002) (Fedele et al., 2020). A partir de esto es posible suponer el papel de la amígdala en el reconocimiento de las características aversivas de las informaciones visuales.

Desde hace mucho tiempo se sabe que la información visual específica que ocasiona actividad en los colículos superiores es el cambio súbito de la representación espacial de los objetos en la retina: objetos que se aproximan o que se mueven a cierta velocidad generan actividad de las neuronas del colículo superior (Dean & Redgrave, 1984).

La importancia de la información visual procesada en los colículos superiores en el procesamiento emocional fue demostrada inicialmente por Goodale y Murison (1975), quienes

realizaron ablación de los colículos y de la corteza visual en ratas y observaron que se presentaba una incapacidad para localizar estímulos visuales en el espacio y una pérdida de los movimientos sacádicos. Sin embargo, aquellos animales que sólo recibían ablación de la corteza visual no perdían totalmente la capacidad para responder emocionalmente a estímulos visuales, fenómeno similar al visto en pacientes humanos luego de una lesión en el córtex occipital, más conocido como *blindsight* o “visión ciega” (Isa & Yoshida, 2009). Estudios llevados a cabo en *Macaca fuscata* y *Macaca mulata* mostraron evidencia de la participación de la vía que va desde el colículo superior hacia la amígdala pasando por el núcleo pulvinar, en el mantenimiento de los movimientos sacádicos visualmente guiados en el modelo de visión ciega (Kinoshita et al., 2019). Adicionalmente, se ha reportado que la presentación de imágenes de rostros es capaz de suscitar cambios en la potencia de la frecuencia Gamma de las neuronas de las capas superficiales del colículo superior, lo que puede tener una correspondencia con la actividad de las ondas Gamma en el núcleo pulvinar en *Macaca mulata* (Le et al., 2019)

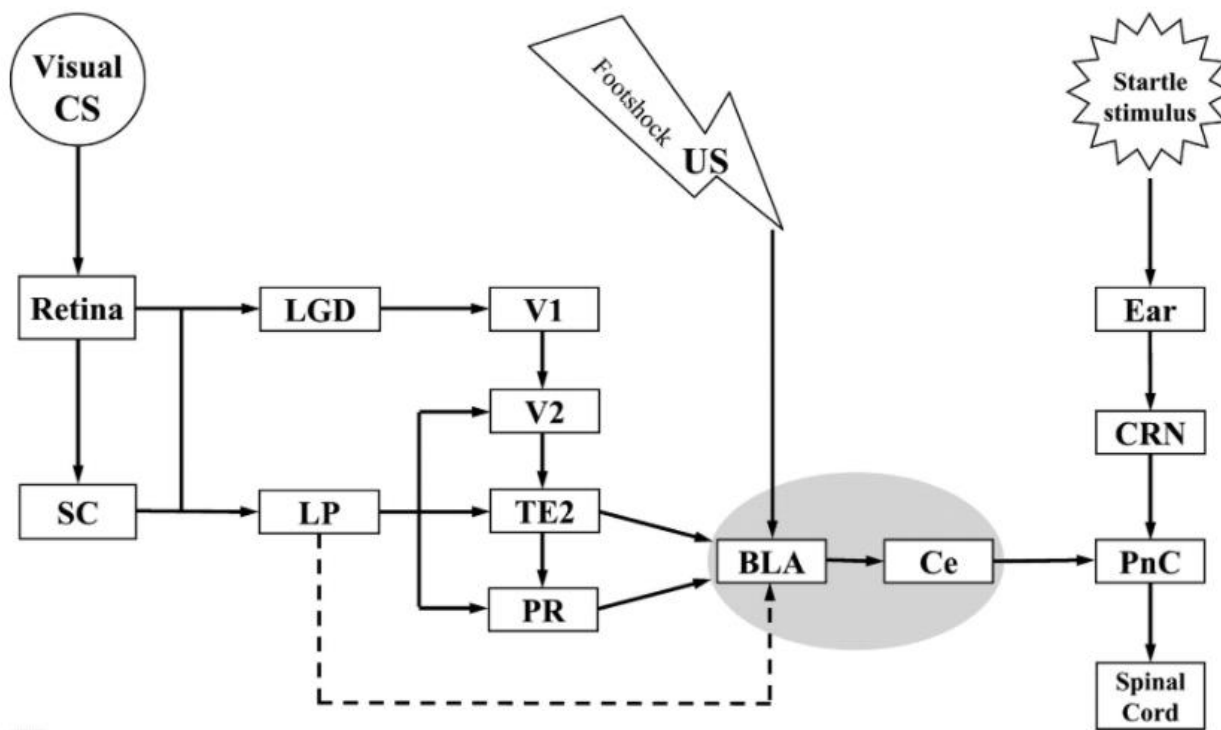
Las neuronas de las capas profundas de los colículos superiores están en contacto con las neuronas de las capas superficiales y poseen axones largos que terminan en diferentes núcleos del tálamo como el lateral posterior y lateral posterior limitante (LeDoux, Farb, & Ruggiero, 1990). Utilizando técnicas de marcación tanto retrógradas como anterógradas, Linke y sus colaboradores encontraron que los núcleos talámicos suprageniculados, peripedunculares y posteriores intralaminares, no sólo recibían aferencias provenientes de los colículos superiores, sino que también enviaban proyecciones hacia la amígdala en modelo murino (Linke et al., 1999). Adicionalmente, en *Macaca mulatta* y en humanos también se evidencia una ruta que conecta el colículo superior y la amígdala haciendo relevo sináptico en el núcleo pulvinar (Rafal et al., 2015).

Changjun Shi y Michael Davis, en el 2001, hicieron estudios de condicionamiento aversivo visual y olfativo con ratas Sprague Dawley, lesionando estructuras del tálamo como el geniculado lateral y el geniculado lateral posterior luego de haber establecido el emparejamiento de estímulos. Estas lesiones mostraron una reducción de la respuesta de sobresalto condicionado en respuesta al estímulo visual pero no al estímulo olfatorio. Adicionalmente, tras marcaciones anterógradas desde el geniculado posterior mostraron, conexiones directas en áreas amígdalo-corticales (área TE2 y corteza dorsal perirrinal) y directas hacia el complejo basolateral (núcleo lateral). Estos estudios sugirieron que el estímulo visual previamente condicionado podría estar siendo transmitido hacia la amígdala por diferentes vías, desde el geniculado lateral a la corteza visual V1 y V2 a TE2 y la corteza perirrinal y desde el geniculado lateral posterior a la corteza a V2, TE2 y corteza perirrinal o de forma directa desde el tálamo lateral posterior a la amígdala lateral, como se puede observar en la figura 3 (Shi & Davis, 2001). Paralelamente, estudios realizados con ratones, relacionan las vías mencionadas anteriormente, colículo-tálamo-amigdalinas, con comportamientos defensivos, tales como congelamiento y aumento de respuesta cardiaca, ante la imagen de un posible predador (Wei et al., 2015). Estos hallazgos apoyan la idea que existe una ruta subcortical desde colículo su

perior hacía la amígdala que está relacionada con el rápido procesamiento de estímulos emocionales (Wei et al., 2015).

Pese a haber transcurrido ya muchos años desde estas primeras descripciones anatómicas, aún no se han realizado estudios que identifiquen una concordancia entre la actividad eléctrica del colículo superior, el tálamo y la amígdala lateral durante la presentación de estímulos visuales emocionalmente relevantes en ratas Wistar. Adicionalmente, durante la búsqueda bibliográfica realizada no se encontraron estudios que hayan definido las

características de potenciales evocados por estímulos lumínicos en la amígdala. Sólo se han reportado algunos datos acerca de potenciales evocados por estímulos auditivos más adelante citados.



**Figura 3.** Esquema de vías amígdalo-corticales y amígdalo-talámica relacionadas durante el condicionamiento aversivo visual (Shi & Davis, 2001). Siglas en inglés: Visual CS (estímulo condicionado visual), SC (colículo superior), LGD (núcleo geniculado lateral), LP (geniculado lateral posterior), V1 (área cortical visual primaria), V2 (área cortical visual secundaria), TE2 (área cortical temporal secundaria) PR (área cortical peririnal) Footshock US (choque en pata estímulo incondicionado), BLA (complejo amígdalino basolateral), CE (amígdala central), Startle stimulus (reacción de sobresalto al estímulo), Ear (oreja), CRN (neuronas de la raíz cocleares), PnC (núcleo reticular pontino caudal), Spinal Cord (medula espinal).

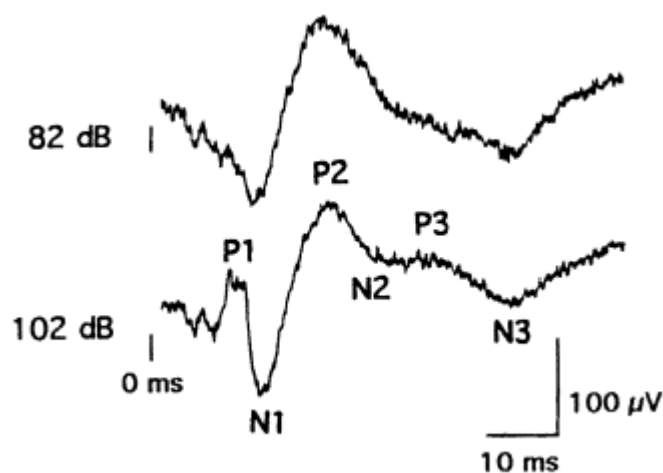
Muchos trabajos han demostrado la relevancia de la amígdala en el aprendizaje aversivo, en paradigmas tales como el condicionamiento clásico y en la formación de memorias

emocionales a largo plazo, por lo general patológicas, tales como las fobias y los trastornos de estrés post traumático (Wiemer & Pauli, 2016; Jacques et al., 2019; Reznikov et al., 2018; Wellman, Fitzpatrick, Machida, & Sanford, 2014; Protopopescu et al., 2005; Chaaya et al., 2019; LeDoux & Brown, 2017; Kim & Cho, 2017; Campese et al., 2016; Janak & Tye, 2015).

Todas estas formas de aprendizaje requieren de la presencia de plasticidad sináptica, entendida como la modificación estructural de la sinapsis en respuesta a la exposición repetida a estímulos y fundamentada en cambios a largo plazo. En la literatura se encuentran muchos reportes acerca de los mecanismos moleculares asociados a los procesos de plasticidad realizada en el amígdala, en respuesta a la exposición a situaciones inductoras de miedo, los cuales permiten ver que es un proceso similar al encontrado en hipocampo y en otras regiones cerebrales, como parte del proceso de aprendizaje (Mitra, 2019; Ito & Morozov, 2019; Ressler & Maren, 2019; Ryan et al., 2018; Izquierdo, Furini, & Myskiw, 2016; Blair, Tinkelman, Moita, & LeDoux, 2003; Blair, Schafe, Bauer, Rodrigues, & LeDoux, 2001).

Pese a que desde el punto de vista electrofisiológico existen algunos reportes acerca de la aparición de potenciales evocados en la amígdala basolateral durante el aprendizaje pavloviano en ratas, se observa una preferencia de la comunidad científica en la evaluación de la actividad amigdalina suscitada por los estímulos auditivos, siguiendo la línea de trabajo iniciada por Joseph LeDoux en 1986 (Kim, Kong, Jo, Kim, & Choi, 2015; Kuniecki, Coenen, & Kaiser, 2002; Chaaya et al., 2019; Staib & Bach, 2018; Park et al., 2016; Kim et al., 2015; Choi, Cain, & LeDoux, 2010). En 1998, por ejemplo, García y colaboradores pudieron identificar potenciales evocados durante una tarea de miedo condicionado a un sonido (102 dB), encontrando un potencial con tres picos positivos (P1-10 ms, P2-20 ms y P-30 ms) y tres componentes negativos (N1-13 ms, N2-30 ms y N3-50 ms) (Garcia, Paquereau, Vouimba, & Jaffard, 1998).





**Figura 4.** Potenciales evocados por estímulo auditivo de 82 dB y de 102 dB (Garcia, Paquereau, Vouimba & Jaffard, 1998).

En relación con el sistema visual, se ha reportado que la activación de los colículos superiores lleva a respuestas emocionales, quizá por inducir actividad del complejo basolateral de la amígdala (Maier et al., 2011). Adicionalmente, los colículos superiores parecen estar involucrados con el proceso de condicionamiento clásico (de Oliveira, Falconi-Sobrinho, da Silva, Jr., & Coimbra, 2017; Cohen & Castro-Alamancos, 2010; Cohen & Castro-Alamancos, 2007; Oh & Disterhoft, 2010; Domjam, 2010). De esta forma, existe un claro interés por entender cómo ocurre la función integradora de la amígdala cuando recibe dos estímulos de diferentes modalidades sensoriales y, sobre todo, cuando uno de ellos es potencialmente aversivo. Frente a esto, diferentes estudios han mostrado cambios anatómicos y funcionales en la amígdala como consecuencia del emparejamiento de estímulos (Blair, Sotres-Bayon, Moita, & LeDoux, 2005; Blair et al., 2003; Blair et al., 2001; Schafe, Nader, Blair, & LeDoux, 2001; Maren, 2017; Maren & Quirk, 2004; Maren, 2001; Pitkanen, Savander, Nurminen, & Ylinen, 2003).

Ledoux y colaboradores (Wilensky, Schafe, & LeDoux, 2000; LeDoux, 2000), hallaron cambios en la actividad de las neuronas de la amígdala basolateral y amígdala central de ratas luego de varios ensayos de emparejamiento aversivo de un estímulo auditivo, dichos cambios fueron observables al presentar el estímulo condicionado en ausencia del estímulo incondicionado (Wilensky et al., 2006), demostrando así la importancia de ambos núcleos amigdalinos para la respuesta visual condicionada.

Pese a que el grueso de los trabajos se ha desarrollado utilizando estímulos auditivos, se sabe que la información sensorial utilizada para la formación de las memorias emocionales condicionadas puede provenir de todos los sistemas sensoriales. En el caso particular del condicionamiento con estímulos visuales, es posible que la información provenga tanto de la corteza visual como de los colículos superiores. Las informaciones provenientes de los colículos superiores pasan antes por algunos núcleos talámicos como el supra geniculado, el geniculado medial y el intralaminar (Iwata, LeDoux, Meeley, Arneric, & Reis, 1986; LeDoux et al., 1986; LeDoux, Ruggiero, & Reis, 1985; Linke et al., 1999).

Está bien determinado que las eferencias que salen desde la corteza occipital llegan preferencialmente a otras áreas corticales asociativas (Doron & LeDoux, 1999). De acuerdo a estos estudios podría pensarse que parte de la información visual alcanzará a la amígdala a través del tálamo y los núcleos suprageniculados desde el colículo superior. Esta ruta de información sería de crucial importancia para el procesamiento emocional visual. Esto se ve soportado por estudios de conectividad realizados en humanos, en lo que se ha demostrado una actividad coordinada del tálamo con la amígdala durante un condicionamiento aversivo visual. Adicionalmente, la conectividad entre el tálamo, el área fusiforme y el giro parahipocampal, se ve modificada durante la presentación de un estímulo condicionado en contraste con la

presentación de estímulos neutros. Esto reafirma la importancia que tienen el tálamo y la amígdala para el aprendizaje asociativo de tipo pavloviano y muestra cómo otras áreas corticales pueden estar asociadas a este proceso según la valencia emocional (Lithari, Moratti, & Weisz, 2015). No obstante, algunas áreas corticales que juegan un papel importante en el proceso de aprendizaje emocional como la porción anterior de la corteza del cíngulo y la ínsula de humanos (Shalev, Paz, & Avidan, 2018), podrían estar relacionadas con la modulación del aprendizaje y no tanto con su adquisición.

## **Definición y planteamiento del problema**

Pese a que diferentes investigadores, entre ellos Rüdiger Linke y colaboradores lograron detectar conexiones anatómicas entre el colículo superior y la amígdala, hasta el momento no ha sido realizada ninguna caracterización electrofisiológica de esta ruta.

Tampoco se ha caracterizado en detalle la respuesta electrofisiológica en la amígdala en relación a la integración de estímulos sensoriales polimodales y no existen trabajos que evidencien la correspondencia de la actividad eléctrica entre el colículo superior y la amígdala bajo dichas condiciones en ratas Wistar.

Por esta razón, y en vista de que no existen en la literatura estudios sistemáticos en ese modelo murino del papel que juega esta ruta en la evaluación emocional de la información visual a nivel electrofisiológico, se propuso en este trabajo caracterizar la actividad eléctrica en la amígdala, ocasionada por un estímulo visual, luego de su emparejamiento con un estímulo eléctrico. Se plantea el estudio en animales anestesiados, de forma que se logre el mayor control posible de las variables que pueden introducir interferencias. Esta aproximación para la

realización de condicionamientos, en ausencia de la totalidad funcional del animal, sigue la línea de los trabajos desarrollados tradicionalmente en especies como *Aplysia* (Hawkins, Clark, & Kandel, 2006; Hawkins, Greene, & Kandel, 1998; Antonov, Antonova, Kandel, & Hawkins, 2001; Bao, Kandel, & Hawkins, 1998; Nargeot, Petrisans, & Simmers, 2007; Reyes, Mozzachiodi, Baxter, & Byrne, 2005), *Hermisenda* (Blackwell & Alkon, 1999; Cavallo, Hamilton, & Farley, 2014; Cavallo, Hamilton, & Farley, 2014; Crow & Tian, 2006; Farley & Alkon, 1987; Redell, Xue-Bian, Bubb, & Crow, 2007; Werness, Fay, Blackwell, Vogl, & Alkon, 1992) y otras especies como *Lymnaea* (Sunada, Lukowiak, & Sakakibara, 2012), tortugas (Keifer, Zheng, & Mokin, 2008; Zheng & Keifer, 2009) y ranas (Tonge et al., 2008).

De esta forma, el trabajo aquí propuesto, implica un avance en el conocimiento de la actividad eléctrica en la amígdala luego de un emparejamiento de estímulos durante anestesia, así como un desarrollo metodológico que puede ser utilizado en la investigación de otros problemas similares.

### **Objetivo general**

Caracterizar los cambios en la actividad eléctrica en la amígdala y colículo superior asociada a la integración de diferentes modalidades sensoriales luego de un emparejamiento contingente de un estímulo visual con un estímulo eléctrico en el parche de vibrisas en ratas Wistar machos bajo anestesia.

### **Objetivos específicos**

- Caracterizar, en machos de ratas Wistar anestesiados, los potenciales de campo provocados en las capas superficiales del colículo superior y en el complejo amigdalino por un estímulo visual (destello de luz).
- Caracterizar, en machos de ratas Wistar anestesiados, los potenciales de campo provocados en las capas superficiales del colículo superior y en el complejo amigdalino por un estímulo eléctrico administrado en el parche de vibrisas.
- Caracterizar, en machos de ratas Wistar anestesiados, la forma en que la presentación emparejada y contingente con estímulos eléctricos en el parche de vibrisas modifica los potenciales de campo provocados en las capas superficiales del colículo superior y en el complejo amigdalino por un estímulo visual.

## **Hipótesis**

- Estímulos lumínicos de diferente duración generarán respuestas electrofisiológicas diferentes en colículo superior y amígdala en machos de ratas Wistar anestesiados.
- Diferentes intensidades de un estímulo eléctrico generarán respuestas electrofisiológicas diferentes en colículo superior y amígdala en machos de ratas Wistar anestesiados.
- El emparejamiento entre un estímulo lumínico (40 Lux, 20 ms) y un estímulo eléctrico (2 mA), no ocasionará cambios en la señal electrofisiológica en el colículo superior en machos de ratas Wistar anestesiados.
- El emparejamiento entre un estímulo lumínico (40 Lux, 20 ms) y un estímulo eléctrico (2 mA), ocasionará cambios en la señal electrofisiológica en la amígdala en machos de ratas Wistar anestesiados.

- La presentación repetida del estímulo lumínico en ausencia del estímulo eléctrico previamente emparejado ocasionará cambios en la señal electrofisiológica del colículo superior en machos de ratas Wistar anestesiados.
- La presentación repetida del estímulo lumínico en ausencia del estímulo eléctrico previamente emparejado ocasionará cambios en la señal electrofisiológica de la amígdala en machos de ratas Wistar anestesiados.

## **Definición de variables**

Para el presente trabajo las variables fueron definidas de la siguiente manera:

### **Variables independientes**

#### *Estimulación lumínica*

Se usó un destello lumínico de luz blanca de (40 lux de intensidad) con una duración de 10 y 20 ms.

#### *Estimulación somatosensorial*

Se usó un pulso eléctrico de corriente directa de 0,5 mA o 2.0 mA de intensidad con una duración de 100  $\mu$ s, aplicado en el parche de las vibrisas contralateral a las áreas de interés (colículo superior y amígdala).

### **Variables dependientes**

Las variables dependientes fueron observadas en el registro electrofisiológico como cambios en la señal que, a su vez, pueden ser descritas por medio de diferentes características.

Las características de la señal fueron definidas de la siguiente manera:

#### *Picos máximo y mínimo*

Se usa la palabra pico máximo y mínimo para referirse a la mayor deflexión positiva o negativa de una señal electrofisiológica (Luck, 2014). Esta característica está definida por un voltaje (o amplitud) expresado en milivoltios (mV). El momento de aparición del pico, es su latencia y ésta es expresada en milisegundos (ms). Por tanto, con referencia a los picos máximos y mínimos de la señal tendremos las siguientes características:

Amplitud de pico a pico: Sumatoria de los valores absolutos del pico y el antipico, determinando la distancia en milivoltios entre ambos.

Latencia del componente: Momento exacto de la aparición del pico o antipico en cierto rango temporal de la señal posterior al estímulo, medido en milisegundos.

Vale la pena resaltar que durante la descripción del potencial evocado a los picos se les da valores ordinales según el momento de aparición en la señal.

### *Poder espectral*

Los datos pueden ser reorganizados con ayuda de transformadas de Fourier para analizar la magnitud absoluta y relativa de las frecuencias que componen la señal analizada. Por lo general, se consideran cinco bandas de oscilaciones en la actividad electrofisiológica neuronal: delta (0,5-3 Hz), theta (3-8 Hz), alpha (8-13 Hz), beta (13-25 Hz) y gamma (25-100 Hz) (Chang-Hwan, 2018). Adicionalmente se incluyó un análisis de las oscilaciones de alta frecuencia (HFO: HFO1 de 100 a 250 Hz o *ripples* y HFO2 de 250 a 500 Hz o *fast ripples*), asociadas normalmente a aumento en la cantidad de potenciales localizados (Engel Jr, Bragin, Staba, & Mody, 2009; Scheffer-Teixeira, Belchior, Leao, Ribeiro, & Tort, 2013).

## **Metodología**

## **Materiales y métodos**

### **Sujetos**

Se utilizaron 8 ratas macho Wistar con un peso de 380-450 g, provenientes del bioterio central de la Universidad Nacional de Colombia. Los animales se alojaron, en el Laboratorio de Aprendizaje y Comportamiento Animal de la Facultad de Ciencias Humanas, en cajas hogar estándar, en grupos de cuatro por caja, con un ciclo luz-oscuridad 12:12 h (luz encendida a las 07:00 h) y a una temperatura de  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , con libre acceso a agua y comida.

### **Cirugía**

Los sujetos recibieron anestesia con una mezcla de Uretano al 25% (1,5 g/Kg) y de Xilacina al 2% (10 mg/Kg), administrada por vía intraperitoneal. Previamente a la inducción del estado anestésico en plano quirúrgico se inyectó atropina 1% (0,05 mg/Kg). Adicionalmente, se hizo inyección subdérmica de solución salina convencional (0.9%) para mantener el animal hidratado, ver anexo A.

Al alcanzar el plano quirúrgico de anestesia (definido por la pérdida de reflejos postural, corneal y de retirada), los animales se colocaron en un marco estereotáxico y se cubrieron con una manta térmica para mantener su temperatura. Se realizaron los procedimientos tradicionales de cirugía estereotáxica para implantación de electrodos, utilizando el atlas estereotáxico del cerebro de la rata de Paxinos y Watson, ver anexo B.

A todos los sujetos se les implantó unilateralmente un electrodo de registro en el colículo superior izquierdo, AP = 2.7 mm; ML = +1.5 mm (con relación al plano medio interaural) y se descendió 3.2 mm a partir de la superficie pial. Por otro lado, en la amígdala



izquierda se implantó un electrodo de registro, AP = 5.2 mm; ML = +5.4 mm, (con relación al plano medio interaural); y se descendió 7 mm desde la superficie pial (Paxinos & Watson, 2007).

Adicionalmente se insertó un par de electrodos en las porciones rostral y caudal del labio superior derecho para estimular sincrónicamente las fibras mecanorreceptoras de las vibrisas mistaciales. Los electrodos de tierra y referencia se insertaron en la musculatura nugal del animal, de acuerdo con los protocolos seguidos en el Laboratorio de Neurofisiología Comportamental, de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia. Todos los registros, luego de la implantación de los electrodos, se realizaron con los animales bajo anestesia profunda y posicionados en el marco estereotáxico. Este fue un procedimiento terminal.

## **Instrumentos**

### *Registro*

Los electrodos de registro se conectaron a un sistema de pre-amplificación (NEX1) acoplado en corriente alterna con una ganancia de 100. La señal preamplificada se llevó a un acondicionador de señales (CyberAmp, Axon Instruments) donde se hizo una segunda etapa de amplificación con una ganancia de 50 (logrando una ganancia total de 5.000) y se pasó por un filtro pasa-banda con frecuencias de corte 0,1 Hz y 10 kHz y un filtro *notch* centrado a 60 Hz para eliminar el ruido de la línea eléctrica. La señal así acondicionada se digitalizó con una frecuencia de muestreo de 10 kHz en un convertidor análogo-digital (Digidata, Axon Instruments). Se usaron programas informáticos para controlar el acondicionador de señales (CyberControl, Axon Instruments) y convertidor análogo-digital (Axoscope, Axon Instruments). Una vez evaluada la calidad de la señal en ambos canales se dio inicio al procedimiento.

Los electrodos de registro fueron elaborados con un hilo de cobre  $100\ \mu$  de diámetro aislados por un material no conductor, dispuesto en el interior de una cánula guía de 6 cm de largo de un calibre 22G.

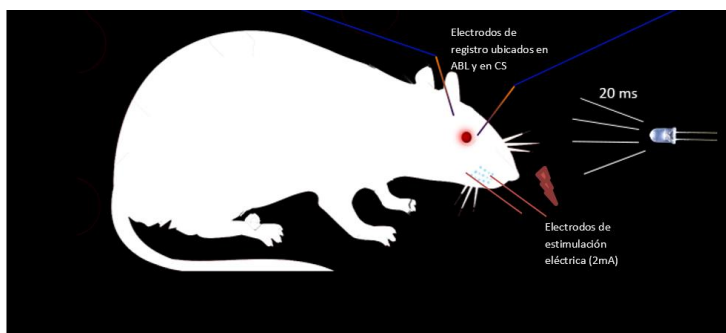
### *Estimulación*

Se utilizaron electrodos de estimulación conectados a un generador de pulso (Isolator-11, Axon Instruments). Se aplicó una corriente eléctrica de hasta 2.0 mA con una duración de  $100\ \mu$ s en el parche de las vibrisas contralateral a los electrodos de registro.

Los electrodos de estimulación fueron de acero inoxidable de  $100\ \mu$ m recubiertos por teflón.

### **Procedimiento**

Luego de la ubicación de los electrodos se oscureció el entorno del sujeto colocando una caja negra de plástico corrugado alrededor del marco estereotáxico, con la finalidad de bloquear el paso de luz externa (ver figura 4). Un LED (3.6 V) de chorro de luz blanca (40 Lux) fue colocado al frente de cada ojo, para dirigir un haz de luz de forma directa a los ojos del sujeto.



**Figura 5.** Arreglo experimental para la estimulación luminosa. El animal, montado en el marco estereotáxico, es rodeado por una pantalla negra y una cortina, de forma que llegara luz ambiental que hiciera interferencia.

El registro electrofisiológico se dividió en cinco etapas:

*Etapa I: Evaluación del efecto de la duración del estímulo luminoso y de la intensidad del estímulo somatosensorial sobre las respuestas provocadas en el colículo superior y en la amígdala:* Como estímulos visuales se utilizaron dos destellos de 10 ms o 20 ms de duración con intensidad de 40 Lux. Como estímulos sensoriales potencialmente aversivos, se utilizaron estímulos eléctricos de intensidades de 0,5 mA y 2 mA con duración de 100  $\mu$ s. Los estímulos fueron presentados 100 veces y las respuestas fueron promediadas para la obtención de los potenciales evocados. Inmediatamente luego de la aplicación de los estímulos, se escogieron aquellos que generaron la mayor activación, de acuerdo con la intensidad de la respuesta obtenido para cada uno. Los estímulos seleccionados, fueron entonces utilizados para el emparejamiento.

*Etapa II: Línea de base del potencial provocado en la amígdala y el colículo superior por un estímulo visual no emparejado:* En esta etapa se registró la actividad eléctrica inducida por los estímulos en las dos estructuras. Para esto, se registró la actividad eléctrica en el colículo superior y en la amígdala frente a 100 presentaciones del estímulo visual (destello de luz de color blanco, 40 Lux; 20 ms de duración; con un intervalo inter-estímulo de 5 s).

*Etapa III: Evolución del potencial provocado en la amígdala y el colículo superior por un estímulo visual como función de su emparejamiento contingente con un estímulo somatosensorial:* Se realizó el emparejamiento de los dos estímulos, presentando inicialmente el destello de luz seguido, 100 ms después, por el estímulo eléctrico en el parche de vibrisas. Troncoso, Munera y Delgado García (2004) demostraron que es posible utilizar un estímulo eléctrico fuerte en el parche de las vibrisas como estímulo

incondicionado en procesos de aprendizaje asociativo. Se realizaron 300 repeticiones de este emparejamiento con un intervalo inter-ensayo de 5 s. El parámetro de las 300 repeticiones fue seleccionado tras hacer pilotajes hasta observar la diferencia en el voltaje de la señal captada en la amígdala, adicionalmente los 5 segundos de intervalo se tomaron para garantizar la recuperación de las estructuras luego de un estímulo. El emparejamiento se realizó de acuerdo con los procedimientos tradicionales emparejamiento de estímulos (Domjam, 2010) reportados en el protocolo específico del condicionamiento se encuentra en el anexo C, donde se ven las especificaciones del emparejamiento.

*Etapa IV: Evolución del potencial provocado en la amígdala y el colículo superior como función de la presentación no-emparejada de un estímulo visual que previamente había sido emparejado:* Para esto se realizaron 600 presentaciones del estímulo visual, con un intervalo inter-estímulo de 5 s. Se promediaron las primeras 100 presentaciones del estímulo visual y las 100 últimas para analizar la variación de la respuesta ante el estímulo lumínico con relación a la cantidad de presentaciones.

### **Extracción de cerebros para análisis histológico**

Al finalizar la toma de los datos, se inyectó una solución de KCl saturada intracardiaca (ver anexo D) como procedimiento final de eutanasia. El lugar preciso de ubicación de cada electrodo fue marcado mediante la realización de una lesión electrolítica por medio de la aplicación de una corriente de 24  $\mu$ A durante cinco minutos. En ese momento los cerebros fueron limpiados con solución salina (0.9 %) y fijados con paraformaldehído (4 %) y retirados. Los cerebros fueron mantenidos en paraformaldehído (4 %) durante, al menos cuatro días, antes

de su procesamiento histológico. Para el análisis histológico se hicieron cortes en tajadas coronales de 50  $\mu\text{m}$  de espesor, usando un vibrátomo (*VIBRATOME 1000*). Posteriormente los tejidos fueron analizados en un estereoscopio de marca Olympus SZX16 y se tomaron las fotos acoplado este a una cámara fotográfica convencional Sony Cybershot. Todos los animales con electrodos en ubicaciones diferentes a las deseadas fueron retirados del experimento.

### **Análisis estadístico**

Una vez recolectados los datos se procedió a su análisis para establecer que cumplieran con los supuestos de normalidad (Shapiro-Wilk). En caso de que éstos fueran cumplidos, se procedía a la realización de la estadística paramétrica. Cuando los supuestos de normalidad no fueran cumplidos, se procedía a la realización de la estadística no paramétrica equivalente. Vale la pena mencionar que en todos los casos el *alfa* fue definido en 0,05.

De acuerdo con las etapas mencionadas en este texto, la estadística se realizó de la siguiente manera:

Etapas I: Tanto para la comparación de los efectos de las dos duraciones de estimulación lumínica de 10 ms o 20 ms como para la comparación de las señales de estimulación eléctrica en el parche de vibrisas 0,5 o 2 mA se realizaron pruebas *t*.

Etapas II y IV: Los efectos del emparejamiento de los estímulos lumínico y eléctrico fueron analizados con ANOVA de medidas repetidas.

### **Consideraciones bioéticas**

Esta investigación tuvo el aval otorgado por el comité de Bioética de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por medio del Acta 08 del 05 de septiembre del 2017, con numero de radicado CB-FMVZ-UN-051-17 (ver anexo E).

Durante la realización de este proyecto se cumplieron las normas éticas y legales exigidas para la investigación con animales de laboratorio en Colombia (Ley 84 de 1989 y Resolución No. 8430 de 1993 del Ministerio de Salud). Se garantizó que los animales mantuvieran agua y comida (LabDiet) *ad libitum* durante todo el experimento. Se respetó la declaración universal de los derechos de los animales proclamada por la Liga Internacional de los Derechos del Animal, Ginebra, Suiza (1989) y los principios éticos de la experimentación animal enunciados por el International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS). Adicionalmente, se tuvo en cuenta la Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (National Research Council, 2011 Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio. Ediciones UC.)

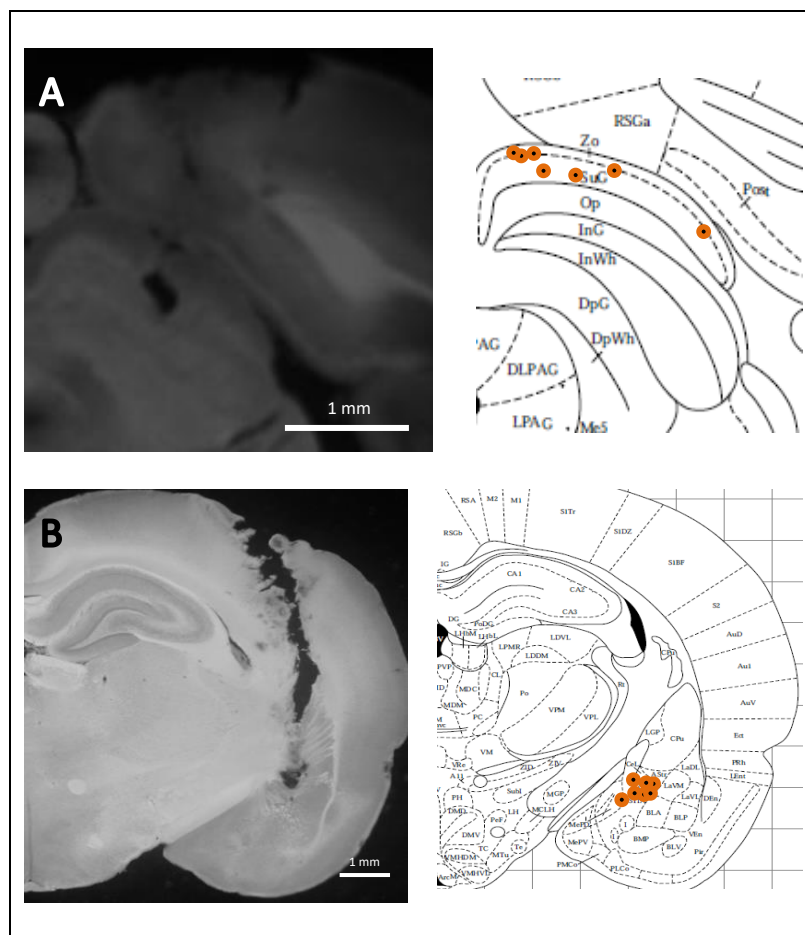
### **Productos esperados**

- Por el carácter de original y novedoso tanto del diseño como de los resultados obtenidos en este trabajo, se espera, una vez finalizado el proceso de entrega del material a biblioteca, el envío de un manuscrito a una revista indexada, preferiblemente cuya área de cobertura incluya temas en integración sensorial y electrofisiología.
- Resultados parciales de este trabajo fueron presentados en modalidad de nano-simposio en la reunión anual de la *Society for Neuroscience*, en Chicago en 2019.
- Resultados preliminares fueron mostrados en la modalidad de poster en Escuela Internacional de Neurociencia IBRO en Villa de Leyva
- Resultados parciales fueron presentados en la modalidad de poster en el evento “Expopsicología”, organizado por la Universidad Católica de Colombia, Bogotá.

## Resultados

### Histología

La Figura 6 presenta las ubicaciones de los electrodos en los colículos superiores (A) y en la amígdala (B) para todos los sujetos.



**Figura 6.** Ubicación de los electrodos en (A) colículo superior (40X) y en (B) amígdala (20X). A la izquierda, microfotografías de secciones coronales que contienen la lesión electrolítica que indica la ubicación de la punta del

electrodo de registro; a la derecha, diagrama del corte coronal correspondiente que muestra las ubicación de los electrodos en cada uno de los sujetos experimentales. Los diagramas son tomados y adaptados del atlas estereotáxico *The Rat Brain in stereotaxic coordinates* (Paxinos & Watson, 2007)

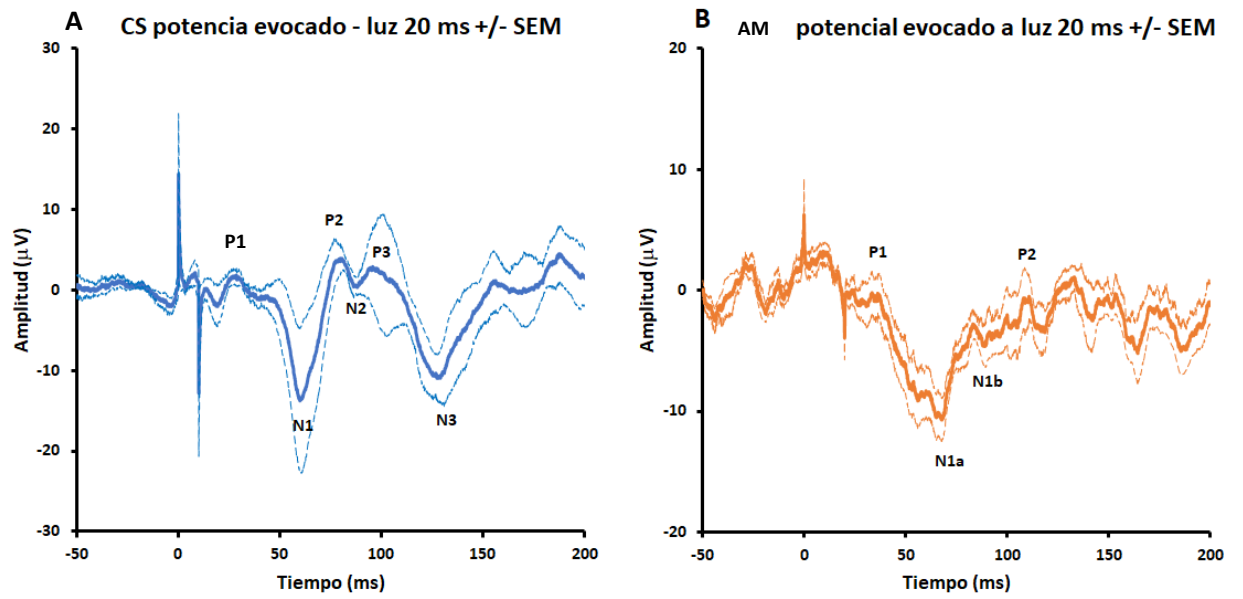
Tras el análisis de la histología, y tomando en cuenta la calidad de las señales obtenidas, se decidió retirar el sujeto 5 del experimento.

## **Efecto de la duración del estímulo luminoso y la intensidad del estímulo somatosensorial sobre los potenciales provocados en el colículo superior y en la amígdala**

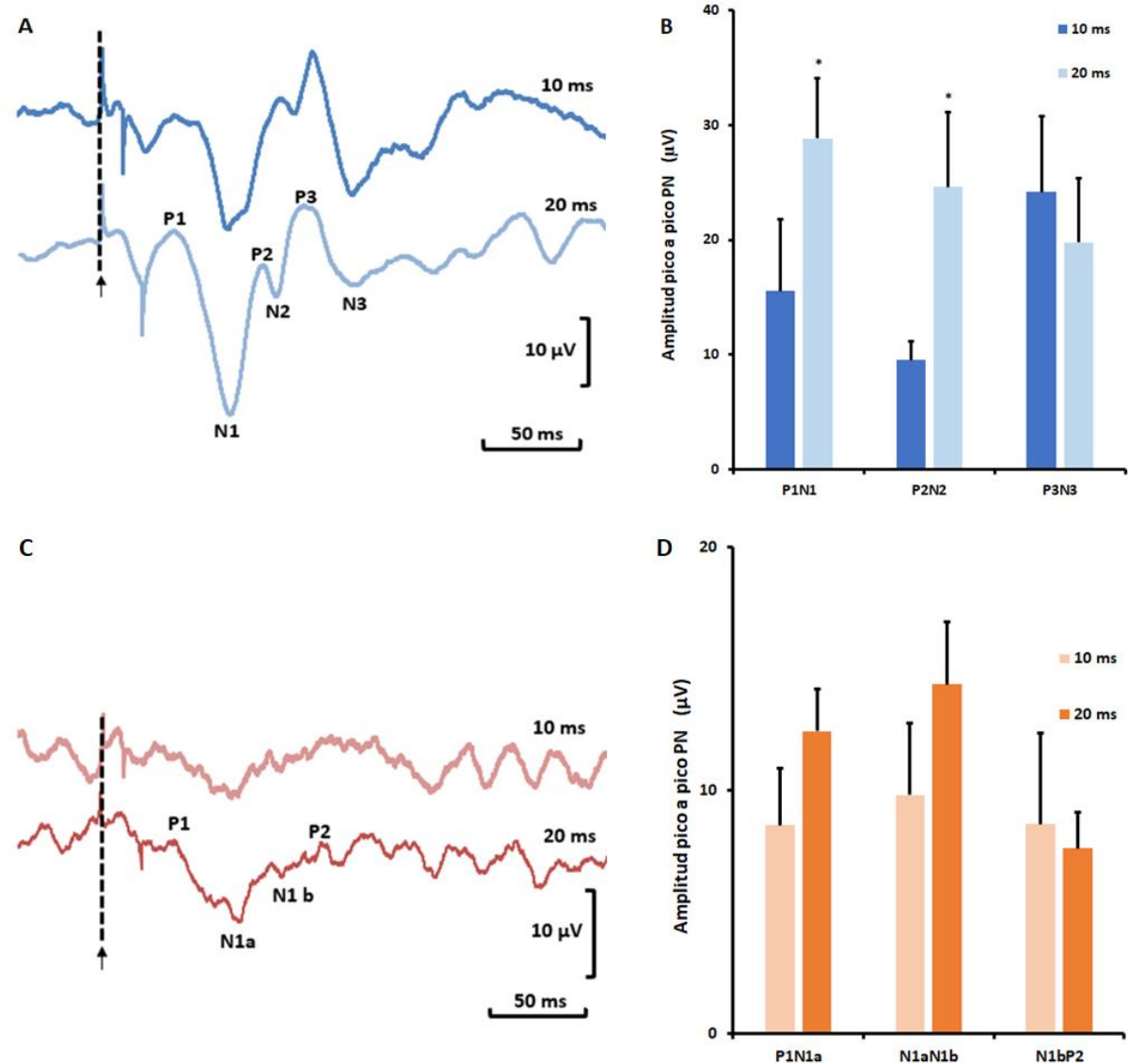
### **Estimulación lumínica 10 ms vs 20 ms**

A partir de la estimulación lumínica se determinaron los componentes estables del potencial de campo tanto para colículo superior, como para amígdala. En el caso del colículo superior se determinaron tres componentes positivos (P1, P2 y P3), cuyas latencias de aparición son de aproximadamente 30 ms, 80 ms y 100 ms. Se encontraron además tres componentes negativos (N1, N2 y N3) con latencias de aparición aproximada de 60 ms, 90 ms y 125 ms respectivamente. Para la amígdala se encontraron dos componentes positivos (P1 y P2) con latencias de aparición 30 ms y 110 ms, respectivamente, también se encontraron dos componentes negativos (N1a y N1b) con latencias de aparición aproximadas en 70 ms y 90 ms (ver Figuras 7 y 8).





**Figura 7.** Promedios intersujetos de los potenciales provocados por un estímulo luminoso de 20ms en (A) coliculus superior (CS) y (B) amígdala (AM). Se ilustra la media +/- el error estándar de la media (SEM).



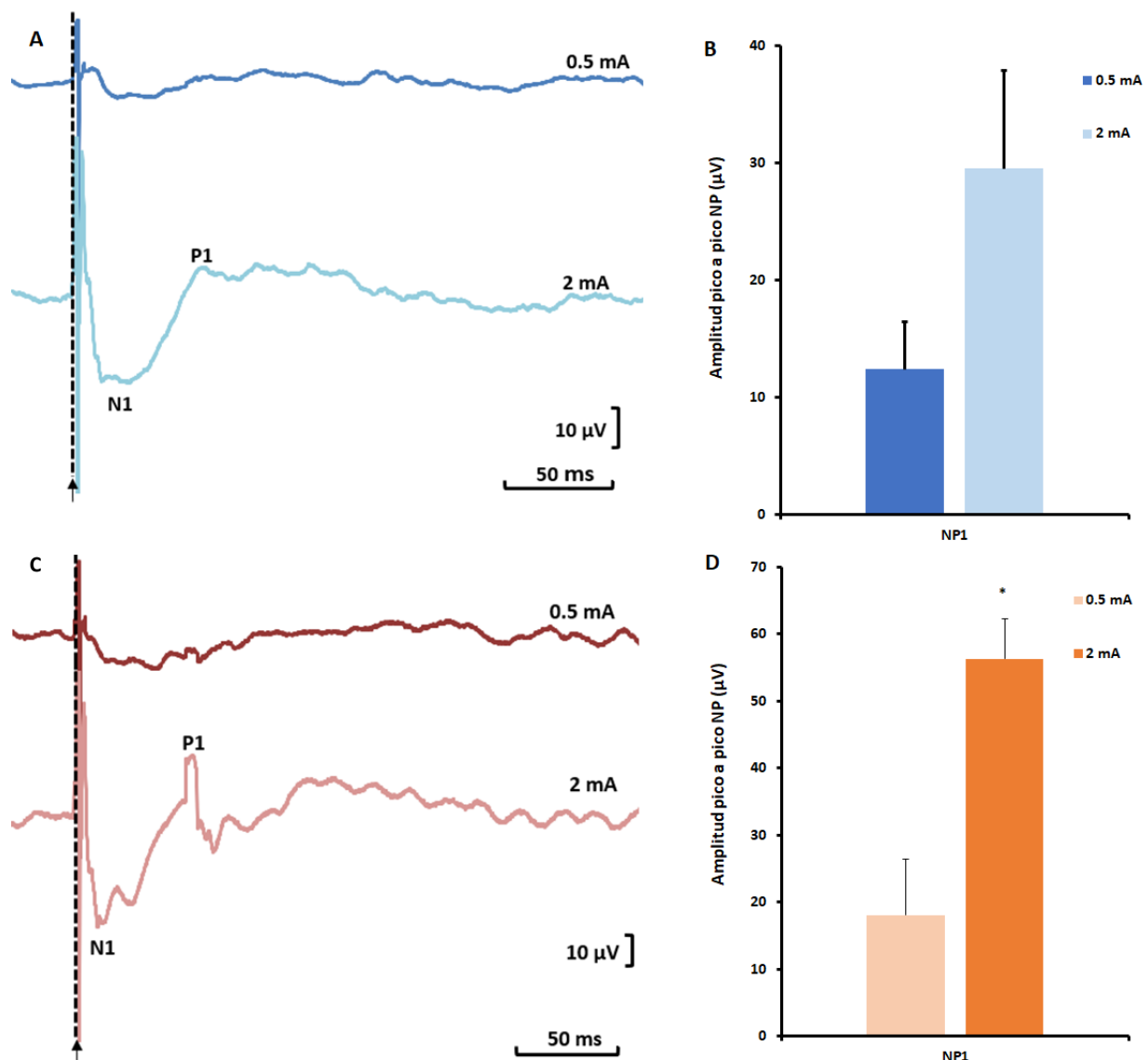
**Figura 8.** Potencial provocado por estímulos luminosos de diferente duración (10 vs. 20ms) en colículo superior (CS) y amígdala (AM). (A) Comparación de los potenciales provocados en CS por estímulos luminosos de diferente duración. (B) Diagrama de barras comparando la amplitud pico a pico de los componentes principales de los potenciales provocados en CS por estímulos luminosos de diferente duración. (C) Comparación de los potenciales provocados en AM por estímulos luminosos de diferente duración. (D) Diagrama de barras comparando la amplitud pico a pico de los componentes principales de los potenciales provocados en AM por estímulos luminosos de diferente duración. Las flechas y líneas punteadas indican el comienzo del estímulo lumínico. Las diferencias significativas entre 10 ms y 20 ms están indicadas por \* ( $p < 0.05$ ).

Usando pruebas t de Student, se comparó la amplitud de los componentes P1N1, P2N2 y P3N3 en los potenciales provocados por estímulos luminosos de diferente duración (10 ms y

20 ms). En el colículo superior se encontró que la amplitud pico a pico de los N1P1 ( $t[6]=-3,179$ ;  $p=0,019$ ) y P2N2 ( $t[6]= -2,556$ ;  $p= 0,043$ ) fue significativamente mayor tras un estímulo de 20 ms; la duración del estímulo luminoso no afectó la amplitud pico a pico del componente N3P3. La duración del estímulo luminoso no tuvo efectos significativos sobre los componentes estables del potencial provocado en la amígdala (ver Anexo F - Tablas 1 y 2).

### **Estimulación eléctrica en parche de vibrisas 0,5 mA vs 2 mA**

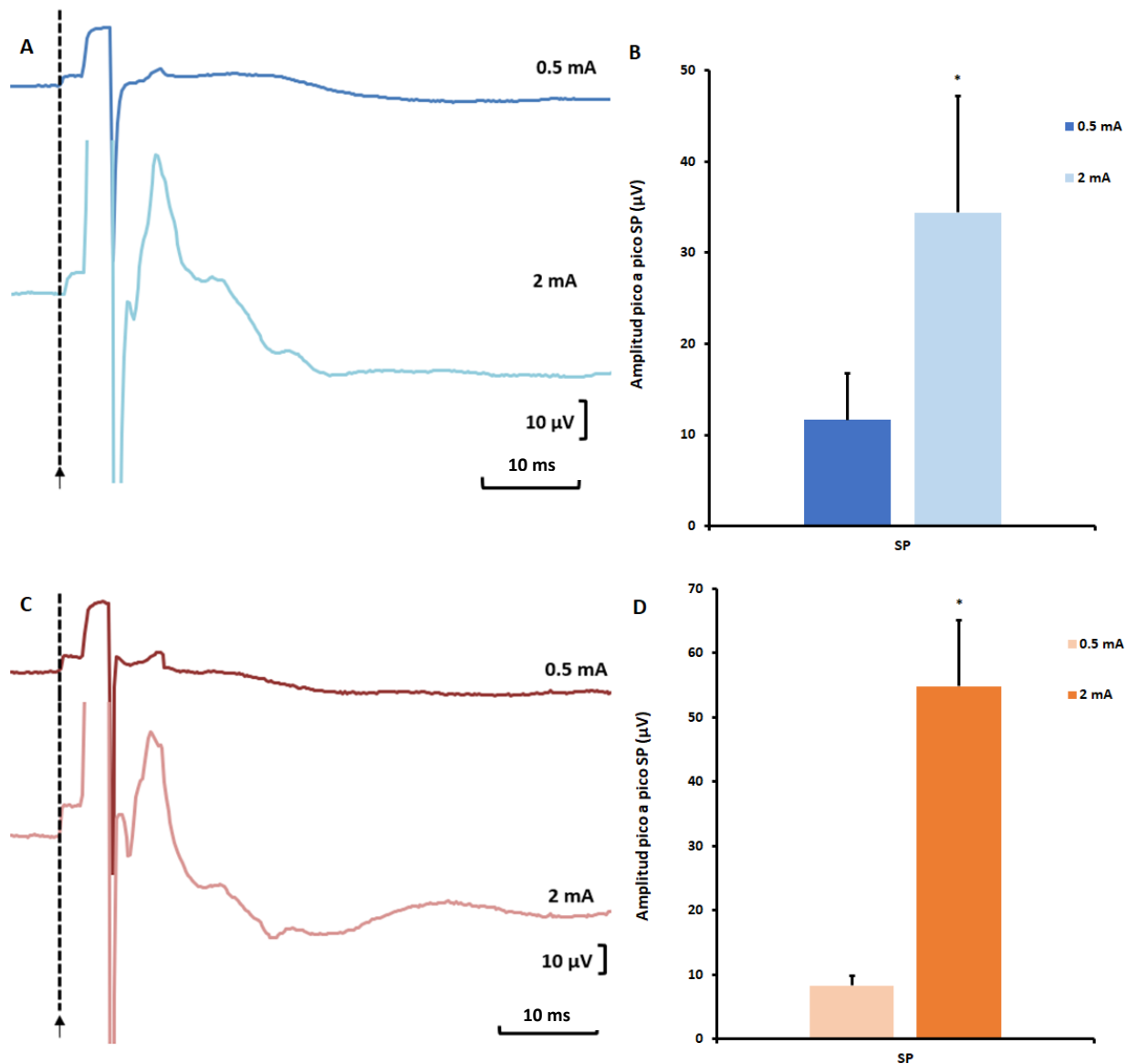
A partir de la estimulación eléctrica se determinaron los componentes positivos y negativos del potencial de campo tanto para colículo superior, como para amígdala. En el caso del colículo superior se determinó un componente negativo (N1), cuya latencia de aparición es de aproximadamente a los 10 ms, además se encontró un componente positivo (P1), con latencia de aparición aproximada de 50 ms. Para la amígdala se encontró un componente negativo (N1) con latencia de aparición aproximadamente de 10 ms y un componente positivo (P1) con latencia de aparición aproximada de 50 ms (ver Figura 9).



**Figura 9.** Grandes promedios de la señal comparando el efecto de un estímulo eléctrico en parche de vibras (0,5 vs 2 mA) en (A) CS y (B) AM. (A). Comparación del potencial provocado en CS por estímulos eléctricos de diferente intensidad. (B) Diagrama de barras comparando la amplitud pico a pico del componente principal del potencial provocado en CS por estímulos eléctricos de diferente intensidad. (C) Comparación del potencial provocado en AM por estímulos eléctricos de diferente intensidad. (D) Diagrama de barras comparando la amplitud pico a pico del componente principal del potencial provocado en AM por estímulos eléctricos de diferente intensidad. Las flechas y líneas punteadas indican el comienzo del estímulo lumínico. Las diferencias significativas entre 0,5 mA y 2 mA están indicadas por \* ( $p < 0.05$ ).

Usando pruebas *t* de Student se comparó la amplitud de los componentes N1P1 en los potenciales provocados por estímulos eléctricos de diferente intensidad (0,5 mA vs 2 mA). En el colículo superior, no se encontraron diferencias significativas entre para la amplitud del pico a pico N1P1, la intensidad del estímulo eléctrico no tuvo efectos significativos sobre el componente estable del potencial provocado. No obstante, en la amígdala se encontró que la amplitud pico a pico del componente N1P1 ( $t_{[3]} = -6,338$ ;  $p = 0,008$ ) fue significativamente mayor tras un estímulo de 2 mA (ver Anexo F - Tabla 4).

Se midieron también las amplitudes de pico a pico de los potenciales de acción poblacionales suscitados por la aplicación de 0,5 mA y 2 mA para colículo superior y amígdala, estas mediciones también fueron evaluadas con pruebas *t* para medidas repetidas (ver Figura 10).

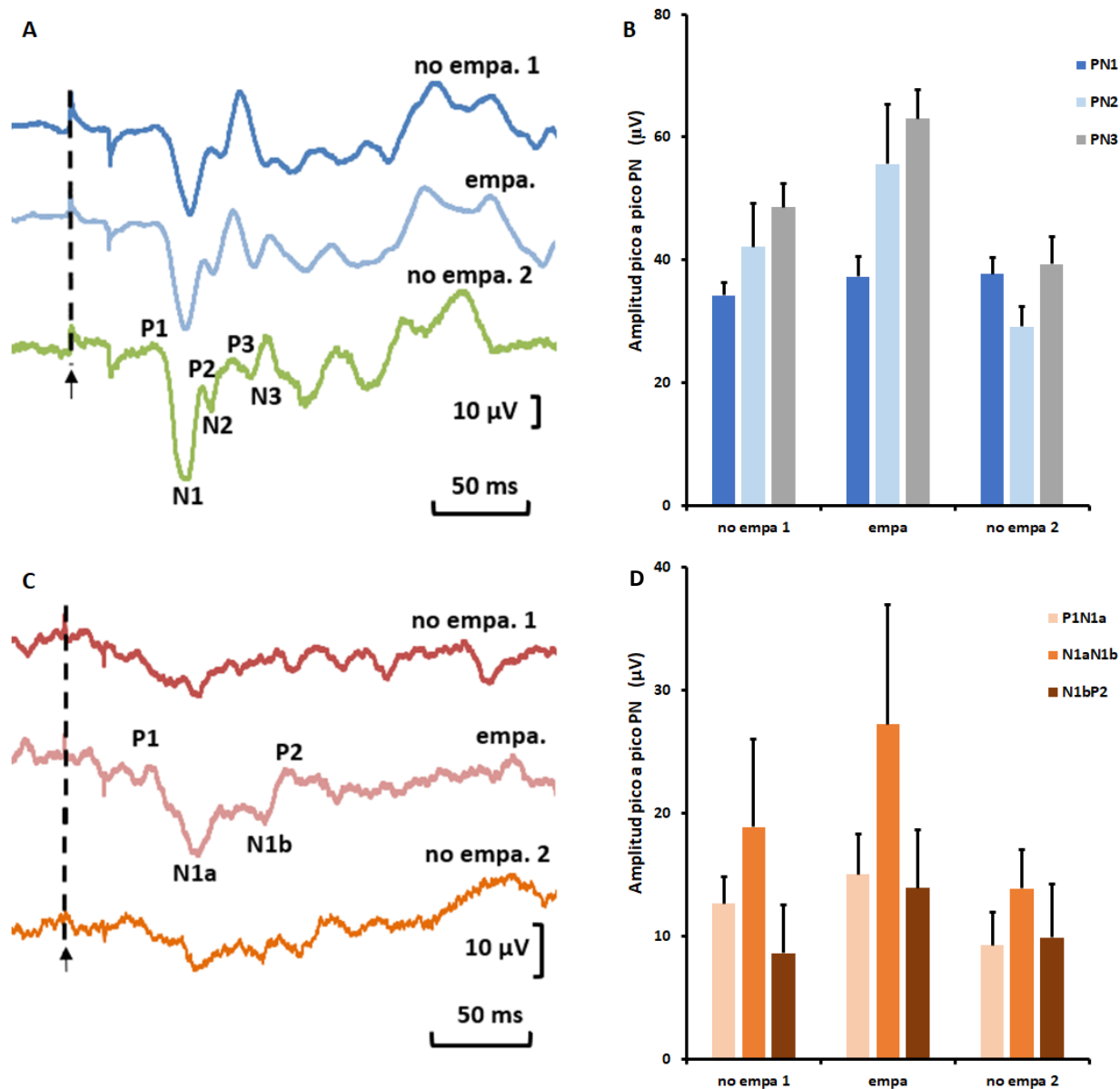


**Figura 10.** Grandes promedios de la señal comparando los SP (spike potencial) de un estímulo eléctrico en parche de vibrisas (0,5 vs 2 mA) en (A) CS y (B) AM. Comparación de los SP en CS por estímulos eléctricos de diferente intensidad. (B) Diagrama de barras comparando la amplitud pico a pico del componente principal del potencial provocado en CS por estímulos eléctricos de diferente intensidad. (C) Comparación del potencial provocado en AM por estímulos eléctricos de diferente duración. (D) Diagrama de barras comparando la amplitud pico a pico del componente principal del potencial provocado en AM por estímulos eléctricos de diferente duración. Las flechas y líneas punteadas indican el comienzo del estímulo lumínico. Las diferencias significativas entre 0,5 mA y 2 mA están indicadas por \* ( $p < 0.05$ )

Usando pruebas t de Student se comparó la amplitud del potencial del *spike* o *potential spike* (PS) provocados por estímulos eléctricos de diferente intensidad (0,5 mA a 2 mA). En el colículo superior, se encontró que la amplitud pico a pico del SP ( $t[3] = -3,540$ ;  $p = 0,038$ ) fue significativamente mayor que un estímulo de 2 mA; así como en la amígdala ( $t[3] = -4,786$ ;  $p = 0,017$ ) (ver Anexo E - Tabla 4).

### **Evolución del potencial provocado en la amígdala y el colículo superior como función de la presentación no-emparejado de un estímulo visual que previamente había sido emparejado**

Usando un ANOVA de una vía para medidas repetidas se comparó la amplitud de los componentes P1N1, P2N2 y P3N3 en los potenciales provocados por un estímulo luminoso (20 ms) no emparejado 1, emparejado y no emparejado 2 en colículo superior, así mismo para los componentes P1N1a, N1aN1b y N1bP2, en amígdala (ver Figura 11).



**Figura 11.** Grandes promedios de la señal comparando el efecto de un estímulo lumínico 20 ms para no emparejado 1, emparejado y no emparejado 2, en CS (A) y AM (B). (A). Comparación de los potenciales provocados en CS por un estímulos lumínico no emparejado1, emparejado y no emparejado 2. (B) Diagrama de barras comparando la amplitud pico a pico de los componentes principales de los potenciales provocados en CS por un estímulos lumínico no emparejado1, emparejado y no emparejado 2. (C) Comparación de los potenciales provocados en AM por un estímulos lumínico no emparejado1, emparejado y no emparejado 2. (D) Diagrama de barras comparando la amplitud pico a pico de los componentes principales de los potenciales provocados en AM por un estímulos lumínico no emparejado1, emparejado y no emparejado 2. Las flechas y líneas punteadas indican el comienzo del estímulo lumínico. Las diferencias significativas entre 10 ms y 20 ms están indicadas por \* ( $p < 0.05$ ).



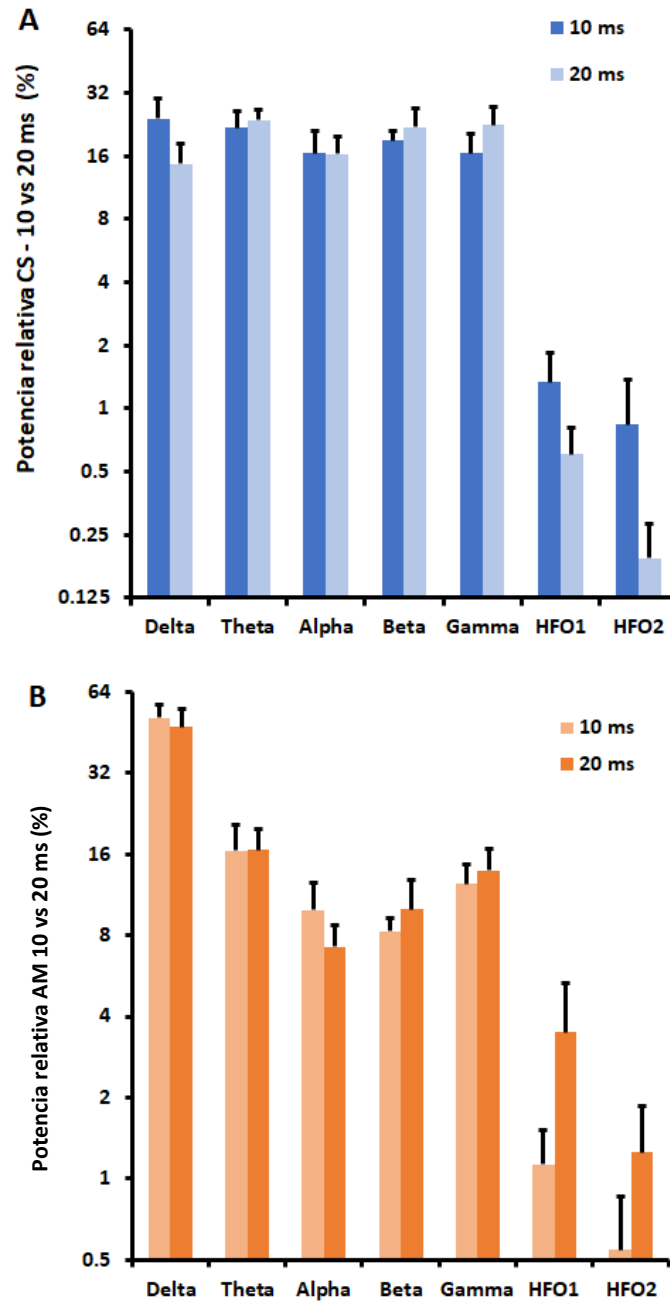
La presentación del estímulo lumínico no emparejado 1, emparejado y no emparejado 2 no tuvo efectos significativos sobre los componentes estables del potencial provocado en colículo superior y en amígdala (ver Anexo F - Tablas 5 y 6).

## **Comparación de los poderes espectrales**

### **Potencias Relativas**

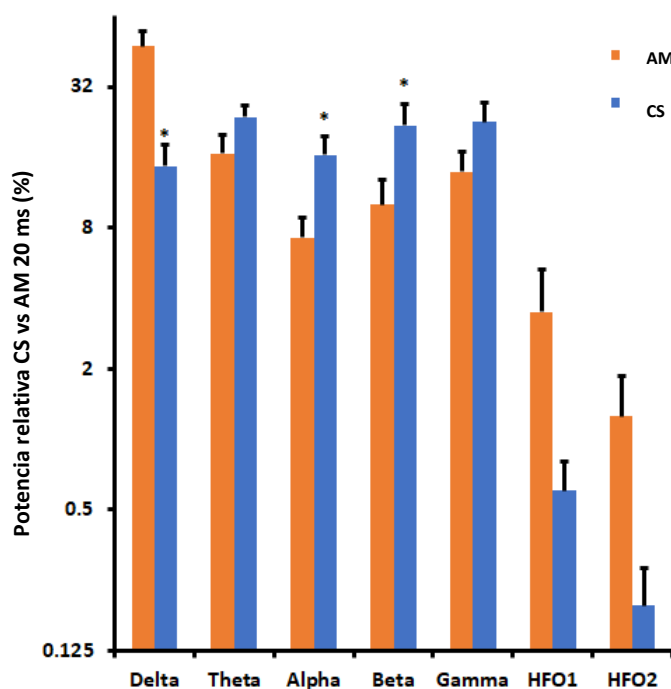
#### *Estimulación lumínica 10 ms vs 20 ms*

Usando pruebas t de Student se comparó las diferencias en las bandas de frecuencia relativas Delta, theta, Alpha, Beta, Gamma, HFO1 y HFO 2 para diferentes estimulaciones lumínicas (10 ms y de 20 ms). La duración del estímulo luminoso no tuvo efectos significativos sobre las bandas de frecuencia relativas en colículo superior y en amígdala (ver Tablas 7 y 8, Figura 12).



**Figura 12.** Comparación de potencias relativas para las señales captadas en CS y AM durante la aplicación de diferentes estímulos, luz 10 ms y 20 ms (A y B). Las siglas CS y ABL son iguales a las usadas en la figura 6. Las barras de error son el error estándar.

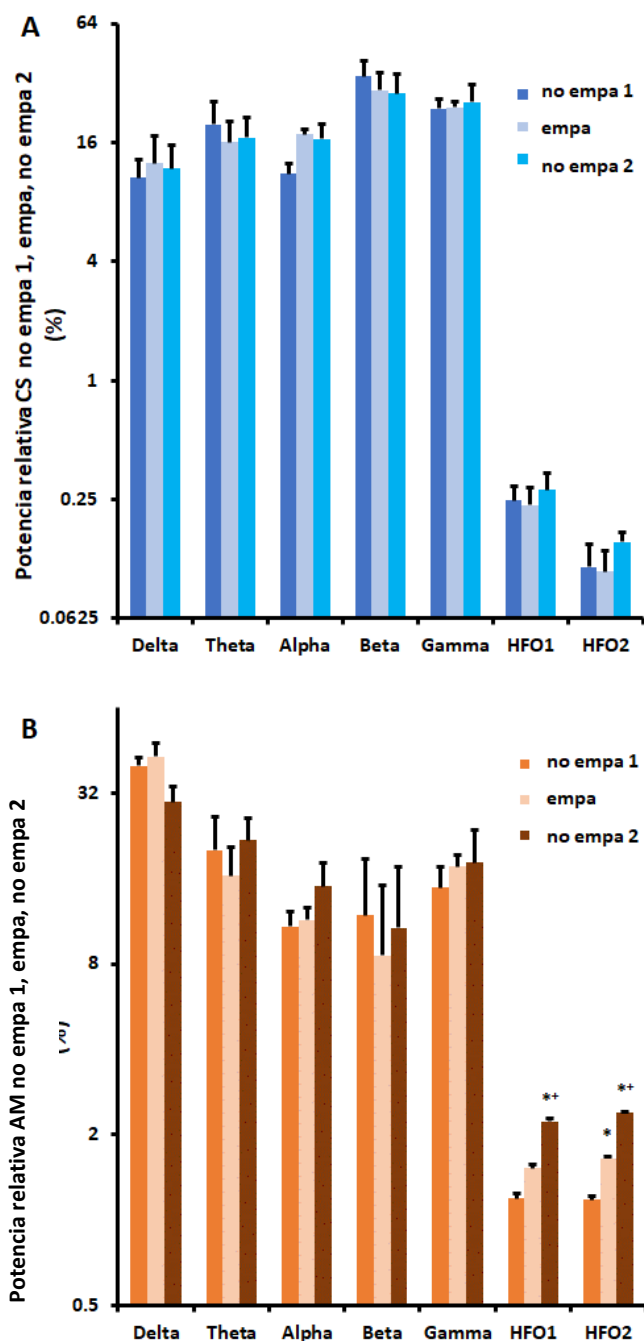
Por otro lado, al hacer la comparación de las bandas de frecuencia relativas de las dos estructuras (colículo superior y amígdala) con pruebas t de Student durante la estimulación lumínica de 20 ms de duración, se encontró un aumento significativo en la banda Delta ( $t[14]=3,579$ ;  $p=0,003$ ) de amígdala. Para las bandas Alpha ( $t[14]=4,727$ ;  $p<0,001$ ) y Beta ( $t[14]=-2,144$ ;  $p=0,050$ ) se encontró un aumento significativamente mayor en colículo superior, ver Figura 13 y Anexo F - Tabla 9.



**Figura 13.** Comparación de potencias relativas de las señales captadas durante la presentación de un estímulo lumínico de 20 ms de duración en CS vs AM. Las siglas CS y AM son iguales a las usadas en la figura 6. Las barras de error son el error estándar. Las diferencias significativas entre AM y CS están indicadas por \* ( $p < 0.05$ ).

*Comparación entre estímulo lumínico 20 ms no emparejado 1, emparejado y no emparejado 2*

Usando ANOVA para medidas repetidas se compararon las bandas de frecuencia relativa de la señal frente a un estímulo lumínico (20 ms) no emparejado 1, emparejado y no emparejado 2. En la amígdala se encontró que para las bandas de frecuencia HFO1 ( $F_{[2,21]}=16,383$ ;  $p<0,001$ ) y HFO2 ( $F_{[2,21]}=25,759$ ;  $p<0,001$ ) hubo un aumento significativamente mayor tras presentar el estímulo lumínico no emparejado 2 (ver Anexo F - Tabla 7, Figura 14). El análisis *post hoc* mostró que para la banda HFO1 hubo un aumento en no emparejado 2 comparado con el no emparejado 1 y con emparejado. Para la banda de frecuencia HFO2, hubo un aumento en emparejado con respecto al no emparejado 1. Igualmente se encontró un aumento en emparejado 2 con respecto a emparejado y no emparejado 1. La presentación de ninguno de los tres estímulos tuvo efectos significativos sobre las bandas de frecuencia relativas en colículo superior.

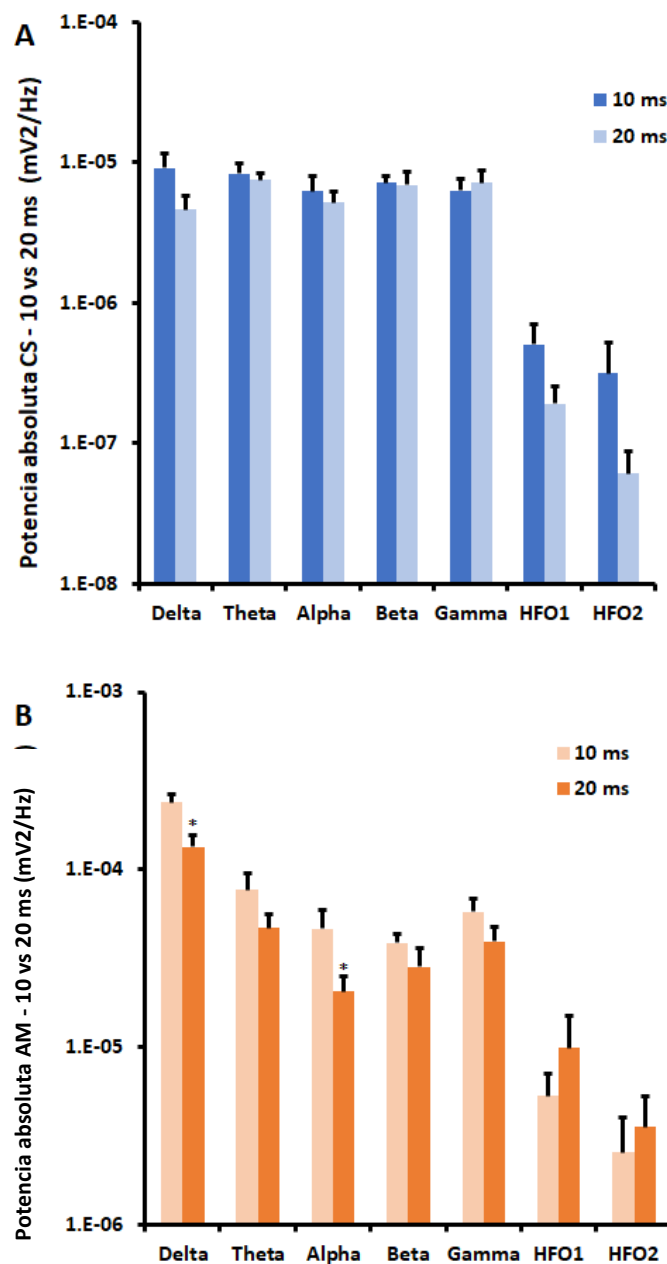


**Figura 14.** Comparación de potencias relativas para las señales registradas en CS y AM durante la aplicación de un estímulo lumínico no emparejado 1, emparejado y no emparejado 2 (A y B). Las siglas CS y AM son iguales a las usadas en la figura 6. Las siglas no empa 1 (no emparejado 1), empa (emparejado) y no empa 2 (no emparejado 2). Las barras de error son el error estándar. Las diferencias significativas entre emparejamiento y no emparejamiento 2 están indicadas por \* ( $p < 0.05$ ) para A y B las diferencias significativas entre no emparejado 1 y emparejado están indicadas por + ( $p < 0.05$ ) para A y B.

## **Potencias absolutas**

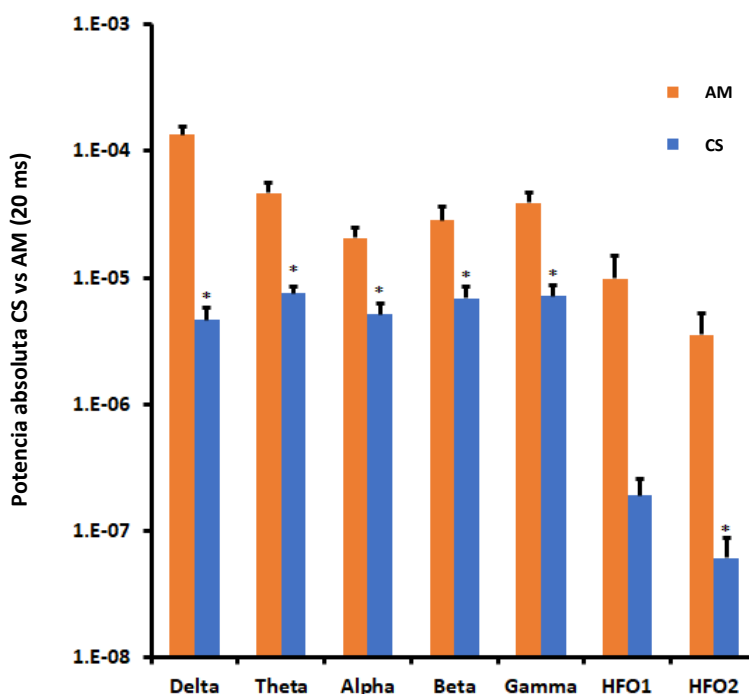
### *Estimulación lumínica 10 ms vs 20 ms*

Usando pruebas t de Student se comparó las diferencias en las bandas de frecuencia absolutas Delta, theta, Alpha, Beta, Gamma, HFO1 y HFO 2 para diferentes estimulaciones lumínicas (10 ms y de 20 ms). En amígdala se encontró un aumento significativamente mayor en las bandas Delta ( $t_{[14]}=2,929$ ;  $p=0,011$ ) y Alfa ( $t_{[14]}= 2,153$ ;  $p=0,049$ ). La duración del estímulo luminosos no tuvo efectos significativos sobre las bandas de frecuencia del colículo superior (ver Figura 15 y Anexo E - Tabla 11).



**Figura 15.** Comparación de potencias absolutas para las señales captadas en CS y ABL durante la aplicación de diferentes estímulos, luz 10 ms y 20 ms (A y B). Las siglas CS y AM son iguales a las usadas en la figura 6. Las barras de error son el error estándar. Las diferencias significativas entre 10 ms y 20 ms están indicadas por \* ( $p < 0.05$ ) para A y B

Por otro lado, al hacer la comparación de las bandas de frecuencia absolutas de las dos estructuras (colículo superior y amígdala) por medio de pruebas t de Student durante la estimulación lumínica de 20 ms de duración, se encontró un aumento significativo en las bandas Delta ( $t_{[14]}=5,855$ ;  $p<0.001$ ), Theta ( $t_{[14]}=4,168$ ;  $p<0.001$ ), Alpha ( $t_{[14]}=3,494$ ;  $p=0,004$ ), Beta ( $t_{[14]}=2,648$ ;  $p=0,019$ ), Gamma ( $t_{[14]}=3,792$ ;  $p=0,002$ ) y HFO2 ( $t_{[14]}=2,173$ ;  $p=0,047$ ) de amígdala (ver Figura 16 y Anexo F - Tabla 12).

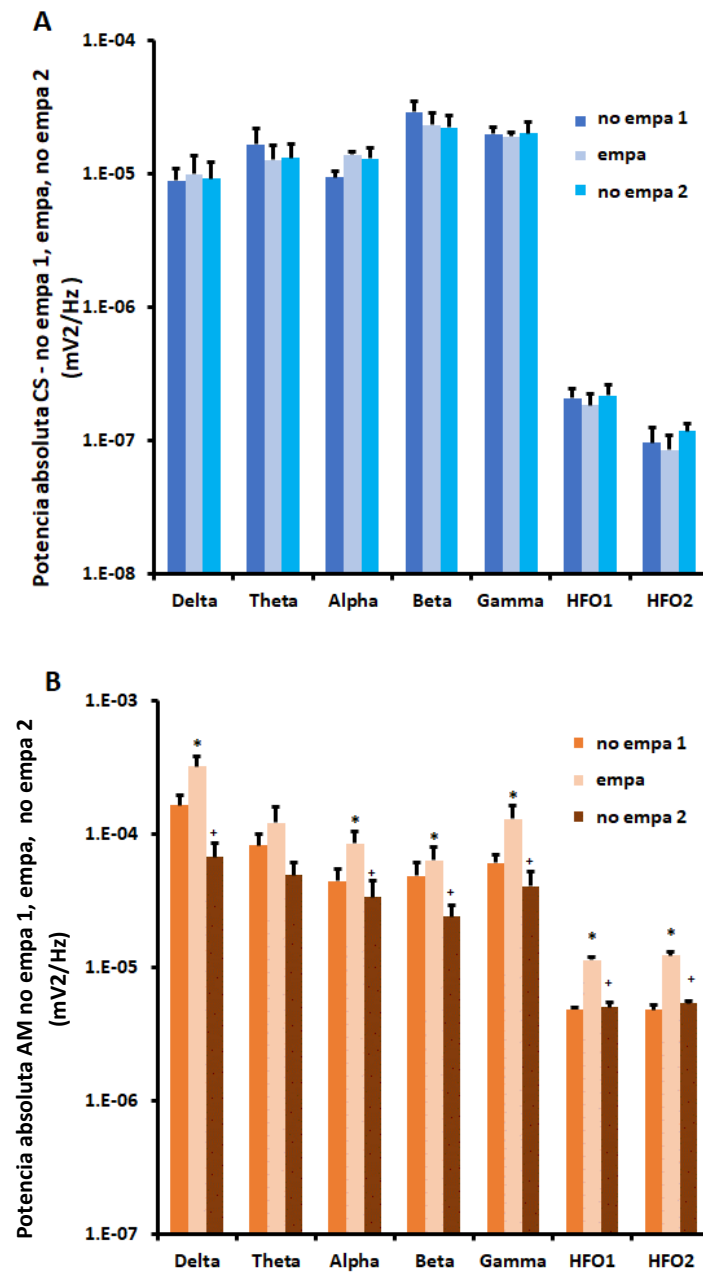


**Figura 16.** Comparación de potencias absolutas de las señales registradas durante la presentación de un estímulo lumínico de 20 ms de duración en CS vs AM. Las siglas CS y AM son iguales a las usadas en la figura 6.. Las barras de error son el error estándar. Las diferencias significativas entre ABL y CS están indicadas de la misma forma que en la figura 12.

*Comparación entre estímulo lumínico 20 ms no emparejado 1, emparejado y no emparejado 2*



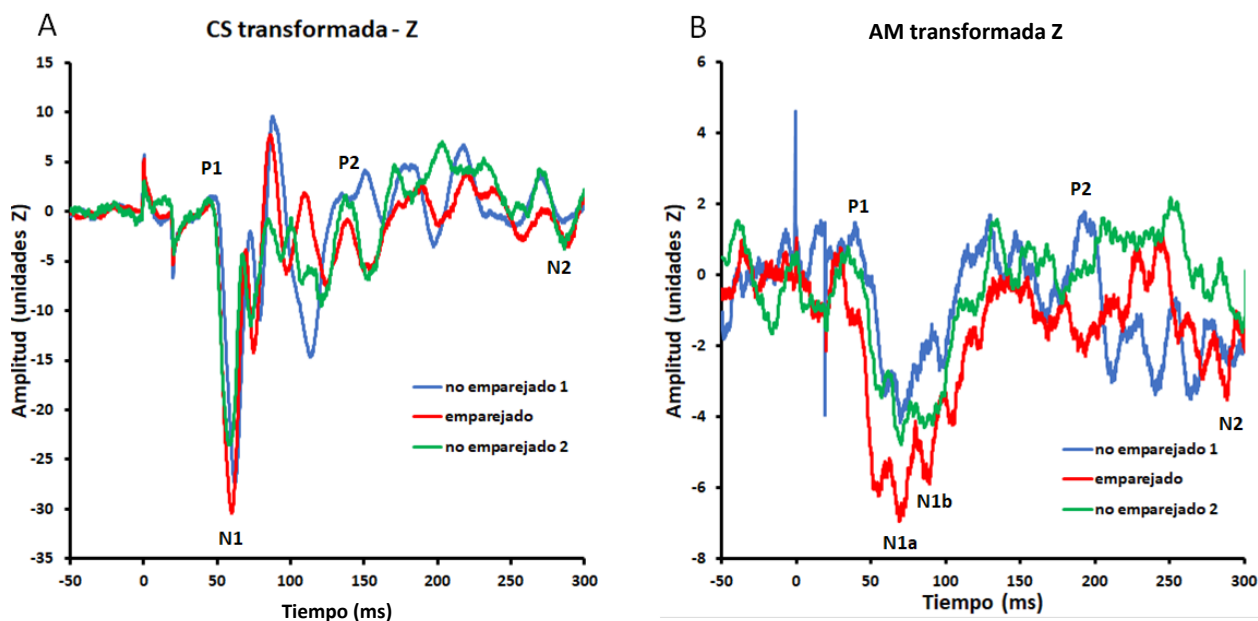
Usando ANOVA para medidas repetidas se compararon las bandas de frecuencia absolutas de la señal frente a un estímulo lumínico (20 ms) no emparejado 1, emparejado y no emparejado 2. En la amígdala se encontró que para las bandas de frecuencia Delta ( $F_{[2,21]}=10,112$ ;  $p<0.001$ ), Alpha ( $F_{[2,21]}=3,908$ ;  $p=0,036$ ), Beta ( $F_{[2,21]}=3,685$ ;  $p=0,042$ ); Gamma ( $F_{[2,21]}=5,65$ ;  $p=0,011$ ), HFO1 ( $F_{[2,21]}=-68,897$ ;  $p<0,001$ ) y HFO2 ( $F_{[2,21]}=47,326$ ;  $p<0,001$ ), ver (Anexo F - Tabla 11, Figura 17). El análisis *Post Hoc* indicó que hubo un aumento en la potencia de todas las bandas para emparejado, con relación al no emparejado 1 y no emparejado 2. La presentación de ninguno de los tres estímulos tuvo efectos significativos sobre las bandas de frecuencia absolutas en cóliculo superior.



**Figura 17.** Comparación de potencias absolutas para las señales registradas en CS y AM durante la aplicación de estímulo lumínico no emparejado 1, emparejado y no emparejado 2 (A y B). Las siglas CS y AM son iguales a las usadas en la figura 6. Las barras de error son el error estándar. Las diferencias significativas para A, B están indicadas de la misma forma que en la figura 13 y las siglas son iguales a las usadas en la figura 13

## Evolución de la actividad de la amígdala y el colículo superior como función de la presentación no-emparejada de un estímulo visual que previamente había sido emparejado – señal tratada con transformada Z

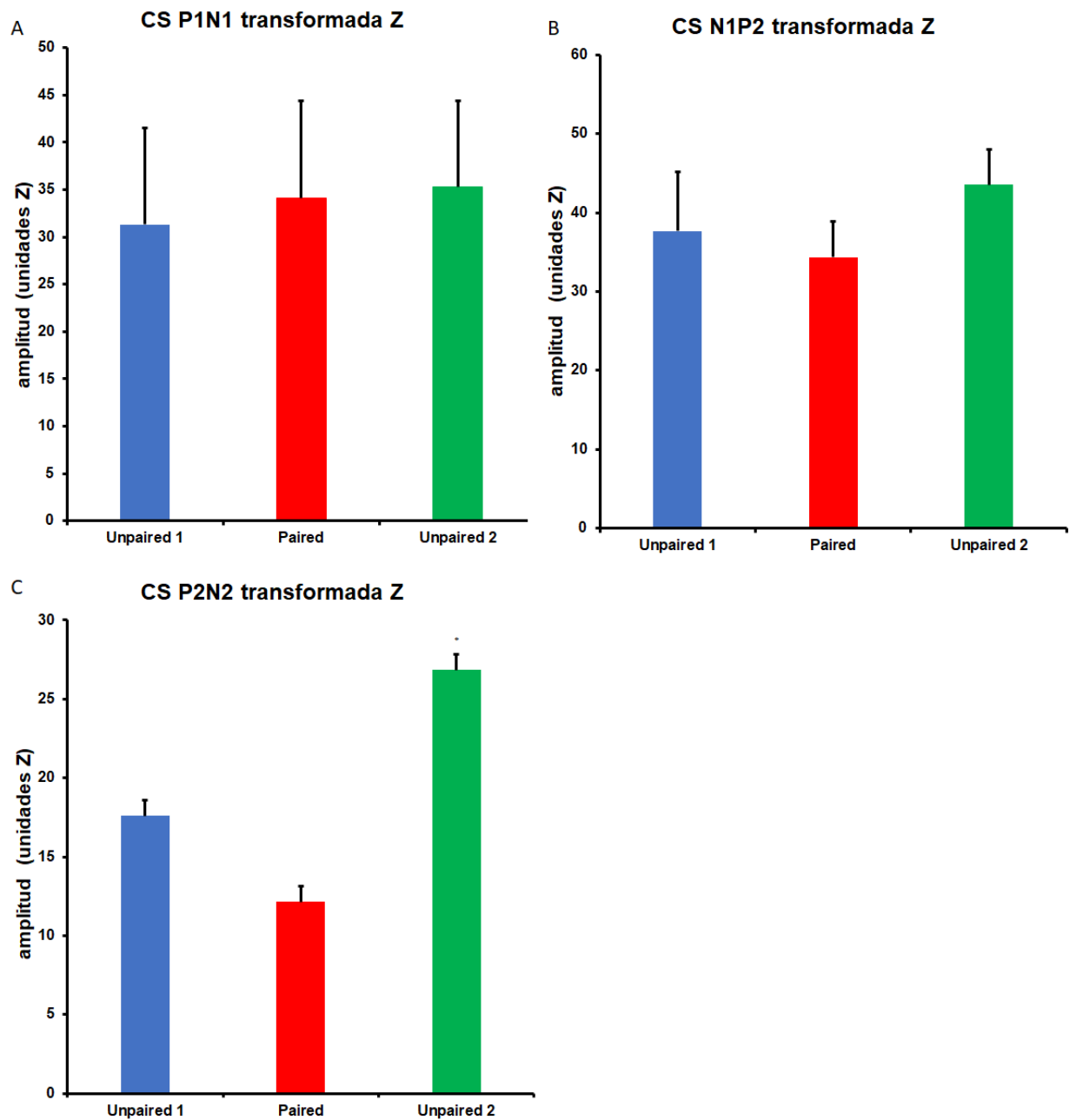
Inicialmente, se realizó una normalización de la señal con respecto al promedio de la actividad registrada en los 50 ms anteriores a la estimulación (línea base), posteriormente a cada valor se restó la media de la línea base y el residuo fue dividido por la desviación estándar de esa misma línea base, (transformada Z), ver Figura 18. Una vez que se tuvo la señal normalizada se seleccionaron los componentes, para colículo superior (P1N1, N1P2 y P2N2) y amígdala (P1N1a, N1aN1b y N1bP2) de los cuales se calculó la amplitud del pico a pico.



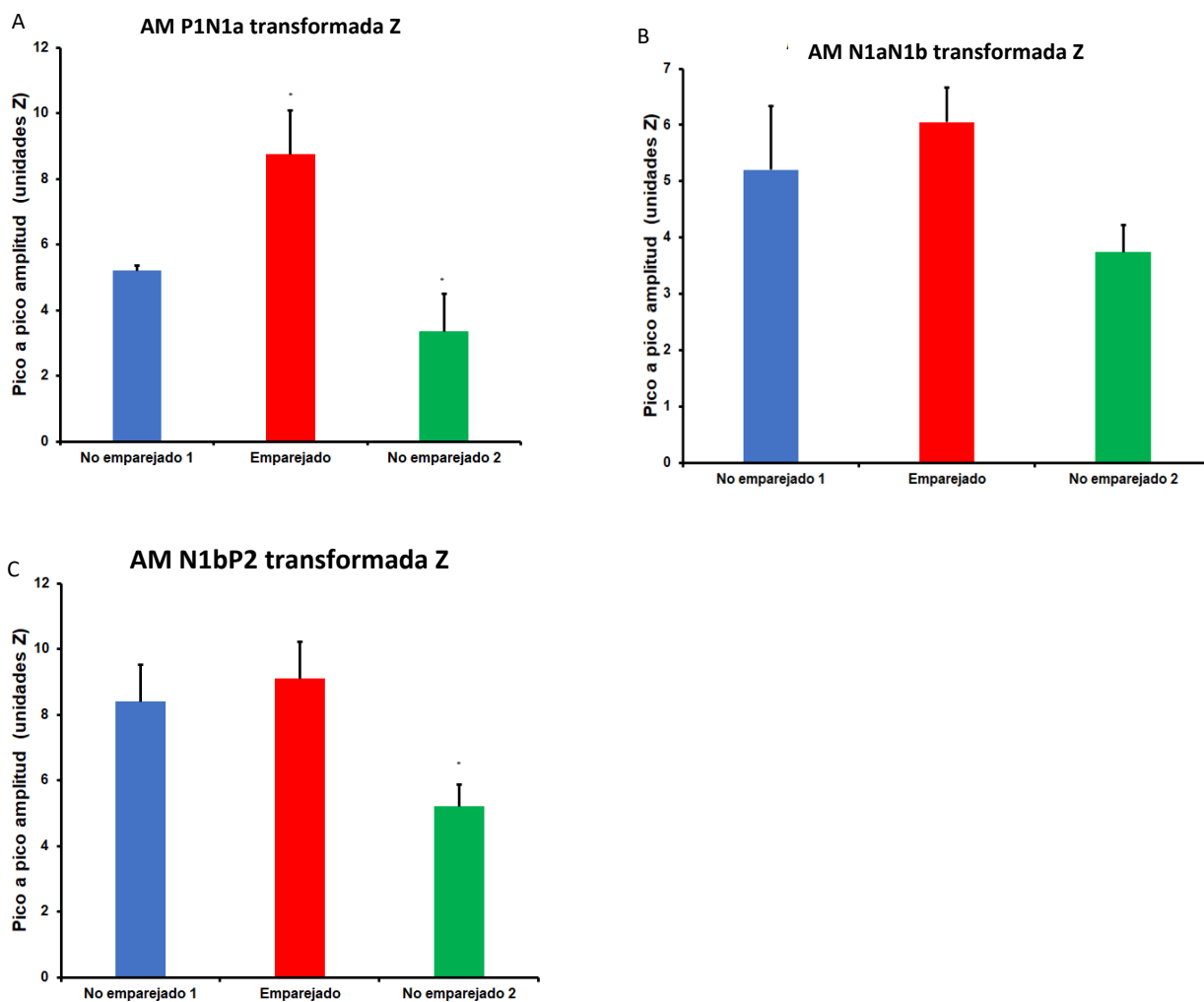
**Figura 18.** Grandes promedios de la señal luego de la transformada Z comparando el efecto de un estímulo lumínico 20 ms para no emparejado 1, emparejado y no emparejado 2 en CS (A) y AM (B). Las siglas CS y AM son iguales a las usadas en la figura 6.

Usando un ANOVA de una vía se comparó la amplitud de los de los componentes P1N1, N1P2 y P2N2 de en los potenciales provocados por un estímulo luminoso (20 ms) no

emparejado 1, emparejado y no emparejado 2 en colículo superior. Se observó un aumento de la amplitud pico a pico significativamente mayor para el estímulo lumínico no emparejado 2 comparado con el emparejado, únicamente en la amplitud pico a pico de P2N2 ( $F_{[2,18]}= 5,704$ ;  $p=0,022$ ), ver Tabla 13 Figura 19. Por otro lado, para amígdala se observó un aumento de la amplitud pico a pico significativamente mayor para el estímulo lumínico emparejado con relación al no emparejado 1 y no emparejado 2 en el rango de P1N1a ( $F_{[2,18]}= 7,217$ ;  $p=0,005$ ) ver Tabla 14, Figura 18. El análisis *post hoc* reveló que el aumento de la amplitud se presentó en el estímulo lumínico emparejado comparándolo con no emparejado 1 ( $p=0,004$ ) y no emparejado 2 ( $p=0,049$ ). Adicionalmente, se observó un aumento de la amplitud pico a pico significativamente mayor del componente N1bP2 para el estímulo lumínico emparejado con relación al no emparejado 2 ( $F_{[2,18]}= 4,379$ ;  $p=0,028$ ) (ver Tabla 14, Figura 20).

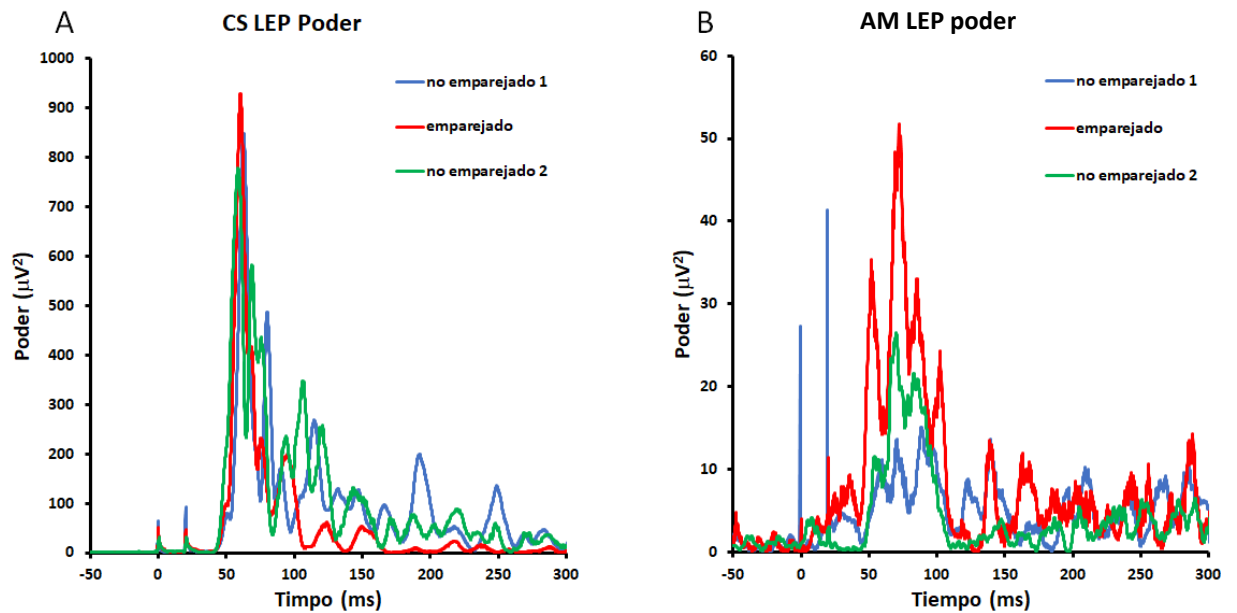


**Figura 19.** Comparación del efecto de un estímulo lumínico 20 ms para no emparejado 1, emparejado y no emparejado 2 en CS para P1N1(A), N1P2 (B), P2N2 (C). La sigla CS es la misma usada en la figura 6. Las diferencias significativas están marcadas con \* ( $p < 0.05$ )



**Figura 20.** Comparación del efecto de un estímulo lumínico 20 ms para no emparejado 1, emparejado y no emparejado 2 en AM para P1N1a (A), N1aN1b (B), N1bP2 (C). La sigla AM es la misma usada en la figura 6). Las siglas CS y AM son iguales a las usadas en la figura 6. Las diferencias significativas están marcadas con \* ( $p < 0.05$ )

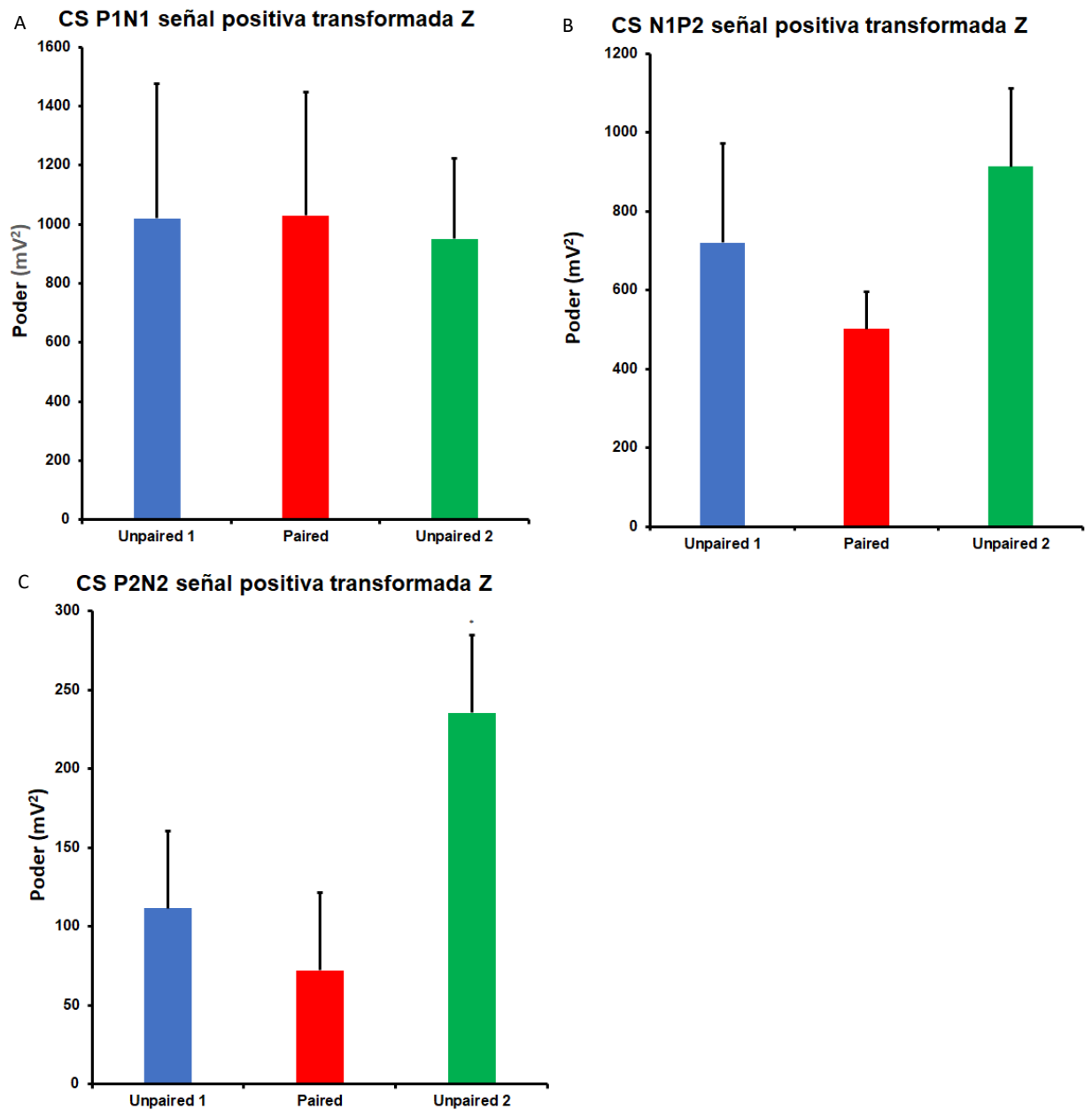
Posteriormente, esa señal fue elevada al cuadrado y se midieron la amplitud pico a pico y el área bajo la curva en los rangos P1N1, N1P2 y P2N2 para colículo superior y P1N1a, N1aN1b, N1bP2 y P2N2 para amígdala (ver Figura 21).



**Figura 21.** Grandes promedios de la señal positiva luego de la transformada Z comparando el efecto de un estímulo lumínico 20 ms para no emparejado 1, emparejado y no emparejado 2 en CS (A) y ABL (B). Las siglas CS y ABL son iguales a las usadas en la figura 6.

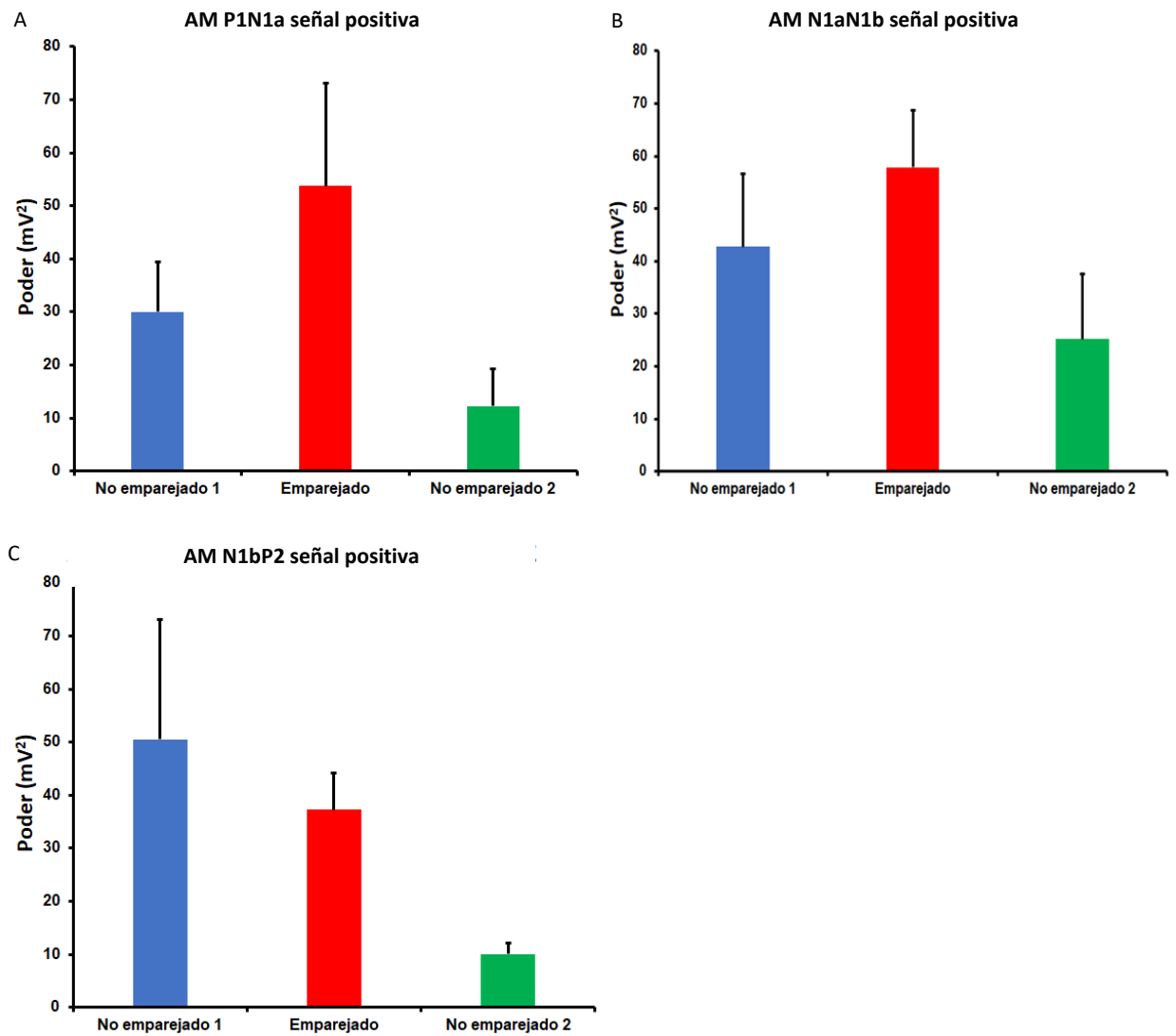
Usando un ANOVA de una vía se encontró en colículo superior que la amplitud pico a pico presente durante el componente P2N2 fue significativamente mayor para no emparejado 2 comparado con el emparejado ( $F_{[2,18]}= 5,051$ ;  $p=0,018$ ), ver Tabla 15, Figura 22.

Adicionalmente, se observó que el área bajo la curva presente durante el rango de P2N2 fue significativamente mayor para no emparejado 2 comparado con emparejado ( $F_{[2,18]}= 5,681$ ;  $p=0,012$ ), ver Tabla 17, Figura 24. Para amígdala se encontró que el área bajo la curva presente durante el rango de P2N2 fue significativamente mayor para emparejado comparado con no emparejado 2 ( $F_{[2,18]}= 3,648$ ;  $p=0,047$ ), ver Tabla 18, Figura 25.

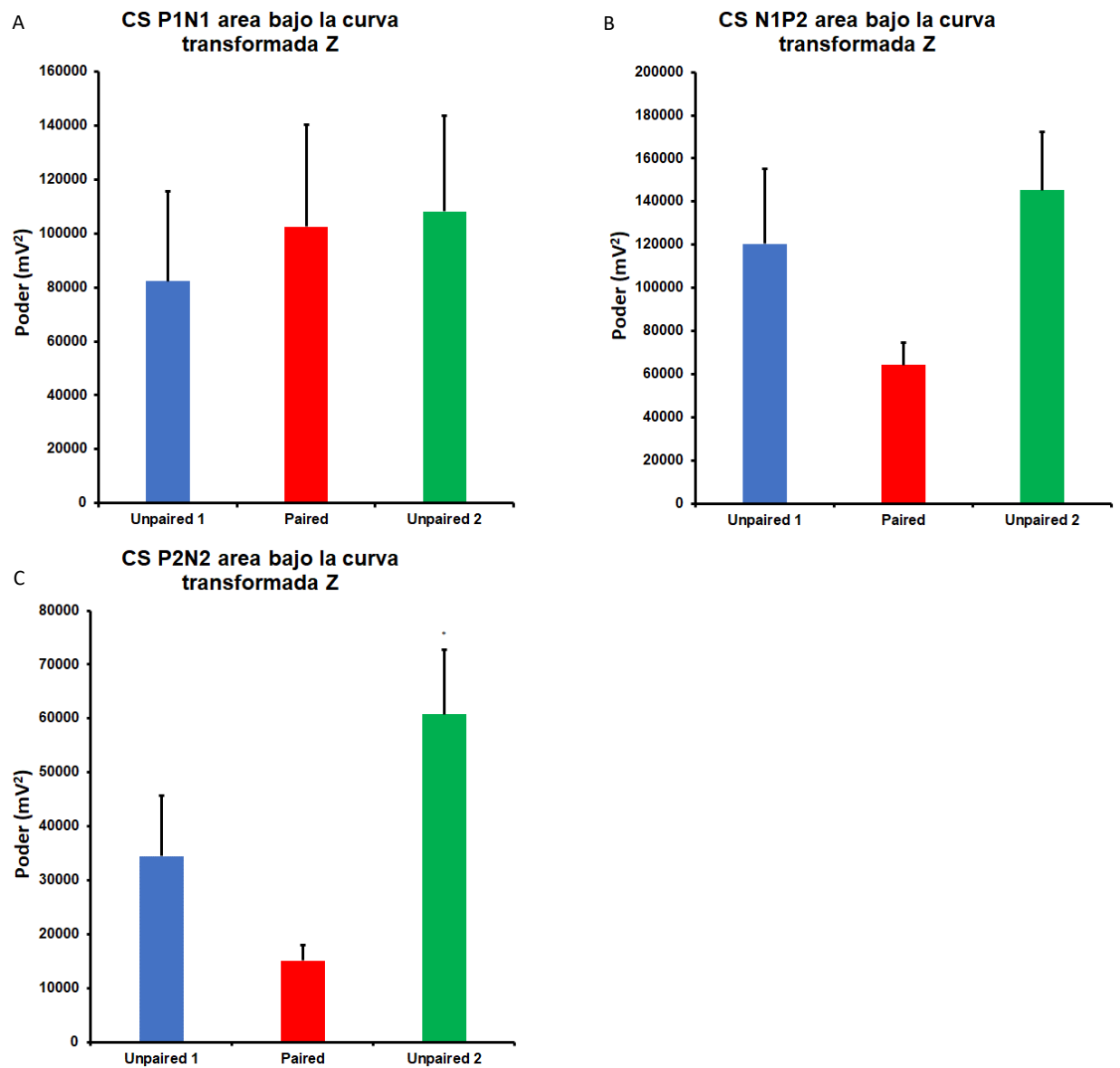


**Figura 22.** Comparación del efecto de un estímulo lumínico 20 ms en la señal positiva para no emparejado 1, emparejado y no emparejado 2 en CS para P1N1(A), N1P2 (B), P2N2 (C). La sigla CS es la misma usada en la figura 6. Las diferencias significativas están marcadas con \* ( $p < 0.05$ )

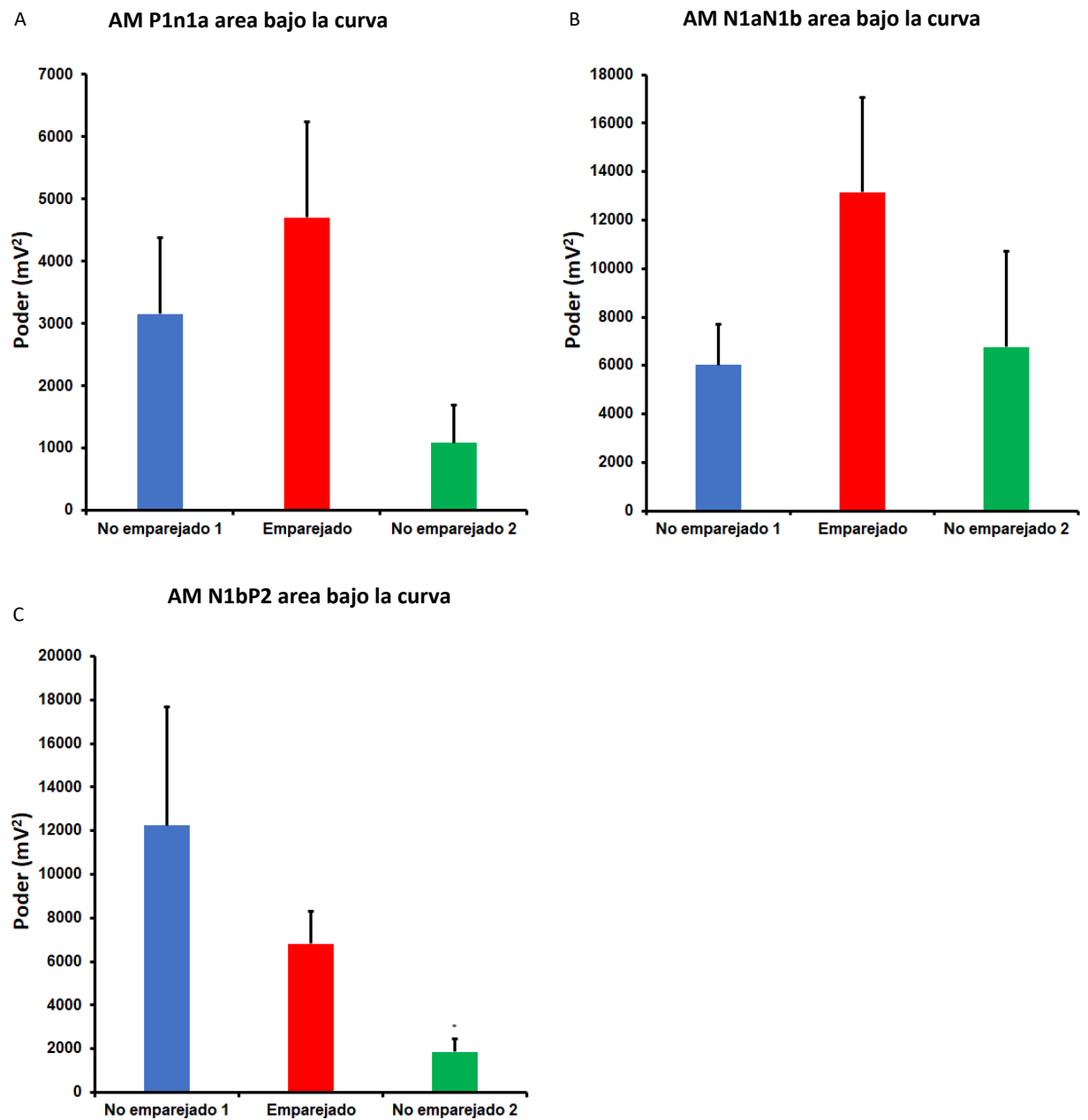




**Figura 23.** Comparación del efecto de un estímulo lumínico 20 ms en la señal positiva para no emparejado 1, emparejado y no emparejado 2 en AM para P1N1a (A), N1aN1b (B), N1bP2 (C). La sigla AM es la misma usada en la figura 6)..Las diferencias significativas están marcadas con \* ( $p < 0.05$ )



**Figura 24.** Comparación del efecto de un estímulo lumínico 20 ms en el área bajo la curva para no emparejado 1, emparejado y no emparejado 2 en CS para P1N1(A), N1P2 (B), P2N2 (C). La sigla CS es la misma usada en la figura 6. Las diferencias significativas están marcadas con \* ( $p < 0.05$ )



**Figura 25.** Comparación del efecto de un estímulo lumínico 20 ms en el área bajo la curva para no emparejado 1, emparejado y no emparejado 2 en ABL para P1N1a (A), N1aN1b (B), N1bP2 (C). La sigla AM es la misma usada en la figura 6. Las diferencias significativas están marcadas con \* ( $p < 0.05$ )

# DISCUSIÓN

## Selección de la duración del estímulo lumínico

Los datos obtenidos demostraron para las dos duraciones del estímulo lumínico la existencia de cambios en la señal electrofisiológica registrada tanto en el colículo superior como en la amígdala, lo cual confirmó por un lado la integridad de las vías y por otro, la ausencia de interferencia de la anestesia sobre la señal. Si bien esto ya ha sido previamente confirmado en condiciones de anestesia con isoflurano y con otros anestésicos para estímulos auditivos y somatosensoriales y en córtex cerebral (Kortelainen et al., 2014; Land, Engler, Kral, & Engel, 2012; Rojas, Navas, Greene, & Rector, 2008) era importante, como primer paso, demostrar que la duración del estímulo lumínico que se utilizaría era realmente efectiva para evocar una respuesta clara bajo la anestesia con uretano.

Históricamente los estímulos utilizados para evocar cambios en la actividad electrofisiológica en colículo superior han sido muy diversos, pudiendo ser bastante cortos (en el rango de decenas o centenas de microsegundos) hasta decenas de milisegundos (Hetzler, McLester-Davis, & Tenpas, 2019; Dyer & Annau, 1977). De esta forma y con la finalidad de determinar la duración óptima del estímulo lumínico para evitar la pérdida de la respuesta, se decidió evaluar y comparar los efectos de dos duraciones reportadas como exitosas para la evocación de la respuesta en la literatura: 10 ms y 20 ms. La señal obtenida en el colículo superior fue similar a la reportada con anterioridad por otros autores en lo relacionado a sus componentes positivos y negativos (Dyer & Annau, 1977; Xintaras, Ulrich, Sobecki, & Terrill, 1966; Gharaei et al., 2018), comenzando alrededor de los 30 ms y finalizando a las 100 ms. El

estímulo lumínico de 20 ms de duración indujo un aumento amplitud pico a pico de los componentes P1N1 y P2N2 mayor que la inducida por el estímulo de 10 ms de duración.

La revisión de la literatura realizada durante la preparación de este trabajo no mostró reportes acerca de potenciales evocados por estimulación visual en la amígdala en ratas Wistar. De esta forma, se optó por caracterizar este potencial, utilizando el estímulo lumínico de 20 ms de duración. Para la definición de los componentes se tomó como ejemplo el de potenciales evocados por estímulos auditivos (García et al., 1998). Se definió entonces la existencia de un potencial evocado por el estímulo visual caracterizado por una primera deflexión positiva a los 30 ms, seguida por dos deflexiones negativas (que denominamos N1a y N1b) a los 70 ms y 90 ms, respectivamente. Finalmente, a los 110 ms se encontró una deflexión positiva (P2).

Al utilizar el estímulo lumínico de 10 ms de duración se comprobó que se mantenían los mismos componentes, pese a mostrar una amplitud menor, pero esta disminución no fue significativa para ninguno de los componentes.

De acuerdo con todo lo anterior, se optó por utilizar la duración de 20 ms, ya que ocasionaba una respuesta estable y evidente que no desaparecería luego de la aplicación repetida del estímulo (300 veces durante el procedimiento de emparejamiento y 600 veces durante el procedimiento de no emparejamiento 2), a la vez que generaría, en la señal obtenida en la amígdala, una serie clara de componentes para el análisis.

### **Selección de la intensidad del estímulo eléctrico**

La aplicación del estímulo eléctrico en el parche de las vibrisas también se asocia con la ocurrencia potenciales provocados en ambas estructuras. Estos cambios, correspondieron a la aparición inicial de un potencial de acción poblacional (*spike*) entre 2 ms y 5 ms

(aproximadamente) en las dos estructuras y la posterior aparición de componentes lentos, uno inicial negativo, seguido por uno positivo. La amplitud de estos componentes fue mayor con el estímulo sensorial de 2,0 mA y por tal razón éste fue tomado para el procedimiento, asumiendo que – al igual que para el estímulo lumínico – su presentación repetida no ocasionaría la disminución de la respuesta. Estudios registrando la actividad en colículo superior luego de un estímulo somatosensorial muestran diferencias en el inicio del potencial evocado, al compararse con las latencias obtenidas en nuestro trabajo. Estas diferencias podrían ser explicadas por el tipo de estímulo aplicado en el parche de vibrisas. Por ejemplo, Gharaei y colaboradores utilizaron estímulos de vibración aplicados en la punta de la vibrisa, mientras que en nuestro estudio, se utilizó estimulación directa en el terminal nervioso, de forma que era esperable una diferencia en la latencia (Gharaei et al., 2018).

### **Cambios en la respuesta luego del emparejamiento**

En el campo del estudio del aprendizaje asociativo, se ha reportado en la literatura la posibilidad de inducir este tipo de aprendizajes condicionados en ratas anestesiadas. El estudio de la formación de condicionamientos bajo anestesia fue inicialmente reportado por Rosenkrantz y Grace (2002) y por Laviolette y colaboradores (2005) y dio paso a muchas investigaciones en varias especies y con el empleo de diversos paradigmas. Sin embargo, aún no es clara la contribución particular de muchas estructuras para la formación de este tipo de aprendizaje (Rosenkranz & Grace, 2002; Laviolette, Lipski, & Grace, 2005).

Podría inferirse que las mismas estructuras cuya lesión interfiere sobre la formación de las memorias en animales despiertos, deben ser claves en la formación de las mismas memorias durante la anestesia. Sin embargo, esto no excluye la posibilidad de que existan rutas alternas

que permitan asociar los efectos de diversos estímulos, tal como se demostró por el grupo de Fanselow al evidenciar que la amígdala basolateral podría ser “saltada” en la formación de una memoria al contexto, siempre y cuando se realizaran muchos ensayos de entrenamiento (Ponnusamy, Poulos, & Fanselow, 2007).

En el estudio del condicionamiento pavloviano bajo anestesia, es particularmente amplio el estudio del papel de la amígdala lateral y de sus conexiones con otras estructuras, como por ejemplo, el córtex prefrontal (Fenton, Spicer, Halliday, Mason, & Stevenson, 2013; Rosenkranz & Grace, 2002; Laviolette, Lipski, & Grace, 2005). Desde este marco, el presente trabajo buscó determinar si tras el emparejamiento repetido de un estímulo lumínico con uno somatosensorial, se modificaría la respuesta inicial frente al lumínico.

En contraste, con relación al engrama, definido en estudios anteriores como la activación de un grupo neuronal asociado a un evento que se da como resultado un cambio persistente en la actividad neuronal (Josselyn et al., 2015), y dada la evidencia científica que apunta a la formación de engramas en la amígdala, se podría asumir que los cambios observados en la amígdala pueden corresponder a la formación de un engrama relacionado con la asociación de los estímulos visual y somatosensorial. Esto tiene relevancia ya que la activación simultánea de las neuronas que componen el engrama durante el proceso de generación de nuevas memorias involucra también la evocación de estas memorias, así, el engrama estará de forma latente durante la decodificación y en la evocación (Josselyn et al., 2015). Estudios registrando la actividad de neuronas en la amígdala lateral dorsal, antes, durante y después de un condicionamiento aversivo auditivo mostraron cambios en la actividad eléctrica de estas neuronas en comparación a un grupo experimental que no tuvo el mismo condicionamiento

(Repa et al., 2001), así, estableciendo un paralelo con lo hallado en este trabajo, es posible que la respuesta eléctrica captada, esté relacionada a los engramas situados en la amígdala lateral.

Los resultados para el colículo superior mostraron que los componentes (P1N1, P2N2 y P3N3) del potencial evocado por el estímulo lumínico no cambiaron tras el emparejamiento. Esto es consistente con la literatura, ya que se sabe que el colículo superior cumple fundamentalmente una función de entrada sensorial visual multimodal (capas superficiales de tipo lumínico y capas profundas de tipo somato sensorial provenientes de vibrisas) (Gharaei et al., 2018) y no es clara su participación en procesos de aprendizaje asociativo, no obstante, esta estructura se conecta con la amígdala como ya reportado en diferentes estudios (Linke et al., 1999; Rafal et al., 2015) (LeDoux, 2003). Por otro lado, cuando se evaluó un potencial tardío (150 ms a 300 ms) se encontró un aumento significativo de la actividad eléctrica luego de la presentación repetida del estímulo lumínico en ausencia del eléctrico (emparejado 2) comparado con el estímulo emparejado en el componente N2P2. Estos datos sugieren una posible pérdida del efecto inhibitorio (probablemente GABAérgico), como consecuencia de la estimulación eléctrica repetida durante el periodo de emparejamiento, así acoplándose a un modelo de fatiga por exposición al mismo estímulo (Boehnke et al., 2011; Gharaei et al., 2018).

En el caso de la amígdala, se evidenciaron cambios en los componentes estables del potencial provocado por el estímulo lumínico. Los datos fueron analizados realizando una normalización con respecto al promedio de la actividad de la línea base (50 ms antes del estímulo luminoso) para ser expresados en términos de transformada Z. Este análisis mostró que, luego del emparejamiento, hubo diferencias en la amplitud de los componentes del potencial en la amígdala. Luego de la aplicación repetida del estímulo lumínico en ausencia del estímulo eléctrico estas diferencias desaparecieron. Esto indica que el proceso de emparejamiento entre un



estímulo lumínico y uno eléctrico puede llevar a cambios electrofisiológicos relacionados con el aprendizaje asociativo dado que son registrados en la amígdala, la cual ha sido tradicionalmente vinculada a este proceso (LeDoux, 2003), no obstante estos datos pudieron haber sido afectados gracias a la inhibición latente o preexposición al estímulo condicionado.

Este fenómeno corresponde a que el proceso de familiarización con un estímulo disminuye la facilidad con la que éste puede ser asociado con otro, en el momento en que se desee establecer un aprendizaje asociativo utilizándolo (Lubow, Rifkin, & Alek, 1976). En este trabajo, se requirió de la presentación del estímulo lumínico 100 veces en una duración de 10 ms y 100 veces en una duración de 20 ms, antes de su asociación con el estímulo eléctrico. Por tanto, era plausible suponer que se establecería una familiaridad con él y de esta forma su asociación con el estímulo eléctrico se vería perjudicada. Por esta razón, se realizaron 300 ensayos de emparejamiento. Resulta imposible determinar si este número de emparejamientos resultó insuficiente para la realización del aprendizaje o si el efecto esperado podría verse tras un aumento en el número de ensayos de emparejamiento.

Por otra parte, se ha reportado también que la pre-exposición al estímulo que se va a utilizar como “incondicionado”, en el caso del condicionamiento pavloviano, también interfiere con la facilidad para la formación del aprendizaje asociativo. Igualmente, en nuestro caso, se debió presentar el estímulo eléctrico 200 veces (100 para cada nivel de intensidad: 0,5 mA y 2 mA), lo cual también creó una familiaridad con el estímulo que pudo haber interferido con la formación de la asociación.

El hecho de haber encontrado cambios claros en las señales eléctricas, tanto en colículo superior como en amígdala, frente a la presentación de los estímulos lumínicos como eléctricos, parece confirmar la idea de que la ausencia de cambios significativos luego de la asociación

puede haberse debido a los fenómenos mencionados de inhibición latente y de preexposición al estímulo incondicionado.

En general se puede afirmar que el emparejamiento de los dos estímulos utilizados condujo a que algunas de las neuronas en la amígdala respondieran diferencialmente frente al estímulo luminoso, como consecuencia de su emparejamiento con el estímulo eléctrico, pero este efecto no fue claro. De esta forma, se recomienda la realización de nuevos experimentos que busquen minimizar la variabilidad reportada aquí.

En varias especies, incluidas ratas y humanos (adultos y niños), se ha demostrado la existencia de un potencial tardío, relacionado con eventos emocionales, denominado N150 (Knippenberg et al., 2008). Este potencial fue descrito en ratas, frente a la presentación de estímulos auditivos aversivos de alta intensidad (>100 dB), pero ha sido demostrado también en varios tipos de condicionamiento pavlovianos, tanto aversivos como apetitivos (Knippenberg et al., 2008; Knippenberg, Maes, Coenen, & van, 2009). Este potencial tardío parece señalar el valor emocional de un estímulo que ha sido previamente asociado con un estímulo inicialmente neutro, posiblemente induciendo un estado de ansiedad anticipatoria (Knippenberg et al., 2008). Contrario a la literatura, en este trabajo no resultó evidente la presencia de este componente, razón por la cual no se realizaron análisis estadísticos. No debe excluirse la posibilidad de que la familiaridad con los dos estímulos utilizados (lumínico o eléctrico) haya llevado a una disminución de este potencial tardío. Los datos que se recolectaron aquí no permiten confirmar o rechazar esta posibilidad.

Resulta llamativo que este componente tampoco fuera visible ante la estimulación eléctrica en el parche de las vibrisas, ni con 0,5 mA ni con 2 mA. En algunos reportes se ha detectado su presencia en promedios tomados de 40 presentaciones y se demostró también que

luego de 200 presentaciones del estímulo condicionado (ruido blanco de 85 dB y 8 segundos de duración) el componente N150 iba perdiendo intensidad paulatinamente (Knippenberg et al., 2008).

De acuerdo con lo anterior, una recomendación a futuro sería la realización de experimentos que disminuyan el número de presentaciones de los estímulos a utilizar, para impedir los fenómenos de inhibición latente y de preexposición al estímulo incondicionado, así como para impedir la desaparición (o atenuación) del componente emocional N150.

## **Poder espectral**

De forma general se encontraron diferencias significativas en las comparaciones de las bandas de frecuencia al analizar los valores absolutos y en menor medida al analizar los valores relativos. Frente a las diferencias de los poderes espectrales absolutos al comparar un estímulo lumínico de 10 ms vs 20 ms se identifica una constancia en la actividad en el colículo superior, lo cual está acorde con lo mencionado anteriormente de la funcionalidad de esta estructura ante estímulos de dichas características. Por otro lado, la amígdala no muestra similitud con el colículo superior, y se ven aumentadas las bandas Delta y Alpha, para el estímulo de 10 ms. Cambios significativos se ven en mayor medida con relación a la respuesta de la amígdala frente a un estímulo emparejado. Los resultados revelan que estos cambios ocurren en casi todas las bandas con excepción a Theta como visto anteriormente, lo que podría estar relacionado con un aumento de la actividad de esta estructura que finalmente está relacionado con la consolidación de ciertas memorias (Pare, 2003; Fenton et al., 2013). Adicionalmente, se observó un aumento de las bandas de frecuencia de HFO 1 y HFO 2 que están relacionadas con oscilaciones rápidas (o *fast ripples*) en ciertas partes de la corteza o inclusive en hipocampo de ratas (Scheffer-Teixeira

et al., 2013). Esto sugiere que existió un aumento del porcentaje de *fast ripples* en la amígdala ante el estímulo visual, como consecuencia del emparejamiento de este con el estímulo somatosensorial, aumento que se mantuvo inclusive luego de la presentación repetida del estímulo lumínico aislado (no emparejado 2). Podría tratarse de un aumento de la conectividad sináptica en esa región, posiblemente como resultado de la plasticidad.

Adicionalmente, Oya y colaboradores (2002) midieron la distribución de las bandas de frecuencias en la amígdala durante la presentación de estímulos visuales de diferentes valencias emocionales en humanos. Este estudio reveló que ante estímulos de valencia emocional negativa la amígdala presentó una actividad gamma significativamente diferente a la presentada a estímulos visuales de valencia emocional neutro o positiva (Oya, Kawasaki, Howard, & Adolphs, 2002). Estudios mas recientes apoyan los hallazgos de Oya y colaboradores, en donde se observó el aumento de la banda de frecuencia Gamma en amígdala tras la presentación de imágenes dinámicas con valencia negativa, interesante encontraron que la frecuencia Delta se vio disminuida con este mismo tipo de estímulo, contrario a lo encontrado en este experimento (Fedele et al., 2020).

## **CONCLUSIONES**

1. Se definen por primera vez los componentes de un potencial evocado por estimulación lumínica de 20 ms en la amígdala en ratas Wistar.
2. La presentación de un estímulo luminoso emparejado con uno somatosensorial en el parche de vibras induce cambios electrofisiológicos en la amígdala, en animales anestesiados

3. El emparejamiento de un estímulo luminoso con uno somatosensorial en el parche de vibrisas causó un cambio en la potencia espectral absoluta las bandas de frecuencia, que se revirtió cuando el estímulo luminoso de 20 ms volvió a ser presentado de forma repetitiva y en ausencia del choque
4. La amígdala es sensible a la presentación contingente de estímulos de diferentes modalidades sensoriales
5. A diferencia de la amígdala el colículo superior no muestra cambios electrofisiológicos asociados a la presentación contingente de estímulos polimodales en potenciales tempranos. Sin embargo, se presentó un aumento en un componente tardío luego de la presentación repetida del estímulo visual en ausencia del eléctrico

## **Limitaciones**

En la realización de este trabajo se presentaron algunos inconvenientes e imprevistos. Entre ellos uno muy importante se relacionó con los sujetos experimentales ya que había gran variabilidad en los pesos en que ellos llegaban al laboratorio y esta variabilidad aumentaba el nivel de dificultad quirúrgico.

Otro problema pudo haber estado en la calidad de los electrodos, ya que al fabricarlos a mano y con toda la rigurosidad que podría ser aplicada en ese momento, siempre había la posibilidad de que no quedaran adecuados para el registro.

Es importante limitar el experimento en trabajos futuros ya que varios problemas surgieron por la cantidad de horas que el animal permaneció en cirugía, la muerte prematura

durante el experimento fue una de ellas. Es importante mencionar también la cantidad de fármaco administrado para mantener los sujetos bajo anestesia, no se sabe a lo cierto como pueda interactuar el Uretano con la actividad eléctrica de colículo superior y amígdala bajo esas mismas condiciones.

## **Trabajos a futuro**

Se proponen los siguientes trabajos a futuro:

- Actividad electrofisiológica de la amígdala en ratas anestesiadas ante un estímulo condicionado lumínico de 20 ms de duración previamente (animal despierto) emparejado con un estímulo eléctrico de 2 mA, este trabajo podría mostrar mejor la actividad de la amígdala y podría ser un excelente complemento para el actual trabajo.
- Análisis de la actividad electrofisiológica de la amígdala suscitado por un estímulo lumínico no emparejado vs uno emparejado durante un bloqueo temporal de la funcionalidad del colículo superior y de la corteza occipital en ratas anestesiadas.

Referencias

- Antonov, I., Antonova, I., Kandel, E. R., & Hawkins, R. D. (2001). The contribution of activity-dependent synaptic plasticity to classical conditioning in *Aplysia*. *J.Neurosci.*, *21*, 6413-6422.
- Bao, J. X., Kandel, E. R., & Hawkins, R. D. (1998). Involvement of presynaptic and postsynaptic mechanisms in a cellular analog of classical conditioning at *Aplysia* sensory-motor neuron synapses in isolated cell culture. *J.Neurosci.*, *18*, 458-466.
- Bindi, R. P., Baldo, M. V. C., & Canteras, N. S. (2018). Roles of the anterior basolateral amygdalar nucleus during exposure to a live predator and to a predator-associated context. *Behav.Brain Res.*, *342*, 51-56.
- Blackwell, K. T. & Alkon, D. L. (1999). Ryanodine receptor modulation of in vitro associative learning in *Hermissenda crassicornis*. *Brain Res.*, *822*, 114-125.
- Blair, H. T., Schafe, G. E., Bauer, E. P., Rodrigues, S. M., & LeDoux, J. E. (2001). Synaptic plasticity in the lateral amygdala: a cellular hypothesis of fear conditioning. *Learn.Mem.*, *8*, 229-242.
- Blair, H. T., Sotres-Bayon, F., Moita, M. A., & LeDoux, J. E. (2005). The lateral amygdala processes the value of conditioned and unconditioned aversive stimuli. *Neuroscience*, *133*, 561-569.
- Blair, H. T., Tinkelman, A., Moita, M. A., & LeDoux, J. E. (2003). Associative plasticity in neurons of the lateral amygdala during auditory fear conditioning. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, *985*, 485-487.
- Boehnke, S. E., Berg, D. J., Marino, R. A., Baldi, P. F., Itti, L., & Munoz, D. P. (2011). Visual adaptation and novelty responses in the superior colliculus. *Eur.J.Neurosci.*, *34*, 766-779.
- Bonebakker, A. E., Bonke, B., Klein, J., Wolters, G., Stijnen, T., Passchier, J. et al. (1996). Information processing during general anesthesia: evidence for unconscious memory. *Mem.Cognit.*, *24*, 766-776.
- Brown, S. & Schäffer, E. A. (1888). An Investigation into the Functions of the Occipital and Temporal Lobes of the Monkey's Brain. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.*, *179*, 307-327.
- Bucy, P. C. & Kluver, H. (1955). An anatomical investigation of the temporal lobe in the monkey (*Macaca mulatta*). *J.Comp Neurol.*, *103*, 151-251.
- Campese, V. D., Sears, R. M., Moscarello, J. M., Diaz-Mataix, L., Cain, C. K., & LeDoux, J. E. (2016). The Neural Foundations of Reaction and Action in Aversive Motivation. *Curr.Top.Behav.Neurosci.*, *27*, 171-195.

- Canteras, N. S., Resstel, L. B., Bertoglio, L. J., Carobrez, A. P., & Guimaraes, F. S. (2010). Neuroanatomy of anxiety. *Curr.Top.Behav.Neurosci.*, 2, 77-96.
- Cavallo, J. S., Hamilton, B. N., & Farley, J. (2014). Behavioral and neural bases of extinction learning in Hermissenda. *Front Behav.Neurosci.*, 8, 277.
- Cavallo, J. S., Hamilton, B. N., & Farley, J. (2014). In vitro extinction learning in Hermissenda: involvement of conditioned inhibition molecules. *Front Behav.Neurosci.*, 8, 354.
- Chaaya, N., Jacques, A., Belmer, A., Richard, D. J., Bartlett, S. E., Battle, A. R. et al. (2019). Localization of Contextual and Context Removed Auditory Fear Memory within the Basolateral Amygdala Complex. *Neuroscience*, 398, 231-251.
- Chang-Hwan, I. (2018). *Computational EEG Analysis*. Seoul: Springer Nature Singapore Pte Ltd.
- 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. *Learn.Mem.*, 17, 139-147.
- Cisler, J. M. & Koster, E. H. (2010). Mechanisms of attentional biases towards threat in anxiety disorders: An integrative review. *Clin.Psychol.Rev.*, 30, 203-216.
- Cohen, J. D. & Castro-Alamancos, M. A. (2007). Early sensory pathways for detection of fearful conditioned stimuli: tectal and thalamic relays. *J.Neurosci.*, 27, 7762-7776.
- Cohen, J. D. & Castro-Alamancos, M. A. (2010). Neural correlates of active avoidance behavior in superior colliculus. *J.Neurosci.*, 30, 8502-8511.
- Cork, R. C., Heaton, J. F., Campbell, C. E., & Kihlstrom, J. F. (1996). Is there implicit memory after propofol sedation? *Br.J.Anaesth.*, 76, 492-498.
- Crow, T. & Tian, L. M. (2006). Pavlovian conditioning in Hermissenda: a circuit analysis. *Biol.Bull.*, 210, 289-297.
- De, C. A. & Codispoti, M. (2015). Can the Outputs of LGN Y-Cells Support Emotion Recognition? A Computational Study. *Comput.Intell.Neurosci.*, 2015, 695921.
- De Oliveira, R. C., Falconi-Sobrinho, L. L., da Silva, S. R., Jr., & Coimbra, N. C. (2017). 5-Hydroxytryptamine<sub>2A/2C</sub> receptors of nucleus raphe magnus and gigantocellularis/paragigantocellularis pars alpha reticular nuclei modulate the unconditioned fear-induced antinociception evoked by electrical stimulation of deep layers of the superior colliculus and dorsal periaqueductal grey matter. *Behav.Brain Res.*, 316, 294-304.



- Dean, P. & Redgrave, P. (1984). Superior colliculus and visual neglect in rat and hamster. III. Functional implications. *Brain Res.*, 320, 155-163.
- Debiec, J. & LeDoux, J. E. (2004). Disruption of reconsolidation but not consolidation of auditory fear conditioning by noradrenergic blockade in the amygdala. *Neuroscience*, 129, 267-272.
- Deeprase, C., Andrade, J., Varma, S., & Edwards, N. (2004). Unconscious learning during surgery with propofol anaesthesia. *Br.J.Anaesth.*, 92, 171-177.
- Domjam, M. (2010). *Principios de Aprendizaje y Conducta*. (6 ed.) México: Wadsworth.
- Doron, N. N. & LeDoux, J. E. (1999). Organization of projections to the lateral amygdala from auditory and visual areas of the thalamus in the rat. *J.Comp Neurol.*, 412, 383-409.
- Dyer, R. S. & Annau, Z. (1977). Flash evoked potentials from rat superior colliculus. *Pharmacol.Biochem.Behav.*, 6, 453-459.
- Engel Jr, J., Bragin, A., Staba, R., & Mody, I. (2009). High-frequency oscillations: What is normal and what is not? *Epilepsia*, 50, 598-604.
- Farley, J. & Alkon, D. L. (1987). In vitro associative conditioning of Hermissenda: cumulative depolarization of type B photoreceptors and short-term associative behavioral changes. *J.Neurophysiol.*, 57, 1639-1668.
- Farley, S. J., Albazboz, H., De Corte, B. J., Radley, J. J., & Freeman, J. H. (2018). Amygdala central nucleus modulation of cerebellar learning with a visual conditioned stimulus. *Neurobiol.Learn.Mem.*, 150, 84-92.
- Fedele, T., Tzovara, A., Steiger, B., Hilfiker, P., Grunwald, T., Stieglitz, L. et al. (2020). The relation between neuronal firing, local field potentials and hemodynamic activity in the human amygdala in response to aversive dynamic visual stimuli. *NeuroImage*, 213, 116705.
- Fenton, G. E., Spicer, C. H., Halliday, D. M., Mason, R., & Stevenson, C. W. (2013). Basolateral amygdala activity during the retrieval of associative learning under anesthesia. *Neuroscience*, 233, 146-156.
- Freitas-Ferrari, M. C., Hallak, J. E., Trzesniak, C., Filho, A. S., Machado-de-Sousa, J. P., Chagas, M. H. et al. (2010). Neuroimaging in social anxiety disorder: a systematic review of the literature. *Prog.Neuropsychopharmacol.Biol.Psychiatry*, 34, 565-580.
- Freund, T. F. & Katona, I. (2007). Perisomatic inhibition. *Neuron*, 56, 33-42.

- García, R., Paquereau, J., Vouimba, R. M., & Jaffard, R. (1998). Footshock stress but not contextual fear conditioning induces long-term enhancement of auditory-evoked potentials in the basolateral amygdala of the freely behaving rat. *Eur.J.Neurosci.*, *10*, 457-463.
- Gharaei, S., Arabzadeh, E., & Solomon, S. G. (2018). Integration of visual and whisker signals in rat superior colliculus. *Sci.Rep.*, *8*, 16445.
- Goldstein, E. B., Blanco, M. J., & Sampedro Suárez, L. (2009). *Sensación y percepción*. (1 ed., 2 reimp ed.) Madrid: Paraninfo.
- Goodale, M. A. & Murison, R. C. (1975). The effects of lesions of the superior colliculus on locomotor orientation and the orienting reflex in the rat. *Brain Res.*, *88*, 243-261.
- Harris, A. P., Lennen, R. J., Marshall, I., Jansen, M. A., Pernet, C. R., Brydges, N. M. et al. (2015). Imaging learned fear circuitry in awake mice using fMRI. *Eur.J.Neurosci.*, *42*, 2125-2134.
- Hawkins, R. D., Clark, G. A., & Kandel, E. R. (2006). Operant conditioning of gill withdrawal in *Aplysia*. *J.Neurosci.*, *26*, 2443-2448.
- Hawkins, R. D., Greene, W., & Kandel, E. R. (1998). Classical conditioning, differential conditioning, and second-order conditioning of the *Aplysia* gill-withdrawal reflex in a simplified mantle organ preparation. *Behav.Neurosci.*, *112*, 636-645.
- Hetzler, B. E., McLester-Davis, L. W. Y., & Tenpas, S. E. (2019). Methylphenidate and alcohol effects on flash-evoked potentials, body temperature, and behavior in Long-Evans rats. *Alcohol*, *77*, 79-89.
- Holdstock, T. L. (1969). Autonomic reactivity following septal and amygdaloid lesions in white rats. *Physiology & Behavior*, *4*, 603-606.
- Isa, T. & Yoshida, M. (2009). Saccade control after V1 lesion revisited. *Curr.Opin.Neurobiol.*, *19*, 608-614.
- Ito, S. & Feldheim, D. A. (2018). The Mouse Superior Colliculus: An Emerging Model for Studying Circuit Formation and Function. *Frontiers in neural circuits*, *12*, 10.
- Ito, W. & Morozov, A. (2019). Prefrontal-amygdala plasticity enabled by observational fear. *Neuropsychopharmacology*, *44*, 1778-1787.
- Iwata, J., LeDoux, J. E., Meeley, M. P., Arneric, S., & Reis, D. J. (1986). Intrinsic neurons in the amygdaloid field projected to by the medial geniculate body mediate emotional responses conditioned to acoustic stimuli. *Brain Res.*, *383*, 195-214.

- Izquierdo, I., Furini, C. R., & Myskiw, J. C. (2016). Fear Memory. *Physiol Rev.*, *96*, 695-750.
- Jacques, A., Chaaya, N., Hettiarachchi, C., Carmody, M. L., Beecher, K., Belmer, A. et al. (2019). Microtopography of fear memory consolidation and extinction retrieval within prefrontal cortex and amygdala. *Psychopharmacology (Berl)*, *236*, 383-397.
- Janak, P. H. & Tye, K. M. (2015). From circuits to behaviour in the amygdala. *Nature*, *517*, 284-292.
- Josselyn, S. A., Kohler, S., & Frankland, P. W. (2015). Finding the engram. *Nat.Rev.Neurosci.*, *16*, 521-534.
- Josselyn, S. A., Kohler, S., & Frankland, P. W. (2017). Heroes of the Engram. *J.Neurosci.*, *37*, 4647-4657.
- Josselyn, S. A. & Frankland, P. W. (2018). Memory Allocation: Mechanisms and Function. *Annual Review of Neuroscience*, *41*, 389-413.
- Kay, J. N., De la Huerta, I., Kim, I. J., Zhang, Y., Yamagata, M., Chu, M. W. et al. (2011). Retinal Ganglion Cells with Distinct Directional Preferences Differ in Molecular Identity, Structure, and Central Projections. *The Journal of Neuroscience*, *31*, 7753.
- Keifer, J., Zheng, Z., & Mokin, M. (2008). Synaptic localization of GluR4-containing AMPARs and Arc during acquisition, extinction, and reacquisition of in vitro classical conditioning. *Neurobiol.Learn.Mem.*, *90*, 301-308.
- Kim, N., Kong, M. S., Jo, K. I., Kim, E. J., & Choi, J. S. (2015). Increased tone-offset response in the lateral nucleus of the amygdala underlies trace fear conditioning. *Neurobiol.Learn.Mem.*, *126*, 7-17.
- Kim, W. B. & Cho, J. H. (2017). Encoding of Discriminative Fear Memory by Input-Specific LTP in the Amygdala. *Neuron*, *95*, 1129-1146.
- Kinoshita, M., Kato, R., Isa, K., Kobayashi, K., Kobayashi, K., Onoe, H. et al. (2019). Dissecting the circuit for blindsight to reveal the critical role of pulvinar and superior colliculus. *Nat.Commun.*, *10*, 135.
- Knippenberg, J. M., Maes, J. H., Coenen, A. M., & van, L. G. (2009). Effect of appetitive Pavlovian conditioning on the N150 of the amygdalar Auditory Evoked Potential in the rat. *Brain Res.*, *1267*, 57-64.
- Knippenberg, J. M., Maes, J. H., Kuniecki, M. J., Buyse, B. A., Coenen, A. M., & van, L. G. (2008). N150 in amygdalar ERPs in the rat: is there modulation by anticipatory fear? *Physiol Behav.*, *93*, 222-228.
- Konno, S. & Ohtsuka, K. (1997). Accommodation and pupilloconstriction areas in the cat midbrain. *Jpn.J.Ophthalmol.*, *41*, 43-48.

- Kortelainen, J., Vipin, A., Thow, X. Y., Mir, H., Thakor, N., Al-Nashash, H. et al. (2014). Effect of isoflurane on somatosensory evoked potentials in a rat model. *Conf.Proc.IEEE Eng Med.Biol.Soc., 2014*, 4286-4289.
- Koutalidis, O., Foster, A., & Weisz, D. J. (1988). Parallel pathways can conduct visual CS information during classical conditioning of the NM response. *J.Neurosci., 8*, 417-427.
- Kraft, A., Grimsen, C., Kehrer, S., Bahnemann, M., Spang, K., Prass, M. et al. (2014). Neurological and neuropsychological characteristics of occipital, occipito-temporal and occipito-parietal infarction. *Cortex, 56*, 38-50.
- Kuniecki, M., Coenen, A. M., & Kaiser, J. (2002). Correlation between long latency evoked potentials from amygdala and evoked cardiac response to fear conditioned stimulus in rats. *Acta Neurobiol.Exp.(Wars.)*, 62, 85-92.
- Kyojimaekawa, Toshiakitakeda, Maekawa, K., & Takeda, T. (1975). Mossy fiber responses evoked in the cerebellar flocculus of rabbits by stimulation of the optic pathway. *Brain Res., 98*, 590-595.
- Land, R., Engler, G., Kral, A., & Engel, A. K. (2012). Auditory evoked bursts in mouse visual cortex during isoflurane anesthesia. *PLoS.One., 7*, e49855.
- Laviolette, S. R., Lipski, W. J., & Grace, A. A. (2005). A subpopulation of neurons in the medial prefrontal cortex encodes emotional learning with burst and frequency codes through a dopamine D4 receptor-dependent basolateral amygdala input. *J.Neurosci., 25*, 6066-6075.
- Laviolette, S. R., Lipski, W. J., & Grace, A. A. (2005). A subpopulation of neurons in the medial prefrontal cortex encodes emotional learning with burst and frequency codes through a dopamine D4 receptor-dependent basolateral amygdala input. *J.Neurosci., 25*, 6066-6075.
- Le, Q. V., Nishimaru, H., Matsumoto, J., Takamura, Y., Nguyen, M. N., Mao, C. V. et al. (2019). Gamma oscillations in the superior colliculus and pulvinar in response to faces support discrimination performance in monkeys. *Neuropsychologia, 128*, 87-95.
- Leal-Campanario, R., Delgado-Garcia, J. M., & Gruart, A. (2006). Microstimulation of the somatosensory cortex can substitute for vibrissa stimulation during Pavlovian conditioning. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 103*, 10052-10057.
- LeDoux, J. (2003). The emotional brain, fear, and the amygdala. *Cell Mol.Neurobiol., 23*, 727-738.
- LeDoux, J. (2007). The amygdala. *Curr.Biol., 17*, R868-R874.
- LeDoux, J. (2012). Rethinking the emotional brain. *Neuron, 73*, 653-676.

- LeDoux, J. E. (2000). Emotion circuits in the brain. *Annual Review of Neuroscience*, 23, 155-184.
- LeDoux, J. E. (2014). Coming to terms with fear. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 111, 2871-2878.
- LeDoux, J. E. & Brown, R. (2017). A higher-order theory of emotional consciousness. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 114, E2016-E2025.
- LeDoux, J. E., Cicchetti, P., Xagoraris, A., & Romanski, L. M. (1990). The lateral amygdaloid nucleus: sensory interface of the amygdala in fear conditioning. *J.Neurosci.*, 10, 1062-1069.
- LeDoux, J. E., Farb, C., & Ruggiero, D. A. (1990). Topographic organization of neurons in the acoustic thalamus that project to the amygdala. *J.Neurosci.*, 10, 1043-1054.
- 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. *J.Neurosci.*, 8, 2517-2529.
- LeDoux, J. E., Iwata, J., Pearl, D., & Reis, D. J. (1986). Disruption of auditory but not visual learning by destruction of intrinsic neurons in the rat medial geniculate body. *Brain Res.*, 371, 395-399.
- LeDoux, J. E., Ruggiero, D. A., & Reis, D. J. (1985). Projections to the subcortical forebrain from anatomically defined regions of the medial geniculate body in the rat. *J.Comp Neurol.*, 242, 182-213.
- LeDoux, J. E., Sakaguchi, A., Iwata, J., & Reis, D. J. (1985). Auditory emotional memories: establishment by projections from the medial geniculate nucleus to the posterior neostriatum and/or dorsal amygdala. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 444, 463-464.
- LeDoux, J. E., Sakaguchi, A., Iwata, J., & Reis, D. J. (1986). Interruption of projections from the medial geniculate body to an archi-neostriatal field disrupts the classical conditioning of emotional responses to acoustic stimuli. *Neuroscience*, 17, 615-627.
- Lent, R. (2010). *Cem bilhões de neurônios: Conceitos fundamentais de Neurociência*. (2 ed.) Rio de Janeiro: Atheneu.
- Linke, R., De Lima, A. D., Schwegler, H., & Pape, H. C. (1999). Direct synaptic connections of axons from superior colliculus with identified thalamo-amygdaloid projection neurons in the rat: possible substrates of a subcortical visual pathway to the amygdala. *J.Comp Neurol.*, 403, 158-170.
- Lithari, C., Moratti, S., & Weisz, N. (2015). Thalamocortical interactions underlying visual fear conditioning in humans. *Hum.Brain Mapp.*, 36, 4592-4603.

- Lubow, R. E., Rifkin, B., & Alek, M. (1976). The context effect: The relationship between stimulus preexposure and environmental preexposure determines subsequent learning. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, 2, 38-47.
- Luck, S. J. (2014). *An Introduction to the Event-related Potential Technique*. MIT Press.
- Maior, R. S., Hori, E., Barros, M., Teixeira, D. S., Tavares, M. C., Ono, T. et al. (2011). Superior colliculus lesions impair threat responsiveness in infant capuchin monkeys. *Neurosci.Lett.*, 504, 257-260.
- Maren, S. (1999). Neurotoxic or electrolytic lesions of the ventral subiculum produce deficits in the acquisition and expression of Pavlovian fear conditioning in rats. *Behav.Neurosci.*, 113, 283-290.
- Maren, S. (2001). Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. *Annual Review of Neuroscience*, 24, 897-931.
- Maren, S. (2017). Synapse-Specific Encoding of Fear Memory in the Amygdala. *Neuron*, 95, 988-990.
- Maren, S. & Quirk, G. J. (2004). Neuronal signalling of fear memory. *Nat.Rev.Neurosci.*, 5, 844-852.
- Miller, A. M., Miller, R. B., Obermeyer, W. H., Behan, M., & Benca, R. M. (1999). The pretectum mediates rapid eye movement sleep regulation by light. *Behav.Neurosci.*, 113, 755-765.
- Mirochnik, R. & Pezaris, J. (2019). Contemporary approaches to visual prostheses. *Military Medical Research*, 19.
- Mirolli, M., Mannella, F., & Baldassarre, G. (2010). The Roles of the Amygdala in the Affective Regulation of Body, Brain, and Behaviour. *Connection Science*.
- Mitra, R. (2019). Neuronal Plasticity in the Amygdala Following Predator Stress Exposure. *Front Behav.Neurosci.*, 13, 25.
- Mobbs, D., Adolphs, R., Fanselow, M. S., Barrett, L. F., LeDoux, J. E., Ressler, K. et al. (2019). Viewpoints: Approaches to defining and investigating fear. *Nat.Neurosci.*, 22, 1205-1216.
- Nargeot, R., Petrissans, C., & Simmers, J. (2007). Behavioral and in vitro correlates of compulsive-like food seeking induced by operant conditioning in Aplysia. *J.Neurosci.*, 27, 8059-8070.
- Oh, M. M. & Disterhoft, J. F. (2010). Neuron Excitability and Learning. In G.F.Koob, M. Le Moal, & R. F. Thompson (Eds.), *Encyclopedia of Behavioral Neuroscience* (pp. 416-424). Academic Press.
- Overton, P., Dean, P., & Redgrave, P. (1985). Detection of visual stimuli in far periphery by rats: possible role of superior colliculus. *Exp.Brain Res.*, 59, 559-569.

- Oya, H., Kawasaki, H., Howard, M. A., III, & Adolphs, R. (2002). Electrophysiological responses in the human amygdala discriminate emotion categories of complex visual stimuli. *J.Neurosci.*, 22, 9502-9512.
- Pare, D. (2003). Role of the basolateral amygdala in memory consolidation. *Prog.Neurobiol.*, 70, 409-420.
- Park, S., Lee, J., Park, K., Kim, J., Song, B., Hong, I. et al. (2016). Sound tuning of amygdala plasticity in auditory fear conditioning. *Sci.Rep.*, 6, 31069.
- Paxinos, G. & Watson, C. (2007). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. (6th ed ed.) Amsterdam: Academic Press/Elsevier.
- Pechtel, P. & Pizzagalli, D. A. (2011). Effects of early life stress on cognitive and affective function: an integrated review of human literature. *Psychopharmacology (Berl)*, 214, 55-70.
- Petruno, S. K., Clark, R. E., & Reinagel, P. (2013). Evidence that primary visual cortex is required for image, orientation, and motion discrimination by rats. *PLoS.One.*, 8, e56543.
- Pezze, M. A., Marshall, H. J., Domonkos, A., & Cassaday, H. J. (2016). Effects of dopamine D1 modulation of the anterior cingulate cortex in a fear conditioning procedure. *Prog.Neuropsychopharmacol.Biol.Psychiatry*, 65, 60-67.
- Pitkanen, A., Savander, M., Nurminen, N., & Ylinen, A. (2003). Intrinsic synaptic circuitry of the amygdala. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 985, 34-49.
- Ponnusamy, R., Poulos, A. M., & Fanselow, M. S. (2007). Amygdala-dependent and amygdala-independent pathways for contextual fear conditioning. *Neuroscience*, 147, 919-927.
- Protopopescu, X., Pan, H., Tuescher, O., Cloitre, M., Goldstein, M., Engelien, W. et al. (2005). Differential time courses and specificity of amygdala activity in posttraumatic stress disorder subjects and normal control subjects. *Biol.Psychiatry*, 57, 464-473.
- Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Klajn, D. S., & Argüelles Luis, J. (2017). *Neurociencia. 5a ed., 1a reimp.*
- Rabinak, C. A., Orsini, C. A., Zimmerman, J. M., & Maren, S. (2009). The amygdala is not necessary for unconditioned stimulus inflation after Pavlovian fear conditioning in rats. *Learn.Mem.*, 16, 645-654.
- Rafal, R. D., Koller, K., Bultitude, J. H., Mullins, P., Ward, R., Mitchell, A. S. et al. (2015). Connectivity between the superior colliculus and the amygdala in humans and macaque monkeys: virtual dissection with probabilistic DTI tractography. *J.Neurophysiol.*, 114, 1947-1962.

- Redell, J. B., Xue-Bian, J. J., Bubb, M. R., & Crow, T. (2007). One-trial in vitro conditioning regulates an association between the beta-thymosin repeat protein Csp24 and actin. *Neuroscience*, *148*, 413-420.
- Redolar Ripoll, D. (2017). *Neurociencia cognitiva*. (1 ed., 2 reimp. ed.) Madrid etc: Médica Panamericana.
- Reinagel, P. (2001). How do visual neurons respond in the real world? *Curr.Opin.Neurobiol.*, *11*, 437-442.
- Reinagel, P. (2001). Neurobiology: The many faces of adaptation. *Nature*, *412*, 776-777.
- Repa, J. C., Muller, J., Apergis, J., Desrochers, T. M., Zhou, Y., & LeDoux, J. E. (2001). Two different lateral amygdala cell populations contribute to the initiation and storage of memory. *Nat.Neurosci.*, *4*, 724-731.
- Ressler, R. L. & Maren, S. (2019). Synaptic encoding of fear memories in the amygdala. *Curr.Opin.Neurobiol.*, *54*, 54-59.
- Reyes, F. D., Mozzachiodi, R., Baxter, D. A., & Byrne, J. H. (2005). Reinforcement in an in vitro analog of appetitive classical conditioning of feeding behavior in *Aplysia*: blockade by a dopamine antagonist. *Learn.Mem.*, *12*, 216-220.
- Reznikov, R., Bambico, F. R., Diwan, M., Raymond, R. J., Nashed, M. G., Nobrega, J. N. et al. (2018). Prefrontal Cortex Deep Brain Stimulation Improves Fear and Anxiety-Like Behavior and Reduces Basolateral Amygdala Activity in a Preclinical Model of Posttraumatic Stress Disorder. *Neuropsychopharmacology*, *43*, 1099-1106.
- Rojas, M. J., Navas, J. A., Greene, S. A., & Rector, D. M. (2008). Discrimination of auditory stimuli during isoflurane anesthesia. *Comp Med.*, *58*, 454-457.
- Root, J. C., Tuescher, O., Cunningham-Bussel, A., Pan, H., Epstein, J., Altemus, M. et al. (2009). Frontolimbic function and cortisol reactivity in response to emotional stimuli. *Neuroreport*, *20*, 429-434.
- Rosen, H. R. & Rich, B. A. (2010). Neurocognitive correlates of emotional stimulus processing in pediatric bipolar disorder: a review. *Postgrad.Med.*, *122*, 94-104.
- Rosenkranz, J. A. & Grace, A. A. (2002). Dopamine-mediated modulation of odour-evoked amygdala potentials during pavlovian conditioning. *Nature*, *417*, 282-287.
- Rosenkranz, J. A. & Urban, J. (2020). *Handbook of Amygdala Structure and Function*.



- Ryan, S., Li, C., Menigoz, A., Hazra, R., Dabrowska, J., Ehrlich, D. et al. (2018). Repeated shock stress facilitates basolateral amygdala synaptic plasticity through decreased cAMP-specific phosphodiesterase type IV (PDE4) expression. *Brain Struct.Funct.*, 223, 1731-1745.
- Sah, P., Faber, E. S., Lopez de, A. M., & Power, J. (2003). The amygdaloid complex: anatomy and physiology. *Physiol Rev.*, 83, 803-834.
- Samuel, N., Taub, A. H., Paz, R., & Raz, A. (2018). Implicit aversive memory under anaesthesia in animal models: a narrative review. *Br.J.Anaesth.*, 121, 219-232.
- Schacter, D. L. (2011). *Forgotten ideas, neglected pioneers Richard Semon and the story of memory*. New York: Routledge.
- Schafe, G. E., Nader, K., Blair, H. T., & LeDoux, J. E. (2001). Memory consolidation of Pavlovian fear conditioning: a cellular and molecular perspective. *Trends Neurosci.*, 24, 540-546.
- Scheffer-Teixeira, R., Belchior, H., Leao, R. N., Ribeiro, S., & Tort, A. B. (2013). On high-frequency field oscillations (>100 Hz) and the spectral leakage of spiking activity. *J.Neurosci.*, 33, 1535-1539.
- Schiffman, H. R. (2004). *Sensación y percepción un enfoque integrador*. (1 . ed. en español trad. de la 5 ed. en inglés ed.) México etc: Manual Moderno.
- Sefton, J. (1969). The electrical activity in the superior colliculus in the rat. *Vision Res.*, 9, 207-222.
- Shalev, L., Paz, R., & Avidan, G. (2018). Visual Aversive Learning Compromises Sensory Discrimination. *J.Neurosci.*, 38, 2766-2779.
- Sharpley, C. F. (2010). A review of the neurobiological effects of psychotherapy for depression. *Psychotherapy.(Chic.)*, 47, 603-615.
- Shi, C. & Davis, M. (2001). Visual Pathways Involved in Fear Conditioning Measured with Fear-Potentiated Startle: Behavioral and Anatomic Studies. *The Journal of Neuroscience*, 21, 9844.
- Spittgerber, R. & Snell, R. S. (2019). *Neuroanatomía clínica*. 8 ed. rev.
- Staib, M. & Bach, D. R. (2018). Stimulus-invariant auditory cortex threat encoding during fear conditioning with simple and complex sounds. *Neuroimage.*, 166, 276-284.
- Sunada, H., Lukowiak, K., & Sakakibara, M. (2012). In vitro aversion conditioning in Lymnaea. Short communication. *Acta Biol.Hung.*, 63 Suppl 2, 190-193.

- Teicher, M. H. & Samson, J. A. (2016). Annual Research Review: Enduring neurobiological effects of childhood abuse and neglect. *J.Child Psychol.Psychiatry*, *57*, 241-266.
- Tonegawa, S., Liu, X., Ramirez, S., & Redondo, R. (2015). Memory Engram Cells Have Come of Age. *Neuron*, *87*, 918-931.
- Tonge, D., Chan, K., Zhu, N., Panjwani, A., Arno, M., Lynham, S. et al. (2008). Enhancement of axonal regeneration by in vitro conditioning and its inhibition by cyclopentenone prostaglandins. *J.Cell Sci.*, *121*, 2565-2577.
- Troncoso, J., Munera, A., & Delgado-Garcia, J. M. (2004). Classical conditioning of eyelid and mystacial vibrissae responses in conscious mice. *Learn.Mem.*, *11*, 724-726.
- Urtubia, C. (2006). *Neurobiología de la visión*. Barcelona: Edicions UPS.
- Walker, D., Yang, Y., Ratti, E., Corsi, M., Trist, D., & Davis, M. (2009). Differential effects of the CRF-R1 antagonist GSK876008 on fear-potentiated, light- and CRF-enhanced startle suggest preferential involvement in sustained vs phasic threat responses. *Neuropsychopharmacology*, *34*, 1533-1542.
- Watanabe, S., Kato, I., Sato, S., & Norita, M. (1993). Direct projection from the nucleus of the optic tract to the medial vestibular nucleus in the cat. *Neurosci.Res.*, *17*, 325-329.
- Wei, P., Liu, N., Zhang, Z., Liu, X., Tang, Y., He, X. et al. (2015). Processing of visually evoked innate fear by a non-canonical thalamic pathway. *Nat.Commun.*, *6*, 6756.
- Weiskrantz, L. (1956). Behavioral changes associated with ablation of the amygdaloid complex in monkeys. *J.Comp Physiol Psychol.*, *49*, 381-391.
- Wellman, L. L., Fitzpatrick, M. E., Machida, M., & Sanford, L. D. (2014). The basolateral amygdala determines the effects of fear memory on sleep in an animal model of PTSD. *Exp.Brain Res.*, *232*, 1555-1565.
- Werness, S. A., Fay, S. D., Blackwell, K. T., Vogl, T. P., & Alkon, D. L. (1992). Associative learning in a network model of *Hermissenda crassicornis*. I. Theory. *Biol.Cybern.*, *68*, 125-133.
- Westby, G. W., Keay, K. A., Redgrave, P., Dean, P., & Bannister, M. (1990). Output pathways from the rat superior colliculus mediating approach and avoidance have different sensory properties. *Exp.Brain Res.*, *81*, 626-638.
- Whishaw, I. Q. & Kolb, B. (2005). *The behavior of the laboratory rat a handbook with tests*. Oxford: Oxford University Press.

- Wiemer, J. & Pauli, P. (2016). Enhanced functional connectivity between sensorimotor and visual cortex predicts covariation bias in spider phobia. *Biol.Psychol.*, *121*, 128-137.
- Wigestrand, M. B., Schiff, H. C., Fyhn, M., LeDoux, J. E., & Sears, R. M. (2017). Primary auditory cortex regulates threat memory specificity. *Learn.Mem.*, *24*, 55-58.
- Wilensky, A. E., Schafe, G. E., Kristensen, M. P., & LeDoux, J. E. (2006). Rethinking the fear circuit: the central nucleus of the amygdala is required for the acquisition, consolidation, and expression of Pavlovian fear conditioning. *J.Neurosci.*, *26*, 12387-12396.
- Wilensky, A. E., Schafe, G. E., & LeDoux, J. E. (2000). The amygdala modulates memory consolidation of fear-motivated inhibitory avoidance learning but not classical fear conditioning. *J.Neurosci.*, *20*, 7059-7066.
- Woodson, W., Farb, C. R., & LeDoux, J. E. (2000). Afferents from the auditory thalamus synapse on inhibitory interneurons in the lateral nucleus of the amygdala. *Synapse*, *38*, 124-137.
- Xintaras, C., Ulrich, C. E., Sobecki, M. F., & Terrill, R. E. (1966). Brain potentials studied by computer analysis. *Arch.Environ.Health*, *13*, 223-232.
- Yilmazer-Hanke, D. M., Faber-Zuschratter, H., Linke, R., & Schwegler, H. (2002). Contribution of amygdala neurons containing peptides and calcium-binding proteins to fear-potentiated startle and exploration-related anxiety in inbred Roman high- and low-avoidance rats. *Eur.J.Neurosci.*, *15*, 1206-1218.
- Zheng, Z. & Keifer, J. (2009). PKA has a critical role in synaptic delivery of GluR1- and GluR4-containing AMPARs during initial stages of acquisition of in vitro classical conditioning. *J.Neurophysiol.*, *101*, 2539-2549.
- Zimmerman, J. M., Rabinak, C. A., McLachlan, I. G., & Maren, S. (2007). The central nucleus of the amygdala is essential for acquiring and expressing conditional fear after overtraining. *Learn.Mem.*, *14*, 634-644.

## **Anexo A - Administración de sustancias – Protocolo**

## 1. INVASIVIDAD

De acuerdo con la USDA Pain and Distress Categories, este procedimiento se ubica en la categoría C, ya que es un procedimiento invasivo pero que causa malestar momentáneo.

## 2. OBJETO

Establecer las instrucciones a seguir para la aplicación de la inyección intraperitoneal, y subcutánea en ratas Wistar del Laboratorio de Neurofisiología de la Universidad Nacional de Colombia.

## 3. ALCANCE

La finalidad de este instructivo es proveer los conocimientos básicos y las mínimas instrucciones para realizar una inyección intraperitoneal y subcutánea en ratas Wistar. Este procedimiento puede ser ejecutado por el personal técnico e investigativo del Laboratorio de Neurofisiología de la Universidad Nacional de Colombia. Se necesita como mínimo un manejo de las ratas Wistar, manejo de sustancias y manejo con instrumentos como las agujas.

## 4. DEFINICIONES

Intraperitoneal: Que está localizado en el interior de la cavidad peritoneal.

Cavidad peritoneal: Espacio abdominal, revestido por el peritoneo posterior y por el peritoneo de la pared abdominal anterior, de la pelvis y de los diafragmas, que contiene en su interior el hígado, el bazo, el estómago, el colon, el yeyuno y el íleon, el apéndice, el epiplón y los órganos genitales internos femeninos.

El término parenteral hace referencia a la vía de administración de los fármacos. Esto es, atravesando una o más capas de la piel o de las membranas mucosas mediante una inyección.

## 5. INYECCIÓN INTRAPERITONEAL

La inyección intraperitoneal es utilizada para administrar cantidades grandes de sustancias, en especial, analgésicos. Se utiliza cuando se necesita que la sustancia sea absorbida rápidamente y cuando la vía intravenosa o la vía oral no son las apropiadas. Esta inyección no es recomendada

para los animales que se encuentren en tiempo de gestación, ya que la aguja puede penetrar el útero y hacer daño a la rata. Tampoco es recomendable para otro tipo de animales que no sean roedores.

5.1. Utilice los implementos de seguridad básicos que exige el laboratorio

5.2. Separe la rata que quiere inyectar de su caja hogar. Asegúrese que la nueva caja cuente con suficiente aserrín y sea una “caja transporte” (estas cajas son especiales para procedimientos específicos).

5.3. Una vez separada la rata, proceda a alistar la jeringa (de preferencia una jeringa para insulina, la aguja estándar es de 1/2 pulgada de largo, ya que es más pequeña que una jeringa común, entonces tiene un manejo más fácil y hace menos daño a la rata) con la droga que va a utilizar.

5.4. De acuerdo con el peso de la rata, se establece las medidas en ml (mililitros) de cada droga o fármaco.

5.5. Inmovilización de la rata: Tome la rata y sosténgala gentilmente por 2 minutos, para que se habitúe a su presencia y a su olor así será mucho más fácil inyectarla. Luego con la mano contraria a la que normalmente utiliza para inyectar, sostenga el animal para inmovilizarlo de tal forma que quede expuesto el abdomen.

5.6. Introduzca la aguja (de preferencia una para insulina, la aguja estándar es de 1/2 pulgada de largo, rápidamente con un ángulo de 45° ligeramente a la izquierda de la línea media

5.7. Hale el embolo 0.05 mm para asegurarse que no tiene comprometido ningún órgano interno de la rata (intestino, vejiga o musculo), si al aplicar presión negativa el embolo hala sustancias como sangre, deberá sacar la aguja y volver a inyectar hasta estar en la cavidad. Empuje la sustancia al interior del animal.

5.8. Retire la aguja despacio, deposite la rata en la caja transporte.

## 6. OTRO TIPO DE PROCEDIMIENTO PARA INYECCIÓN INTRAPERITONEAL

6.1. Cuando la rata esté muy exaltada y no se pueda inmovilizar de la manera explicada anteriormente, entonces se procede a inmovilizarla con un pedazo de tela dispuesta en la cabeza.

6.2. Levante la cola y ubique el punto dispuesto anteriormente (a la izquierda de la línea media a un ángulo de 45° entre los muslos de la rata) y siga con los procedimientos 3.8 y 3.9.

## 7. INYECCIÓN SUBCUTANEA

La inyección subcutánea se utiliza principalmente para la “administración parenteral” de fármacos u otras sustancias. Esta vía se caracteriza por ser de lenta absorción.

7.1. Utilice los implementos de seguridad básicos que exige el laboratorio

7.2. Separe la rata que quiere inyectar de su caja hogar. Asegúrese que la nueva caja cuente con suficiente viruta y sea una “caja transporte” (estas cajas son especiales para procedimientos específicos).

7.3. Una vez separada la rata, proceda a alistar la jeringa (de preferencia una jeringa para insulina, la aguja estándar es de 1/2 pulgada de largo).

7.4. De acuerdo con el peso de la rata, se establece las medidas en ml (mililitros) de cada fármaco.

7.5. Ponga la rata en una superficie que sea en malla metálica, la rata se mantendrá sujeta de está y la inmovilización será mucho más sencilla.

7.6. Inmovilización de la rata: Asegúrese de tomar la rata con la mano contraria a la que normalmente utiliza para inyectar. Con la misma mano con la que inmoviliza la rata, utilice el índice y el dedo pulgar, tome la piel del dorso de la rata y estírela. Vera que se forma un triángulo con la piel.

7.7. Inyecte en la mitad del triángulo que se forma; asegurándose que la jeringa esté totalmente perpendicular al dorso de la rata.

7.8. Empújelo a un ritmo constante. Retire despacio la aguja y haga un masaje a presión con el pulgar en el sitio inyectado. Para asegurarse si quedó bien inyectada, sentirá en el sitio inyectado una pequeña protuberancia dentro de la piel. Deposite la rata en la caja de transporte.

## REFERENCIAS

Laboratory Animals, Refinando los procesos para administración de sustancias.

Imágenes: Tomado el 16 de abril del 2012 en


<http://dc365.4shared.com/doc/02BOe7LV/preview.html>

Aguja de insulina

(<http://clinicians.org/images/upload/3%20Jeringas%20y%20Plumas%20LL.pdf>)

Definiciones (intraperitoneal y cavidad peritoneal)

<http://www.definicionesdemedicina.com/cavidad-peritoneal/>

Elaboró: Andrea Garcia	Fecha: 2012 enero	Reviso y Aprobó: Alejandro Munera	Fecha: 2017 junio
Modificado por Melissa Cardenas	2017 junio	 _____	



## **Anexo B - Cirugía estereotáxica para implantación de electrodos– Protocolo**

## INVASIVIDAD

De acuerdo con la USDA Pain and Distress Categories, este procedimiento se ubica en la categoría C, ya que es un procedimiento invasivo pero que causa malestar momentáneo, teniendo en cuenta que el animal solo va a sentir malestar cuando se le inyecta la sustancia para anestesiarlo y que es un procedimiento de punto final, sin recuperación del plano consciente.

## OBJETIVO

Instruir sobre la forma en que se debe realizar el proceso colocar electrodos en un área específica del cerebro de la rata Wistar en el Laboratorio de Neurofisiología de la Universidad Nacional de Colombia.

## ALCANCE

Proveer los conocimientos básicos y las mínimas instrucciones para llevar a cabo el procedimiento quirúrgico para colocar electrodos en una estructura cerebral en una rata Wistar. Este procedimiento puede ser ejecutado por el personal técnico e investigador entrenado del laboratorio.

## PROCEDIMIENTO

Previo a la realización de la cirugía, es importante tener presente algunas consideraciones:

La persona que realice el procedimiento y quien lo asista deben usar los implementos básicos de cirugía como guantes, bata, tapabocas, gorro para el cabello y gafas.

Las características propias del animal a operar como edad, peso, temperatura y estado general (antes, durante y después de la cirugía).

Tipo de fármacos a utilizar, dosis, vía de administración y duración del efecto de cada uno.

Para la realización del procedimiento se usarán los siguientes instrumentos

Aparato estereotáxico (ver figura 1)

Toallas de papel absorbente

Algodón

Instrumental quirúrgico (tijeras, bisturí, pinzas, etc.

Jeringas con fármacos y/o soluciones (solución salina, anestésicos, Xilocaína con epinefrina)

Recipiente de desechos

Electrodos

Mototool Dremel 300

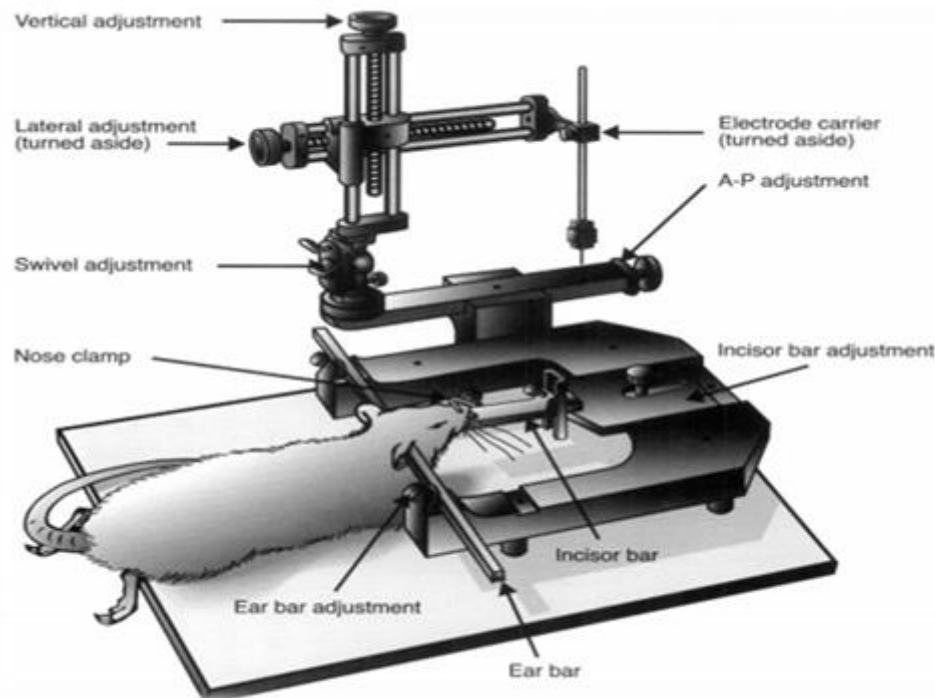
Pasos para la implantación de electrodos en el área del cerebro de la rata:

Luego de seleccionar el animal a operar (rata cepa Wistar), se inyecta vía intraperitoneal (ip) una dosis de mezcla de Uretano 25%-(1,5 g/Kg) (Albert Einstein college of Medicine) como anestésico, teniendo en cuenta el peso del animal y la concentración de cada fármaco (ver anexo A). Se espera un tiempo aproximado de 15 minutos para que la mezcla actúe en el organismo y se pueda verificar la eficiencia de la anestesia por medio de los reflejos de la rata.

Se depila el área a operar (parte superior de la cabeza de la rata) y se desinfecta con isodine.

Se coloca al animal en el aparato estereotáxico y se insertan gentilmente las barras estereotáxicas (ear bar) del aparato en los canales auditivos cuidando de no dañar el oído medio (ver figura 1).

Se debe inyectar en el área quirúrgica aproximadamente 0.30 ml de Xilocaína con epinefrina vía subcutánea en la zona a realizar la incisión, con el fin de controlar el sangrado luego de la incisión. El uso de este fármaco puede ser usado a discreción.



*Figura 1.* Forma de montar a una rata en un aparato estereotáxico (tomado de Krinke, 2000)

- Luego de inyectar subcutáneamente xilocaína con epinefrina en el área donde se realizará la incisión, se remueve la piel del área preparada, retirando a su vez el tejido que pueda estar adherido a la superficie del cráneo. Luego, limpiar constantemente con un algodón y agua oxigenada para esterilizar la herida y facilitar la visión de las suturas del cráneo, las cuales permitirán luego calcular las coordenadas para la apertura de el o los orificios por donde entrará el electrodo en cierta área del cerebro del animal.

Posteriormente, con ayuda del brazo del aparato estereotáxico y una vez puesta una guía en el porta-electrodo (electrode carrier fig 1), se calculan las coordenadas desde Bregma (punto de unión de las suturas sagital y coronal) o Lambda (unión entre los huesos parietales y el occipital), y se determina la ubicación de la estructura cerebral deseada utilizando el atlas estereotáxico de Paxinos y Watson (2005), teniendo en cuenta los 3 ejes o dimensiones del estereotáxico (X-Y-Z), pues estas generalmente están graduadas en milímetros. En el eje X se calculan las coordenadas de forma medial-lateral, el eje Y de manera dorsal-ventral y el eje Z de forma antero-posterior. Una vez determinados y marcados con marcador permanente de punta fina los puntos de perforación, se toma el Mototool Dremel 300 y se abren los orificios para cada estructura. Se ubica cada electrodo en la corteza y se hacen las mediciones respectivas para llegar al punto diana en el eje Z (dorso-ventralmente), para cada electrodo se usa un brazo estereotáxico diferente.


Posibles problemas

Todos están relacionados con la falta de pericia del investigador, por eso este siempre debe estar acompañado del asesor o alguien que sepa mejor la técnica a realizar

## REFERENCIAS

Albert Einstein College of Medicine Institute for Animal studies Van etten 460. Recommended Methods of Anesthesia, Analgesia, and Euthanasia for Laboratory Animal Species

Krinke, 2000. The Laboratory Rat. The handbook of experimental Animal

Elaboró: Melissa Cardenas Jevrahym Castellanos	Fecha: 2017 junio	Reviso y Aprobó: Alejando Múnera  _____	Fecha: 2017 junio
--	----------------------	--	----------------------

## **Anexo C – Emparejamiento de estímulos– Protocolo**

## INVASIVIDAD

De acuerdo con la USDA Pain and Distress Categories, este procedimiento se ubica en la categoría C, ya que es un procedimiento invasivo pero que causa malestar momentáneo.

## OBJETIVO

Establecer las instrucciones a seguir para la adecuada ejecución del protocolo de emparejamiento con estímulos de luz y choque en ratas en el laboratorio de Neurofisiología de la Universidad Nacional de Colombia

## ALCANCE

La finalidad de este instructivo es proveer instrucciones claras y precisas para la implementación del protocolo de emparejamiento con estímulos de luz y choque en ratas Wistar. El procedimiento puede ser realizado por el personal técnico y los investigadores del laboratorio de Neurofisiología de la Universidad Nacional de Colombia, que hayan tenido un entrenamiento previo en manipulación animal y conozcan las normas éticas que rigen el trabajo con animales.

## MATERIALES

Animales: Se usan ratas Wistar de 380 a 450 gramos, sin anomalías o hallazgos clínicos evidentes.

VARIABLES ambientales: Los animales deben tener un ciclo Luz-Oscuridad de 12h cada uno y estar a una temperatura de  $21 \pm 2$  °C. Tendrán acceso a comida y agua *ad-libitum*.

Aparatos: no aplica ya que el condicionamiento se realizará bajo anestesia Uretano (Ver Anexo A-protocolo de inoculación de sustancia).

Especificación de los estímulos:

Estimulación lumínica: Será realizada por medio de un circuito desarrollado específicamente para tal fin, de forma que se entregue un flash de luz blanca (LED) a una intensidad de 40 Lux, con una duración de 10 o 20ms. Se usará un LED de chorro para dirigir la luz de forma precisa al ojo del sujeto

Estimulación eléctrica. Será realizada por medio de la presentación de estímulos de intensidad de 2mA.

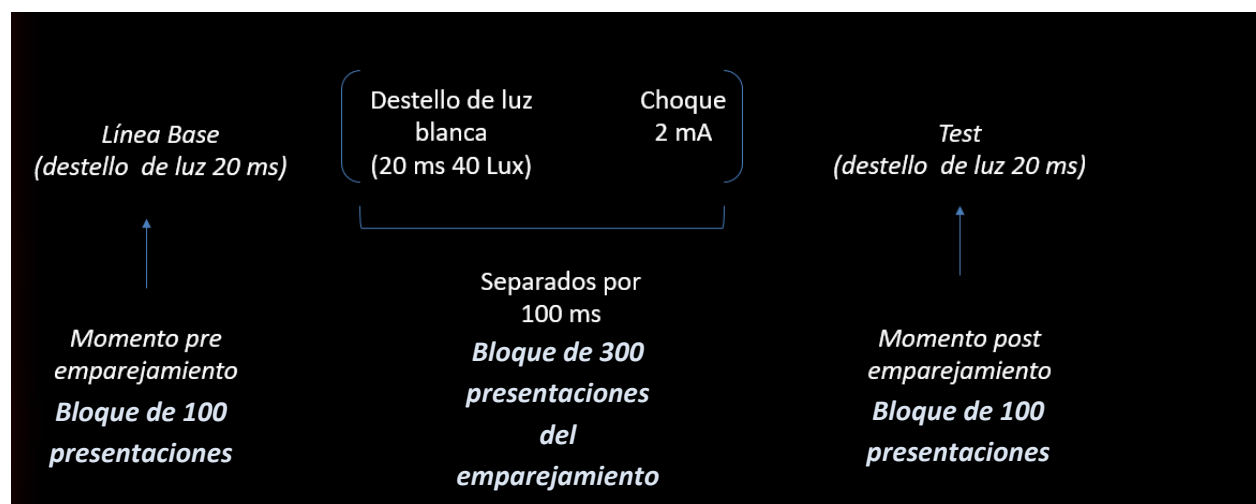
## PROCEDIMIENTO

### Emparejamiento:

El emparejamiento de estímulos se dará mediante la asociación de dos estímulos de diferentes modalidades sensoriales (por 300 veces), presentando el flash de luz (20ms) seguido por un choque (2mA) en el parche de vibrisas separados por 100ms (este rango temporal se determinó ya que el potencial evocado de las neuronas de las capas superficiales del colículo superior termina en ese rango de tiempo).

### Posibles problemas

Es posible que no se localicen adecuadamente las agujas para la estimulación del nervio en el parche de vibrisas, eso llevaría a una posible interrupción del aprendizaje. La solución es retirar las agujas y volverlas a colocar, revisando siempre si se localizaron adecuadamente.



### Esquema del emparejamiento de estímulos


### REFERENCIAS

Domjan M. (2010). Principios de aprendizaje y conducta. Madrid thomson

LeDoux JE, Cicchetti P, Xagoraris A, Romanski LM (1990a) The lateral amygdaloid nucleus: sensory interface of the amygdala in fear conditioning. J Neurosci 10:1062-1069.

Funk, D. (1999) Conditioned Fear Attenuates Light-Induced Suppression of Melatonin Release in Rats. *Psychology and Behavior*, Vol. 67, 623-626.



Elaboró: Melissa Cárdenas	Fecha: 2017 junio	Reviso y Aprobó: Alejandro Munera  _____	Fecha: 2017 junio
------------------------------	----------------------	---	----------------------

## **Anexo D - Eutanasia por inyección de KCL – Protocolo**

## 1. INVASIVIDAD

De acuerdo con la USDA Pain and Distress Categories, este procedimiento se ubica en la categoría B ya que pese ser un procedimiento invasivo el animal debe estar bajo anestesia en el momento del procedimiento.

## 2. OBJETO

Establecer las instrucciones a seguir para eutanasia por inyección de KCL para eutanasia en Wistar del Laboratorio de Neurofisiología de la Universidad Nacional de Colombia.

## 3. ALCANCE

La finalidad de este instructivo es proveer los conocimientos básicos y las mínimas instrucciones para realizar eutanasia por inyección de KCL en ratas Wistar. Este procedimiento puede ser ejecutado por el personal técnico e investigativo del Laboratorio de Neurofisiología de la Universidad Nacional de Colombia. Se necesita como mínimo un manejo de las ratas Wistar.

## 4. DEFINICIÓN

La inyección intracardiaca de KCL (sobresaturado), genera inmediatamente un paro cardiaco por el cambio iónico en el tejido cardiaco llevando a que haya una desregulación en la actividad de las células y subsecuentemente mal funcionamiento de la actividad cardiaca.

## 5. PROCEDIMIENTO


- 5.1. Deje el animal sobre una superficie en decúbito supino
- 5.2. Localice la tercera costilla de abajo hacia arriba del lado izquierdo del animal
- 5.3. Coloque la jeringa de 10mls con una solución sobresaturada de KCL(34g/100ml) en posición vertical en el punto seleccionado anteriormente para empezar la punción cardiaca
- 5.4. Ingrese con la aguja (18G) al interior de la cavidad cardiaca buscando el corazón mientras se genera presión negativa.
- 5.5. Observe en la jeringa la presencia de sangre, cuando sea abundante inyecte la solución por completo.
- 5.6. Revise el ritmo cardiaco

Posibles problemas

El investigador puede no encontrar el corazón al momento de la punción. Se debe retirar la aguja y volver a intentarlo.

REFERENCIAS

College of Veterinary Medicine, Iowa State University. Intravenous Injection of KCL.  
Recuperado en <https://vetmed.iastate.edu/vdpam/about/production-animal-medicine/dairy/dairy-extension/humane-euthanasia/humane-euthanasia/exsanguination-pithing-intravenous-injection-kci>

Elaboró : Melissa Cardenas	Fecha: 2017 junio	Reviso y Aprobó: Alejandro Múnera 	Fecha: 2017 junio
-------------------------------	----------------------	---	----------------------

## **Anexo E - Carta AVAL comité de Bioética**

Bogotá D.C., 12 de septiembre de 2017

[CB-FMVZ-UN-051-17]

Doctor  
**FRANCISCO ALEJANDRO MÚNERA**  
Investigador principal - Tutor  
Facultad de Medicina  
Universidad Nacional de Colombia

Apreciado Doctor Múnera.

Amablemente le comunico que el Comité de Bioética en sesión del 05 de septiembre de 2017, Acta 08, luego de la revisión de la documentación y aclaraciones presentadas, acordó emitir el respectivo concepto sobre el siguiente proyecto, así:

Proyecto	"CARACTERIZACIÓN ELECTROENCEFALOGRÁFICA DE LA RUTA SUBCORTICAL COLICULO SUPERIOR - AMÍGDALA VÍA TALAMO DURANTE LA ASOCIACIÓN DE ESTÍMULOS CONDICIONADO E INCONDICIONADO".
Responsables del proyecto	<b>Investigador principal:</b> Dr. Francisco Alejandro Múnera. Profesor Fac. de Medicina, UN, Bogotá <b>Estudiante:</b> Melissa Andrea Cárdenas Molano. Maestría en Neurociencias. Fac. de Medicina, UN, Bogotá.
Concepto	<b>AVALADO</b>

Es importante tener en cuenta que **este concepto sólo aplica para los procedimientos en las condiciones y con las características indicadas en el formato final y documentos presentados**. El investigador deberá informar sobre cualquier cambio que se proponga incluir y que esté relacionado con la ubicación, el cuidado y bienestar de los animales, estas modificaciones no podrán ejecutarse sin el aval previo del Comité; así mismo, se debe dar aviso sobre cualquier situación imprevista que se considere implique algún riesgo para los animales o la comunidad o el medio en el cual se lleva a cabo el estudio.

Cordialmente,



**LUCÍA BOTERO ESPINOSA**  
Coordinadora Comité de Bioética  
Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia



## **Anexo F – Tablas de resultados estadísticos**



## Selección del estímulo óptimo para suscitar una respuesta evocada en el colículo superior y en la amígdala

*Estimulación lumínica 10 ms vs 20 ms*

COLICULO SUPERIOR (CS)		
	10 ms vs 20 ms	
Componente	T <sub>[6]</sub>	p
PN1	-3,17	0,019*
PN2	-2,556	0,043*
PN3	0,776	0,467

**Tabla 1.** comparaciones de la amplitud pico a pico de los diferentes componentes del potencial evocado por dos estímulos lumínicos en colículo superior

AMIGDALA (AM)		
	10 ms vs 20 ms	
Componente	T <sub>[6]</sub>	p
P1Na	-2,11	0,079
NaNb	-1,501	0,184
NbP2	-2,11	0,079

**Tabla 2.** comparaciones de la amplitud pico a pico de los diferentes componentes del potencial evocado por dos estímulos lumínicos en amígdala

*Estimulación eléctrica en parche de vibrisas 0,5 mA vs 2 mA*

	COLICULO SUPERIOR (CS)		AMIGDALA (AM)	
	0,5 mA vs 2 mA		PS - 0,5 mA vs 2 mA	
Componente	T <sub>[3]</sub>	p	T <sub>[3]</sub>	p
PN1	-1,463	0,24	-6,338	0,008*

**Tabla 3.** comparaciones de la amplitud pico a pico del componente NP1 del potencial evocado por dos estímulos lumínicos en colículo superior y en amígdala

	COLICULO SUPERIOR (CS)	AMIGDALA (AM)
	PS - 0,5 mA vs 2 mA	PS - 0,5 mA vs 2 mA

Componente	T <sub>[3]</sub>	p	T <sub>[3]</sub>	p
Pico a pico	-3,54	0,038*	-4,786	0,017*

**Tabla 4.** Comparaciones de la amplitud pico a pico de los potenciales de acción poblacionales suscitados por dos estímulos eléctricos en cóliculo superior y en amígdala

*Comparaciones de los componentes de los potenciales evocados suscitados por un estímulo lumínico de 20 ms no emparejado 1, emparejado y no emparejad 2*

COLICULO SUPERIOR (CS)		
no empa 1 vs empa vs no empa 2		
componentes	F <sub>[2,8]</sub>	p
PN1	1,866	0,216
PN2	2,181	0,175
PN3	0,597	0,573

**Tabla 5.** Comparaciones de los componentes de los potenciales evocados suscitados por un estímulo lumínico de 20 ms no emparejado 1, emparejado y no emparejad 2 para cóliculo superior

AMIGDALA (AM)		
no empa 1 vs empa vs no empa 2		
componentes	F <sub>[2,8]</sub>	p
P1Na	Chi-sq.= 2,800	0,247
NaNb	Chi-sq.= 3,600	0,165
NbP2	0,519	0,608

**Tabla 6.** Comparaciones de los componentes de los potenciales evocados suscitados por un estímulo lumínico de 20 ms no emparejado 1, emparejado y no emparejad 2 para cóliculo superior

*Comparación de los poderes espectrales*

*Potencias relativas*

COLICULO SUPERIOR (CS)				
banda de frecuencia	Estímulo lumínico		no empa 1, empa, no empa2	
	T <sub>[14]</sub>	p	F <sub>[2,21]</sub>	p
<b>Delta</b>	1,337	0,202	0,0705	0,932
<b>Theta</b>	0,366	0,720	0,143	0,868
<b>Alpha</b>	0,0200	0,984	3,34	0,055
<b>Beta</b>	0,549	0,592	0,234	0,793
<b>Gamma</b>	0,967	0,350	0,0835	0,92
<b>HFO1</b>	1,319	0,208	0,199	0,821
<b>HFO2</b>	1,171	0,261	0,72	0,498

**Tabla 7.** Comparaciones de las bandas de frecuencia relativas entre un estímulos lumínicos (10 ms vs 20 ms) y luz de duración 20 ms en las fases de no emparejado 1, emparejado y no emparejado 2 para colículo superior

AMIGDALA (AM)				
banda de frecuencia	Estímulo lumínico		no empa 1, empa, no empa2	
	T <sub>[14]</sub>	p	F <sub>[2,21]</sub>	p
<b>Delta</b>	0,378	0,711	0,65	0,532
<b>Theta</b>	0,0249	0,981	0,293	0,749
<b>Alpha</b>	0,886	0,391	0,357	0,704
<b>Beta</b>	0,579	0,572	0,413	0,667
<b>Gamma</b>	0,404	0,692	0,178	0,838
<b>HFO1</b>	1,273	0,224	16,383	<0,001*
<b>HFO2</b>	1,046	0,313	25,759	<0,001*

**Tabla 8.** Comparaciones de las bandas de frecuencia relativas entre un estímulos lumínicos (10 ms vs 20 ms) y luz de duración 20 ms en las fases de no emparejado 1, emparejado y no emparejado 2 para amígdala

banda de frecuencia	CS vs ABL	
	T <sub>[14]</sub>	p
<b>Delta</b>	3,579	0,003*
<b>Theta</b>	0,375	0,713
<b>Alpha</b>	4,727	<0,001*
<b>Beta</b>	-2,144	0,050*
<b>Gamma</b>	-1,401	0,183
<b>HFO1</b>	1,579	0,137
<b>HFO2</b>	1,742	0,103

**Tabla 9.** Comparaciones de las bandas de frecuencia relativas durante un estímulo lumínico de 20 ms de duración para colículo superior vs amígdala

*Potencias absolutas*

COLICULO SUPERIOR (CS)				
banda de frecuencia	Estímulo lumínico		Fase	
	T <sub>[14]</sub>	p	F <sub>[2,21]</sub>	p
<b>Delta</b>	1,750	0,102	0,0312	0,969
<b>Theta</b>	0,407	0,690	0,267	0,769
<b>Alpha</b>	0,516	0,614	2,179	0,138
<b>Beta</b>	0,138	0,892	0,466	0,634
<b>Gamma</b>	0,408	0,689	0,0343	0,966
<b>HFO1</b>	1,529	0,148	0,163	0,851
<b>HFO2</b>	1,234	0,238	0,54	0,591

**Tabla 10.** Comparaciones de las bandas de frecuencia absolutas entre un estímulos lumínicos (10 ms vs 20 ms) y luz de duración 20 ms en las fases de no emparejado 1, emparejado y no emparejado 2 para colículo superior

AMIGDALA (AM)				
banda de frecuencia	Estímulo lumínico		Fase	
	T <sub>[14]</sub>	p	F <sub>[2,21]</sub>	p
<b>Delta</b>	2,929	0,011*	10,112	<0,001*
<b>Theta</b>	1,407	0,181	2,021	0,158
<b>Alpha</b>	2,153	0,049*	3,908	0,036*
<b>Beta</b>	1,125	0,280	3,685	0,042*
<b>Gamma</b>	1,416	0,179	5,65	0,011*
<b>HFO1</b>	-0,847	0,411	68,897	<0,001*
<b>HFO2</b>	-0,446	0,662	47,326	<0,001*

**Tabla 11.** Comparaciones de las bandas de frecuencia absolutas entre un estímulos lumínicos (10 ms vs 20 ms) y luz de duración 20 ms en las fases de no emparejado 1, emparejado y no emparejado 2 para amígdala

banda de frecuencia	CS vs AM	
	T <sub>[14]</sub>	p
<b>Delta</b>	5,855	<0,001*
<b>Theta</b>	4,168	<0,001*

<b>Alpha</b>	3,494	0,004*
<b>Beta</b>	2,648	0,019*
<b>Gamma</b>	3,792	0,002*
<b>HFO1</b>	1,882	0,081
<b>HFO2</b>	2,173	0,047*

**Tabla 12.** Comparaciones de las bandas de frecuencia absolutas durante un estímulo lumínico de 20 ms de duración para colículo superior y amígdala

*Evolución de la transformada Z de la señal en la amígdala y el colículo superior como función de la presentación no-emparejada de un estímulo visual que previamente había sido emparejado*

<b>COLICULO SUPERIOR (CS)</b>		
no empa 1 vs empa vs no empa 2		
<b>componentes</b>	<b>F[2,18]</b>	<b>p</b>
<b>40 70</b>	0.0422	0.959
<b>70 150</b>	0.668	0.525
<b>150 300</b>	7.365	0.005*

**Tabla 13.** Comparaciones de amplitud pico a pico de tres diferentes rango de la señal registrada en colículo superior (40 -70 ms, 70 150 ms y 150 300 ms) durante la presentación de un estímulo luminoso de 20 ms no emparejado 1, emparejado y no emparejado 2

<b>AMIGDALA (AM)</b>		
no empa 1 vs empa vs no empa 2		
<b>componentes</b>	<b>F[2,18]</b>	<b>p</b>
<b>30 60</b>	7.217	0.005
<b>60 100</b>	2.19	0.141
<b>100 200</b>	4.379	0.028*

**Tabla 14.** Comparaciones de amplitud pico a pico de tres diferentes rango de la señal registrada en amígdala (30 - 60 ms, 60- 100 ms y 100 - 200ms) durante la presentación de un estímulo luminoso de 20 ms no emparejado 1, emparejado y no emparejado 2

<b>COLICULO SUPERIOR (CS)</b>		
no empa 1 vs empa vs no empa 2		

componentes	F[2,18]	p
<b>40 70</b>	0.0121	0.988
<b>70 150</b>	1.152	0.338
<b>150 300</b>	5.051	0.018*

**Tabla 15.** Comparaciones de amplitud pico a pico de tres diferentes rango de la señal positiva registrada en colículo superior (40 -70 ms, 70 150 ms y 150 300 ms) durante la presentación de un estímulo luminoso de 20 ms no emparejado 1, emparejado y no emparejado 2

<b>AMIGDALA (AM)</b>		
no empa 1 vs empa vs no empa 2		
componentes	F[2,18]	p
<b>30 60</b>	2.507	0.110
<b>60 100</b>	1.727	0.206
<b>100 200</b>	2.267	0.132

**Tabla 16.** Comparaciones de amplitud pico a pico de tres diferentes rango de la señal positiva registrada en amígdala (30 - 60 ms, 60- 100 ms y 100 - 200ms) durante la presentación de un estímulo luminoso de 20 ms no emparejado 1, emparejado y no emparejado 2

<b>COLICULO SUPERIOR (CS)</b>		
no empa 1 vs empa vs no empa 2		
componentes	F[2,18]	p
<b>40 70</b>	0.145	0.866
<b>70 150</b>	2.519	0.109
<b>150 300</b>	5.681	0.012*

**Tabla 17.** Comparaciones del area bajo la curva del pico a pico de tres diferentes rango de la señal positiva registrada en colículo superior (40 -70 ms, 70 150 ms y 150 300 ms) durante la presentación de un estímulo luminoso de 20 ms no emparejado 1, emparejado y no emparejado 2

<b>AMIGDALA (AM)</b>		
no empa 1 vs empa vs no empa 2		
componentes	F[2,18]	p
<b>30 60</b>	2.345	0.124
<b>60 100</b>	1.377	0.278
<b>100 200</b>	2.518	0.109
<b>200 300</b>	3.648	0.047*

**Tabla 18.** Comparaciones del area bajo la curva del pico a pico de tres diferentes rango de la señal positiva registrada en amígdala (30 - 60 ms, 60- 100 ms, 100 - 200ms y 200 a 300ms) durante la presentación de un estímulo luminoso de 20 ms no emparejado 1, emparejado y no emparejado 2.