



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Licenciatura en Ciencias Biológicas

**Caracterización de las diferencias de impulsividad entre ratas adolescentes y adultas
en una tarea recompensada auto-iniciada.**

Tesis de Licenciatura
Micaela Betsabe Marini

Directora de Tesis: María Cecilia Martínez

Lugar de trabajo: Laboratorio de Fisiología de Circuitos Neuronales, Grupo de Neurociencias
de Sistemas, IFIBIO-Houssay, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina,
Universidad de Buenos Aires

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Julio 2023.

Micaela Betsabe Marini

Tesista

María Cecilia Martínez

Directora

Characterization of impulsivity differences between adolescent and adult rats in a self-initiated rewarded task.

Abstract:

Mammals undergo multiple physiological and behavioral changes associated with the transition between youth and adulthood which help them acquire the skills necessary for their independence. In general, adolescents exhibit characteristic behaviors, such as increases in social interactions, a preference for novelty, and risk-taking activities.

In previous work from our lab, we found age-related differences in the performance of male Long Evans rats in a self-paced rewarded task. Since developmental divergences between sexes might affect learning, here we studied the performance of both male and female adolescents and adults. In this task, after a minimum waiting interval of 2.5 s, the animals must enter a nose poke and emit an eight-lick sequence onto a sipper tube to obtain a reward.

Consistently with our former electrophysiology results, we found a higher prevalence of impulsive trial-starting in adolescents. We also analyzed other behavioral markers that could account for the premature response in adolescents such as locomotor activity, memory formation, and decision-making in the spontaneous exploration of a multiple-regions arena.

Our results show that adolescent rats display more premature responses in the rewarded task. Still, this impulsivity is not related to increases in their locomotor activity, deficits in memory formation, or risk-taking behaviors, suggesting impulsivity of action could be an individual trait. Further studies are required to elucidate which brain structures, alongside the striatum, participate in the accurate emission of action sequences.

Caracterización de las diferencias de impulsividad entre ratas adolescentes y adultas en una tarea recompensada auto-iniciada.

Resumen:

Los mamíferos experimentan múltiples cambios fisiológicos y de comportamiento asociados a la transición entre la juventud y la edad adulta que les ayudan a adquirir las habilidades necesarias para su autonomía en la adultez. En general, los adolescentes exhiben comportamientos característicos, como un aumento en las interacciones sociales, una atracción por la novedad y un incremento en la toma de riesgos.

En trabajos previos de nuestro laboratorio, encontramos diferencias en una tarea recompensada auto-iniciada entre ratas Long Evans adolescentes y adultas. Dado que las divergencias de desarrollo entre los sexos pueden afectar el aprendizaje, aquí evaluamos el desempeño de adolescentes y adultos de ambos sexos. En esta tarea, luego de un intervalo de espera mínimo de 2,5 s, los animales deben introducir su cabeza en un *nosepoke* y emitir una secuencia de ocho lengüetazos para obtener una recompensa.

En concordancia con nuestros resultados de los experimentos de electrofisiología anteriores, encontramos una mayor prevalencia de ensayos prematuros en adolescentes. También analizamos otros marcadores comportamentales que pudieran estar asociados con la respuesta impulsiva de los adolescentes, como la actividad locomotora, la formación de la memoria y la toma de decisiones en la exploración espontánea de una arena de múltiples regiones.

Nuestros resultados muestran que las ratas adolescentes de ambos sexos muestran respuestas prematuras en la tarea recompensada. Aun así, esta impulsividad no está relacionada con aumentos en su actividad locomotora, déficits en la formación de la memoria o con la preferencia por las actividades de riesgo, lo que sugiere que la impulsividad de acción podría ser un rasgo individual. Próximamente realizaremos más estudios para dilucidar qué estructuras cerebrales, además del estriado dorsal, participan en la emisión oportuna de secuencias de acción.

ÍNDICE:

Introducción	4
1. Adolescencia.....	5
2. Comportamiento impulsivo y recompensas.....	7
3. Tipos de aprendizaje.....	9
3.1 Aprendizaje Recompensado.....	10
3.2 Aprendizaje Espacial.....	11
3.3 Reconocimiento de Objetos.....	12
3.4 Comportamiento espontáneo en el Laberinto Concéntrico Multivariado....	12
4. Estructuras involucradas en los diferentes tipos de aprendizaje.....	13
5. Antecedentes.....	14
Objetivos e hipótesis	16
Materiales y Métodos	17
I. Animales.....	17
II. Ensayos conductuales.....	17
A) Tarea Recompensada.....	17
B) Campo Abierto.....	20
C) Laberinto en Y.....	21
D) Laberinto Concéntrico Multivariado.....	22
III. Análisis de los datos.....	23
Resultados	24
Discusión	43
Agradecimientos	52
Referencias bibliográficas	53

Introducción:

En nuestra vida diaria, nos regimos por un equilibrio entre el esfuerzo y la recompensa de nuestras acciones lo que nos motiva en nuestras tareas cotidianas. Cuanto más valiosa es la recompensa, mayor será nuestra motivación para realizar una determinada tarea. Un ejemplo ilustrativo es levantarse temprano: no es lo mismo levantarse a las 6 de la mañana para ir a hacerse análisis médicos que levantarse temprano para tomar un avión hacia un destino paradisíaco. Aunque la acción en sí es la misma, la motivación para realizar ese esfuerzo es fundamental para llevar a cabo la tarea.

Por lo tanto, el nivel de esfuerzo que estamos dispuestos a invertir para obtener una recompensa (o evitar un castigo) dependerá del valor que esa recompensa tenga para nosotros. Obtener una recompensa implica invertir tiempo y energía, por lo que debe proporcionar una ventaja adaptativa al individuo o generar un cierto nivel de placer. Ahora bien, ¿se conservan las herramientas empleadas para la obtención de una recompensa vital (como lo es el agua) a lo largo de la vida de un individuo? ¿La valoración de la recompensa se modifica de acuerdo a los aprendizajes? ¿Qué nivel de influencia tiene la edad del individuo con la valoración de la recompensa y su percepción del esfuerzo para acceder a ella?

Durante el crecimiento, se producen cambios anatómicos y físicos que vienen acompañados de cambios comportamentales, producto del aprendizaje y las experiencias ambientales y sociales. Tanto en humanos, como en ratas, el aprendizaje se produce de una manera diferencial de acuerdo al momento del desarrollo en el que se encuentre el individuo. Existe una ventana crítica en la cual se producen cambios neuronales relacionados con cómo los individuos se desenvuelven para conseguir los diferentes objetivos, como así también para relacionarse con sus pares (Spear 2000).

En una variedad de especies de mamíferos, se ha observado cómo en las diferentes adolescencias se comparten las respuestas impulsivas, la toma de riesgos y el interés por la novedad. Además, aumenta el apetito por la búsqueda de sensaciones novedosas, aventuras y emociones fuertes (Dahl 2004). Estas conductas en conjunto promueven la obtención de las herramientas necesarias para su autonomía en la adultez. Los cambios no son únicamente comportamentales, sino que además existe un correlato anatómico y fisiológico. Hay modificaciones en la corteza prefrontal, el sistema límbico y en los circuitos dopaminérgicos mesocorticales y mesolímbicos, que están asociados a la obtención de recompensas (Spear 2000). Las interacciones únicas entre los sistemas mencionados y los sistemas de procesamiento de la relevancia durante la adolescencia limitan y amplifican varios

componentes de los procesos de toma de decisiones maduras (Hartley y Somerville 2015). Las sinapsis cerebrales, la mielinización y los circuitos neuronales maduran en la adolescencia hasta alcanzar los niveles adultos, acompañados con un mayor análisis de las consecuencias de las acciones, una reducción de la impulsividad y de la búsqueda de emociones fuertes (Crews et al. 2016).

Los comportamientos relacionados con la recompensa guían a los organismos hacia estímulos ambientales que son necesarios para su propia supervivencia y la de su especie (Doremus-Fitzwater y Spear 2016). Como los individuos necesitan buscar comida y agua, participar en interacciones sociales con sus congéneres, localizar hábitats seguros y encontrar pareja para la reproducción sexual, las recompensas naturales proporcionadas por la obtención de estos objetivos dirigen la atención hacia los estímulos apropiados y se refuerzan los comportamientos que conducen a ellos. Algunas de las metas surgen a temprana edad (incluso, a minutos del nacimiento), otras adquieren importancia a lo largo del desarrollo, más precisamente en la adolescencia (Doremus-Fitzwater y Spear 2016).

1. Adolescencia:

La adolescencia es una fase crucial del desarrollo que está muy conservada entre las diferentes especies. Parte de la vulnerabilidad observada en este período puede estar vinculada a un conjunto de cambios biológicos en los sistemas neurales de emoción y motivación, que contribuyen a lo que parece ser un aumento natural en las tendencias hacia la toma de riesgos, la búsqueda de sensaciones y algunos cambios emocionales/motivacionales durante la madurez puberal (Dahl 2004). Ocurren grandes cambios en el comportamiento, la cognición y a nivel emocional, que están asociados a las modificaciones en las redes neuronales y sus conexiones. Todo esto contribuye a la detección, obtención y recepción de las recompensas. Según las autoras Doremus-Fitzwater y Spear, en la adolescencia se tipifica un fenotipo “centrado en la recompensa”: los individuos tienen una mayor sensibilidad a las recompensas en comparación con los adultos. Sin embargo, centrarse en la recompensa puede tener consecuencias negativas, al promover comportamientos de búsqueda de sensaciones y toma de riesgos dirigidos hacia el logro de otras recompensas potencialmente perjudiciales (Doremus-Fitzwater y Spear 2016).

Además de que existe un cambio de los sistemas hormonales, que es ampliamente estudiado y conocido, ocurren cambios madurativos en el cerebro a diferentes velocidades si se tiene en cuenta los efectos cognitivos y conductuales consistentes en este periodo (Dahl

2004; Lundberg, Högman, y Roman 2019). Es el momento en el cual ocurren transformaciones dramáticas en el cerebro que están asociadas a un aumento en la vulnerabilidad, siendo el principal propósito obtener la independencia y aprender las habilidades necesarias para la supervivencia en la adultez (Spear 2000; Dahl 2004). Durante la adolescencia, muchas metas y comportamientos adquieren un nuevo significado, en una transición paulatina que va desde la dependencia de los adultos a la independencia y autonomía (Doremus-Fitzwater y Spear 2016). También es un momento de la vida en el que muchos trastornos psiquiátricos, incluidos trastornos del estado de ánimo y de la alimentación, adicciones y esquizofrenia se ponen de manifiesto (Sturman y Moghaddam 2011; Crews et al. 2016).

El periodo en el cual se considera que un individuo es adolescente dependerá de la especie en estudio y se tiene en cuenta la acumulación de cambios graduales y sucesivos que suceden en un cierto momento del desarrollo del animal. El comienzo exacto y final de la adolescencia son eventos igualmente imprecisos tanto en humanos como en roedores y derivan de una combinación de factores neuronales, biológicos, conductuales y sociales. En el caso de las ratas, se considera que el periodo de adolescencia amplia comienza en P30 y se extiende hasta el inicio de la adultez en P60 (Spear 2000).

Dado que los adolescentes son más activos, curiosos y exploradores, sumado a que en ese momento surgen diversos trastornos psiquiátricos, se los considera un grupo de riesgo. Sin embargo, estas características y preferencia por la novedad también les permiten conocer el mundo e ir modelando conductas gracias a sus errores. Por otra parte, se adaptan más fácilmente a nuevos entornos. El comportamiento arriesgado en ratas adolescentes puede ser, por ejemplo, explorar un contexto novedoso y exponerse a un cierto riesgo o peligro para establecer nuevas relaciones sociales, nuevos territorios y ganar independencia (Spear 2000; Steinberg 2008; Horvath y Zuckerman 1993). En la adultez de las ratas, también son muy curiosas y exploradoras, pero tienden a evaluar mejor los riesgos de sus acciones. Asimismo, se ha planteado la hipótesis de que los adolescentes exhiben una anhedonia parcial asociada a la edad que puede conducir a que busquen recompensas naturales para compensar esta sensibilidad hedónica atenuada (Wilmouth y Spear 2009). También se incrementa el uso de reforzadores como drogas, que al compartir la vía de señalización de la recompensa, aumentan el valor hedónico per se, generando adicciones que se manifiestan en mayor proporción en esta etapa de la vida del individuo (Di Chiara 1999; Wise 1989).

2. Comportamiento impulsivo y recompensas:

Las recompensas desempeñan un papel fundamental en nuestra motivación diaria, ya que nos impulsan a llevar a cabo acciones que requieren un esfuerzo, tanto físico como mental. Estas acciones, a su vez, tienen un valor adaptativo, porque son beneficiosas para nuestra supervivencia y bienestar. Las recompensas pueden tomar diversas formas, como la satisfacción de una necesidad básica, la obtención de reconocimiento, la consecución de metas personales o profesionales, entre otras. Cada vez que obtenemos una recompensa, experimentamos una sensación de satisfacción y placer, lo que refuerza la probabilidad de que repitamos la acción que nos condujo a ella (Schultz 2000).

La valoración de una recompensa depende de las condiciones del entorno, ya que se asocia la recompensa con el mismo (Panoz-Brown et al. 2016) y además, su valoración es subjetiva de acuerdo al individuo. Así, una misma recompensa puede tener un valor diferente entre dos sujetos. Sin embargo, cuando una recompensa es un reforzador natural, como por ejemplo el agua o la comida, más allá de las valoraciones individuales, los individuos estarán igualmente motivados. Esto se debe a que los reforzadores “vitales” se codifican y procesan por una vía particular del núcleo accumbens (Carelli, Ijames, y Crumling 2000). En la adolescencia en particular, ocurre un desequilibrio entre la valoración de las recompensas y la evaluación de riesgos, haciendo que los individuos sean más imprudentes en su búsqueda por satisfacer su necesidad de estímulos novedosos y vitales. Además existe una dificultad en la integración de la información emocional que conlleva a una mala toma de decisiones, sumados a un estado emocional elevado (Sturman y Moghaddam 2011).

Esta última idea nos lleva a pensar que, aunque la motivación entre individuos sea la misma, no es sinónimo de que el esfuerzo que realicen sea igual, ya que dependerá de las características intrínsecas y de su personalidad, como así también sus emociones: la paciencia, la impulsividad y la irritación. Por otra parte, también las emociones y su percepción están relacionadas con la edad que tenga el individuo. En los adolescentes, la regulación emocional está ligada a cambios internos (hormonales y/o a las modificaciones de los circuitos involucrados en su modulación) y externos (estructuras sociales y en las experiencias novedosas al explorar el mundo). El conjunto de todos estos factores le confieren ciertas emociones al adolescente que hará que su comportamiento no sea el mismo que un adulto (Guyer, Silk, y Nelson 2016).

Es importante destacar que la valencia y la novedad de ciertos contextos y los efectos de las experiencias pasadas afectan a las bases neuronales de la cognición y la emoción, modificando la percepción de las experiencias futuras (Guyer, Silk, y Nelson 2016). Por una suma de factores, la adolescencia es una ventana de vulnerabilidad en el desarrollo. Muchos estudios han concluido que es un periodo de atenuación del miedo. En consecuencia, no sólo son capaces de realizar un mayor esfuerzo para conseguir un objetivo, sino que además los animales pueden realizar comportamientos diferenciales que pongan en juego su integridad física (K. D. Baker, Bisby, y Richardson 2016).

Además de la valencia y la novedad, la percepción del tiempo juega un papel crucial en la toma de decisiones y la consideración de los resultados asociados con esas elecciones. El tiempo necesario para recibir un resultado beneficioso se percibe como un costo y se compara con los beneficios esperados. Los individuos impulsivos tienden a sobreestimar la duración de los intervalos de tiempo y, como resultado, descuentan en gran medida el valor de las recompensas que se retrasan, en comparación con aquellos que tienen mayor autocontrol (Wittmann y Paulus 2008).

Es importante destacar que la impulsividad se define como la incapacidad de retener o detener una respuesta y se manifiesta en acciones como actuar de forma precipitada, buscar novedades y sensaciones, y participar en conductas de alto riesgo (Bari y Robbins 2013). En términos operativos, se identifican dos tipos de impulsividad. Por un lado, está la inhibición de respuestas motoras en curso, como es detener una respuesta motriz. Por otro lado, está la impulsividad relacionada con procesos motivacionales y afectivos, como lo es posponer una recompensa. Se pueden describir dos tipos amplios de conducta impulsiva: uno más lento, que implica deliberación y cumplimiento de deseos a pesar de las consecuencias negativas; y otro más rápido, que carece de suficiente previsión sobre posibles resultados negativos (Bari y Robbins 2013).

Se considera que la impulsividad es una consecuencia del deterioro del funcionamiento ejecutivo, debido a la presencia simultánea de procesos inhibitorios que generan como resultado alteraciones en la percepción del tiempo o una baja precisión temporal (Panfil et al. 2020). Cuando se espera un tiempo más prolongado para obtener una recompensa existe una menor coincidencia temporal entre la acción y su consecuencia, lo que puede dificultar el procesamiento y la capacidad de aprendizaje en una tarea. Un retraso casi inmediato implicaría una sincronización a nivel del cerebelo, mientras que un retraso de

varios segundos involucraría un procesamiento más complejo, mediante un sistema de sincronización de intervalos que involucra regiones frontales y estriatales (Panfil et al. 2020). Existe evidencia de que las ratas, dentro de las tareas de elección, son capaces de cronometrar los retrasos de diferentes duraciones con un alto grado de exactitud y precisión (Smith, Marshall, y Kirkpatrick 2015).

3. Tipos de aprendizaje:

El aprendizaje es un proceso mediante el cual el comportamiento se modifica como resultado de la experiencia con estímulos específicos (De Houwer, Barnes-Holmes, y Moors 2013). Es una función cerebral vital que permite a los organismos adaptarse a circunstancias cambiantes basadas en experiencias previas, siendo fundamental para la supervivencia (Zhang et al. 2023). En el ámbito de la investigación, se emplean diversas pruebas para evaluar comportamientos que reflejan diferentes aspectos del aprendizaje y que involucran distintas estructuras cerebrales. Por ejemplo, la prueba del Campo Abierto (CA, en inglés *Open Field*), es utilizada para estudiar el aprendizaje espacial y, por ende, una memoria de habituación espacial. En esta prueba, las ratas aprenden a reconocer y familiarizarse con el entorno que las rodea, lo cual provoca cambios en su comportamiento motor. Este y otros tipos de memorias espaciales son procesadas en el hipocampo (Moncada y Viola 2006).

Entonces, la memoria es la capacidad de recordar de forma consciente de los hechos y eventos. Las memorias son procesadas, alojadas y recuperadas por la acción de diferentes estructuras como lo son el hipocampo, la amígdala, el estriado y el cerebelo (Squire 2004) y que pueden ser clasificadas a nivel operativo o en función de su duración (Reber 2013). Se pueden mencionar dos grandes categorías en cuanto al tipo de aprendizaje y su evocación: las memorias declarativas y las memorias no declarativas. A su vez, las memorias declarativas pueden ser semánticas (por ejemplo, de conocimientos generales) o episódicas (sucesos autobiográficos), siendo esta memoria de carácter representacional. Las memorias no declarativas que son aquellas que incluyen aprendizajes procedurales, perceptivos, de condicionamiento y de no asociación siendo un tipo de memoria de carácter disposicional. Para concluir, los distintos sistemas de memoria se pueden distinguir en términos de los diferentes tipos de información que procesan y los principios según los cuales operan (Squire 2004).

El aprendizaje procedural es una forma de memoria no declarativa que implica la adquisición y ejecución automática de habilidades motoras y cognitivas (Knowlton, Siegel, y

Moody 2017). A través de este tipo de aprendizaje, se forman hábitos mediante la repetición y fortalecimiento de los vínculos estímulo-respuesta. A diferencia de los conocimientos declarativos, que se pueden utilizar de diversas formas, el conocimiento procedural suele limitarse al contexto del aprendizaje inicial. Además, mientras que el aprendizaje declarativo utiliza la memoria de trabajo, el aprendizaje procedural no lo hace (Foerde, Knowlton, y Poldrack 2006). Dado que la memoria de trabajo tiene una capacidad limitada, otras tareas que requieren memoria de trabajo pueden interferir con el aprendizaje declarativo, pero no con el aprendizaje procedural. Es importante destacar que el aprendizaje de procedimientos generalmente comienza con la adquisición de conocimiento declarativo (Knowlton, Siegel, y Moody 2017).

3.1 Aprendizaje recompensado:

Volviendo al tema presentado en la introducción, las recompensas pueden motivar comportamientos que permitan a los animales obtener los resultados (Objetos, materiales, recursos) necesarios para su supervivencia. Las recompensas pueden tener tres funciones: pueden actuar como reforzadores positivos para inducir el aprendizaje, provocar movimientos hacia el objeto deseado generando un gasto energético al animal esa elección y por último puede estar asociada a las emociones como el placer o el deseo. Las dos primeras pueden estudiarse con el uso de tareas de aprendizaje y experimentos de electrofisiología en los que se evalúen la cantidad y probabilidad de obtención de una recompensa, su valor subjetivo, la utilidad para el animal, el riesgo que conlleva un aprendizaje para el animal, etc (Schultz 2016). Construir representaciones predictivas del tiempo y el valor de recompensa futura dada la identidad de un estímulo es esencial para las conductas dirigidas a la obtención de un objetivo (Zold y Hussain Shuler 2015). Basándose en la información del contexto, el cerebro aprende a predecir el momento de obtención (Gavornik et al. 2009) y el valor que puede llegar a alcanzar una determinada recompensa (Huertas, Shuler, y Shouval 2013).

El aprendizaje recompensado involucra una secuencia de acciones que están moduladas por la dopamina. Su procesamiento neuronal está asociado al tiempo (requiere que los sujetos hagan estimaciones de tiempo) e involucra mecanismos secuenciales. Al inicio del aprendizaje hay un aumento de la liberación de dopamina de breve duración, que no es selectivo, pero es altamente sensible a la actividad, generando una motivación para el individuo. Así ocurre un proceso de transformación de elecciones inicialmente libres que, por

retroalimentación, se modifican en opciones preferenciales. En cada nueva iteración, se actualiza la representación neuronal del valor de una recompensa (Schultz 2016).

Este tipo de aprendizaje se puede dividir en dos clasificaciones de acuerdo a cómo sea la relación entre el estímulo o la acción que desencadenan una determinada consecuencia. Por un lado, tenemos el condicionamiento clásico o pavloviano: aquí el animal es un sujeto pasivo, ya que el aprendizaje no requiere acciones voluntarias del mismo, sino que se produce en él una asociación entre un estímulo y una consecuencia. En las tareas pavlovianas los animales aprenden que un estímulo (inicialmente neutro) predice una recompensa. Es decir, se establece una relación causal entre estímulo/consecuencia. Ciertos tipos de estímulos biológicos permiten realizar esta asociación, como lo son el agua, la comida o los estímulos de carácter sexual; inicialmente son estímulos incondicionados, que generan respuestas incondicionadas, como lo son la salivación, el consumo, el acercamiento, etc. Para que se produzca el condicionamiento, se le debe presentar sucesivamente un estímulo condicionado que es de carácter sensorial neutro. Luego de reiteradas presentaciones pareadas del estímulo condicionado y el estímulo incondicionado, se establece una asociación. Luego con la sola presentación del estímulo condicionado genera la misma respuesta motora y fisiológica que produce naturalmente el estímulo incondicionado (Pavlov 1927).

Por otro lado, en un aprendizaje operante o instrumental el animal debe realizar una acción activamente para recibir una recompensa y esa es la asociación que se genera. En una primera instancia, la recompensa surge sin una razón aparente y en los sucesivos intentos el animal aprende a asociar que una determinada acción le proveerá una recompensa (en caso de ser una algo de valencia positiva). Este tipo de aprendizaje es el que se desarrollará en la tarea principal de este estudio mediante la utilización de una recompensa positiva como lo es el agua para un animal sediento, aunque cabe destacar que ambos tipos de aprendizaje son complementarios y se superponen en la realidad (Schultz 2015).

3.2 Aprendizaje espacial:

Además de los aprendizajes asociados a recompensas, existen otros tipos de tareas en las que los individuos modifican su comportamiento a partir de la experiencia. La memoria espacial es un proceso mediante el cual se codifica y recupera la información sobre el entorno y orientación de uno mismo en el espacio. Es procesada principalmente en el

hipocampo y en su interacción con las regiones corticales. Esta memoria no es innata y ocurre tanto en humanos como en roedores. (Baram, Donato, y Holmes 2019).

En roedores la memoria espacial es considerada como análoga a una memoria declarativa en humanos (Eichenbaum y Cohen 2014; Crystal y Smith 2014; Bunsey y Eichenbaum 1996), lo que ha permitido utilizar a los roedores como modelos animales para investigar los mecanismos y procesos subyacentes a la memoria espacial en general. La memoria espacial es fundamental para la supervivencia de los animales y está codificada en el cerebro por dos sistemas: uno que utiliza señales distales fuera del organismo, navegación aloécéntrica, y uno que usa la autopercepción del movimiento para integrar el camino recorrido, navegación egocéntrica (Baram, Donato, y Holmes 2019).

Para estudiar el aprendizaje aquí utilizamos la arena de campo abierto (CA, en inglés *Open Field*) que además de estudiar la actividad locomotora permite también detectar conductas simil-ansiosas relacionadas con una menor exploración específica de los sectores céntricos. Aquellos animales que presentan mayor nivel de ansiedad, tienen niveles más bajos de locomoción y exploración de estas áreas (Cardinal et al. 2002).

Además, las ratas tienen tigmotaxis, es decir que prefieren estar en contacto con una superficie mediante sus vibrisas, por lo que evitan las áreas abiertas, identificándolas como áreas amenazantes y buscando un refugio en las paredes (Burn, 2008). Un bajo grado de tigmotaxis puede interpretarse como un mayor grado de comportamiento de riesgo.

3.3 Reconocimiento de Objetos:

La memoria de reconocimiento puede definirse como el proceso de identificar cuándo algo (como un objeto, individuo o lugar) se ha encontrado previamente. También conocida como la memoria del qué, cuándo y dónde. Es aquella que nos permite distinguir entre aportes novedosos y familiares. Las expectativas y procesos de detección de novedades facilitan la adaptación del comportamiento y cumple diversas funciones cognitivas, mostrando sensibilidad a la novedad y la expectativa tanto a nivel neuronal como conductual (Frank y Kafkas 2021). Sabiendo que los roedores tienden a interactuar más con un objeto nuevo que con uno familiar, en esta tarea se estudia la preferencia y la motivación de los animales por explorar un determinado objeto, que se ven reflejadas si el animal pasa más tiempo interactuando con el objeto novedoso (Bevins y Besheer 2006).

Para que un objeto sea novedoso tiene que existir una comparación con otro objeto, es decir, lo que va a atraer la atención del sujeto es la notoriedad de la novedad. La notoriedad o prominencia del objeto puede estar dada por diferentes motivos, como por características físicas, de novedad *per se*, de sorpresa o de motivación de algún tipo, que inducen entonces la atención del individuo (Schultz 2016). Además es importante destacar que los animales no solo tienen preferencia hacia un objeto novedoso sino también hacia una ubicación novedosa (Chao et al. 2022), los animales tienen la capacidad de recordar la aparición de objetos en un lugar determinado y realizar una asociación del objeto y del lugar en un entorno particular.

3.4 Comportamiento espontáneo en el Laberinto Concéntrico Multivariado:

Mediante la utilización de un laberinto que le permite al animal visitar diferentes entornos y evaluar diversos parámetros en una sola prueba (Lundberg, Högman, y Roman 2019). Conociendo como es el entorno de los roedores en su hábitat natural, sabiendo que presentan tigmotaxis, al igual que aversión a la exposición de diferentes intensidades de luz, podemos inferir que los animales evitarán áreas abiertas y elevadas, pero además, evitarán áreas con diferentes niveles de iluminación. Estas características son la base de este tipo de aprendizaje y paradigma comportamental y mediante las cuales se dividirá el laberinto en regiones de refugio o de riesgo (Roth y Katz 1979).

En la prueba del Laberinto Multivariado Concéntrico (*LCM*) o también llamado *multivariable concentric square field TM (MCSF)* se basa, como se mencionó anteriormente, en tres pilares fundamentales del comportamiento de los roedores: la exploración, la toma de riesgos y la búsqueda de refugios. Este laberinto combina características de otras tareas comportamentales ampliamente utilizadas: el laberinto en cruz, el campo abierto, las cajas de luz /oscuridad, entre otras. En este caso el animal tiene la oportunidad de ingresar a diferentes entornos simulando una situación más natural del animal, donde puede elegir si permanecer en un área abierta, en un área con elevaciones, escondites, acceder a secciones con diferentes condiciones de iluminación y lugares para explorar (Meyerson et al. 2006). Lo interesante de este paradigma es que las diferentes regiones permiten observar un abanico más grande de respuestas comportamentales.

4. Estructuras involucradas en los diferentes tipos de aprendizaje

Las distintas regiones del cerebro maduran en la adolescencia a diferentes ritmos, lo que explica las inconsistencias cognitivas y conductuales que se observan en este período

(Lundberg, Högman, y Roman 2019). Las tareas aquí estudiadas involucran la participación de diversas estructuras, por eso hipotetizamos que, a partir de los resultados comportamentales podríamos hallar alguna relación entre el tipo de aprendizaje y la impulsividad.

El estriado es una estructura subcortical que participa de la adquisición y ejecución de secuencias de acciones (Graybiel, 1998). También se lo ha asociado a la estimación del tiempo (Gouvea, 2015; Emmons, 2017). Es muy conocido su rol en la formación de hábitos: se postula que, en una primera etapa, las acciones están orientadas a alcanzar una meta y esto depende del procesamiento del estriado dorso-medial. Si el entrenamiento continúa y las secuencias son ejecutadas repetidamente, se consolida un hábito y estas acciones se realizan de forma automatizada, bajo control del estriado lateral (Graybiel, 2008). El estriado recibe inervación dopaminérgica del mesencéfalo y también está conectado con la corteza medial prefrontal (Mailly et al. 2013; P. M. Baker y Ragozzino 2014).

Los antecedentes del laboratorio muestran la participación del estriado dorsomedial en el aprendizaje de la tarea recompensada. En particular, observamos que adultos y adolescentes exhiben un aumento de la actividad neuronal a nivel poblacional. En los adolescentes este incremento tiene una mayor velocidad (Martinez et al. 2022). Es una posibilidad que esto esté relacionado con la falta de inputs provenientes de la corteza medial prefrontal, que en esa etapa todavía está en desarrollo.

Por otra parte, el hipocampo es una estructura organizada en capas que se asocia principalmente a la formación de memorias episódicas, en particular, aquellas relacionadas con la navegación espacial (Eichenbaum 2017; Lisman et al. 2017; Nyberg et al. 2022). En esta tesis evaluamos 3 tareas que tienen componentes espaciales: la exploración del CA, el laberinto concéntrico multivariado y el reconocimiento de objetos en el laberinto en Y. Se ha comprobado la participación del hipocampo en las dos primeras (Moncada y Viola 2006; De Landeta et al. 2020). Es interesante destacar que en el RO-Y, la identidad de los objetos es codificada en la corteza retrosplenial, mientras que el hipocampo participa de la codificación del “dónde” de los objetos presentados (De Landeta et al. 2020).

El Laberinto Concéntrico Multivariado es una tarea que, además de implicar la exploración espacial, requiere la toma de decisiones y el análisis de riesgos. Se han evaluado los efectos de la modulación dopaminérgica del estriado dorsal en el perfil de exploración del laberinto (Palm et al. 2014). Si bien hay pocas evidencias acerca de las estructuras involucradas, podríamos especular que el hipocampo participa en la codificación de la tarea,

junto con la corteza orbitofrontal, el giro cingulado anterior y otras regiones subcorticales, como la amígdala, el hipocampo y el cerebelo (Broche-Pérez, Herrera Jiménez, y Omar-Martínez 2016).

5. Antecedentes

Previamente en el laboratorio se realizaron experimentos en la tarea recompensada, para estudiar la participación del estriado en la codificación de las acciones de los diferentes tipos de ensayo. El trabajo se realizó con ratas Long Evans adultas y adolescentes, pero únicamente machos. Se observó que las ratas adolescentes presentan una pronunciada prevalencia de respuestas impulsivas en contraposición a las adultas. Además, se vio que la conducta impulsiva estaba relacionada con la actividad estriatal anticipatoria, que refleja la expectativa de obtener una recompensa en los animales (Martínez et al. 2022).

Esta tesis se centró en estudiar no sólo las diferencias entre rangos etarios como se hizo previamente, sino que además incluimos individuos de ambos sexos. En trabajos previos se encontraron diferencias en el juego social en adolescentes y adultos, en función del sexo (Marquardt et al. 2023) y también se vieron diferencias entre sexos en tareas de *go/no go* (Zhang et al. 2023). Por otra parte, incluir animales de ambos sexos tiene múltiples beneficios que exceden aspectos puntuales de la investigación: mejora la eficiencia experimental, ayuda a reducir el sesgo y promover la igualdad social combatiendo estereotipos (Tannenbaum et al. 2019).

Entonces, teniendo en cuenta los antecedentes presentados, la finalidad de este estudio es caracterizar el comportamiento impulsivo en ratas adolescentes, considerando diversos factores como la memoria de largo plazo, la actividad locomotora y la preferencia por el riesgo. Se busca examinar si estos parámetros varían entre grupos y si exhiben alguna correlación con las respuestas prematuras en la tarea recompensada, para entender mejor los mecanismos que subyacen al comportamiento impulsivo.

Objetivos e hipótesis:

Basándonos en resultados previos de nuestro laboratorio, el objetivo de esta tesis de Licenciatura es caracterizar el aprendizaje en ratas Long Evans adolescentes y adultas de ambos sexos en una tarea recompensada auto-iniciada. Además, evaluaremos si la conducta impulsiva en las ratas adolescentes se correlaciona con otros parámetros de aprendizaje.

Hipotetizamos que habrá diferencias en el aprendizaje entre las ratas adolescentes y adultas en la ejecución de esta tarea que se relacionan con los cambios fisiológicos que atraviesan los sujetos en esta etapa del desarrollo. En segundo lugar, existe la posibilidad de que la impulsividad de acción observada en la tarea recompensada esté asociada a otros patrones conductuales. Para corroborarlo, analizaremos el aprendizaje de adolescentes y adultos en diferentes tareas.

Materiales y métodos:

Animales:

Se utilizaron 16 ratas Long Evans adolescentes (P35) (n=8 hembras y n=8 machos, peso ~110 g) y 16 ratas adultas (P60) (n=8 hembras y n=8 machos, peso ~390g) criadas y alojadas en el bioterio del IFIBIO bajo un régimen de luz-oscuridad de 12-12 horas y temperatura ambiente de 21°C. Los experimentos fueron realizados durante la fase de luz. Tres días previos al inicio de los experimentos, los animales fueron manipulados durante al menos tres minutos (*handling*), para disminuir el estrés emocional.

Cada experimento se realizó con tandas de 3-4 animales elegidos al azar que fueron alojados en conjunto. Un día antes del comienzo del entrenamiento en la tarea recompensada, los sujetos fueron privados de agua, teniendo comida *ad libitum*. A lo largo del protocolo de entrenamiento, tuvieron acceso restringido al agua (20 minutos cada día) y un período de descanso de un día o dos a la semana. Este programa mantuvo a los animales al 90% de su peso previo a la privación. En caso de mayor reducción en el peso, se contrarrestó con un mayor acceso libre al agua. Todos los procedimientos cumplieron con la Guía para el cuidado y uso de animales de Laboratorio de los Institutos Nacionales de Salud (Publicación No. 80-23, revisada en 1996) y fueron aprobadas por Comité de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Buenos Aires (CICUAL), número de trámite RESCD-2022-315-E-UBA-DCT#FMED. Finalizadas las 15 sesiones de la tarea recompensada, se les entregó agua *ad libitum* para el desarrollo de las otras tareas comportamentales. En todos los paradigmas se mantuvo el mismo horario para las sesiones de entrenamiento o testeo.

Ensayos conductuales:

Tarea recompensada:

Esta tarea está descrita en (Martinez et al. 2022). La caja de entrenamiento está hecha de acrílico, con paredes de color azul oscuro, piso de color blanco y la puerta frontal transparente. Una de las paredes posee un puerto o *nose-poke*, en cuyo interior hay un tubo con el que se entrega la recompensa (una gota de agua), como se muestra en la Figura 1. El puerto posee dos haces infrarrojos: uno que detecta la entrada del animal y otro que detecta los lengüetazos. Además, en el interior del puerto hay un led verde, que sirve como clave

visual y le indica al animal que la entrada fue realizada a tiempo. Los eventos conductuales (inicio y fin del ensayo, lengüetazos, encendido de la clave visual y entrega de la recompensa) son registrados en un archivo .txt a medida que son detectados.

El entrenamiento constó de 15 sesiones, que se desarrollaron a lo largo de entre tres y cuatro semanas. Se realizó de forma individual (una rata cada vez) una sesión por día, de 300 ensayos. Las sesiones terminaron cuando el sujeto completó los 300 ensayos o cuando se alcanzó un tiempo máximo de entrenamiento de 120 min.

Cada ensayo requiere que, luego de cumplirse un intervalo de espera mínimo de 2,5 segundos, los animales introduzcan su cabeza en el puerto y realicen una secuencia de 8 lengüetazos para obtener una gota de agua como recompensa. Al lamer el número requerido de veces, la recompensa (~20 µl de agua) estuvo disponible en la mitad de los ensayos de forma pseudoaleatoria. Los ensayos se clasificaron como “ensayos a tiempo” cuando fueron iniciados oportunamente (luego de los 2.5 s de espera). Por el contrario, aquellos ensayos iniciados antes del tiempo de espera mínimo requerido fueron clasificados como “prematuros”. Por otro lado, se analizó si los ensayos incluían o no la secuencia completa de 8 lengüetazos, clasificándolos en ensayos “con secuencia” (8 o más lengüetazos) o “sin secuencia” (<8 L). En la figura 1B se muestra un esquema con los posibles tipos de ensayo.

Para analizar los cambios en la conducta debidos al entrenamiento, las primeras 3 sesiones fueron clasificadas en “tempranas” y las últimas 3 como “tardías”. Se eligió la sesión de mejor desempeño de cada categoría. Así, se compararon 2 sesiones de cada animal, una “temprana” y una “tardía”.

Luego de su recolección, los datos fueron procesados con software hecho en MATLAB para obtener las diferentes variables de interés para el posterior análisis estadístico. Se obtuvieron los siguientes parámetros para caracterizar el comportamiento de los animales:

- i) Recompensas por minuto
- ii) Porcentaje de ensayos de cada tipo (a tiempo, prematuros, con y sin secuencia de lengüetazos)

Concluida la etapa inicial de aprendizaje, es decir, cuando los animales ya realizaban más del 80% de entradas correctas y se observaba una marcada disminución del tiempo que les llevaba completar la sesión, fueron entrenados en el Campo Abierto, en el Reconocimiento de Objetos en el Laberinto en Y y en Laberinto Concéntrico Multivariado. Para evitar la

interferencia de una tarea sobre la otra, los entrenamientos y testeos en estos tres paradigmas se realizaron con un mínimo de cuatro horas posteriores a la realización de la tarea recompensada. Todos los paradigmas complementarios fueron registrados en video para su posterior análisis.

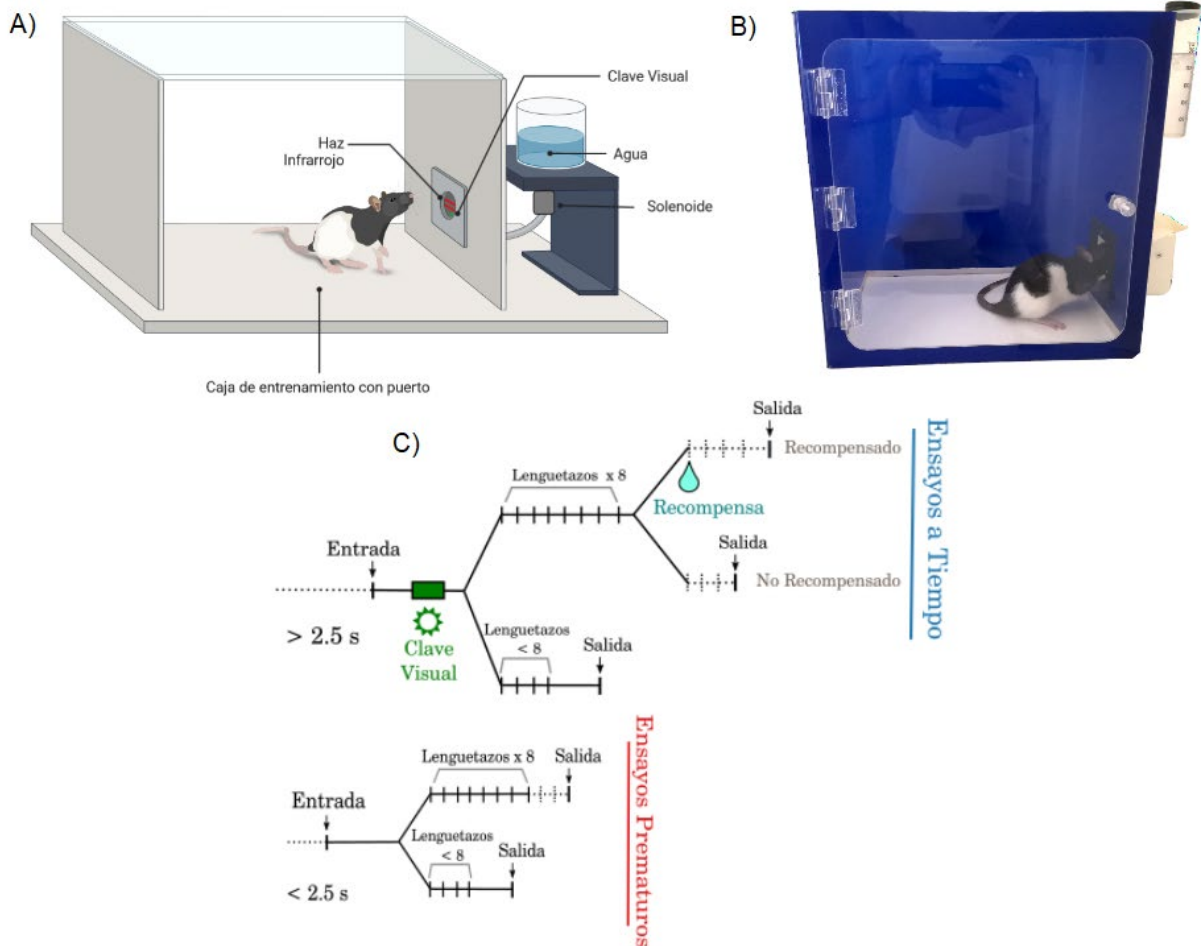


Figura 1. Tarea conductual. (A) Esquema de la caja utilizada en los experimentos de tarea recompensada. (B) Representación de la caja conductual utilizada en la tarea recompensada (C) Esquema de tipos de ensayo según la cantidad de lengüetazos realizados y el tiempo de espera entre ensayos.

Exploración del Campo abierto (CA):

En esta tarea, las ratas son entrenadas individualmente en una arena cuadrada de 50 cm de alto x 40 cm de profundidad, de madera pintada de color gris y con piso dividido en 9

cuadrantes iguales mediante algún material que no sea llamativo para el animal pero que sea posible distinguir su trayectoria para quien realiza la tarea, como se observa en la Figura 2.

Los sujetos fueron introducidos en la arena durante 10 minutos y se registró el número de cruces entre cuadrantes y el número de *rearings* (postura exploratoria en la que el animal se para sobre sus patas traseras y mueve su cara y vibrisas en diferentes direcciones). Se realizó una sesión de entrenamiento y a las 24 horas se realizó la sesión de evaluación o testeo, re-exponiendo los animales al mismo contexto y registrando los mismos parámetros. Se evaluó la memoria de habituación de los sujetos, calculada como:

$$IH = \frac{\text{Cantidad de Cruces en el testeo}}{\text{Cantidad de Cruces en el entrenamiento}}$$

Ecuación 1: Índice de habituación

Cuanto menor es el índice de habituación (menor a 1), mayor la habituación, es decir, una mayor caída de la actividad exploratoria representando una memoria más robusta para esta actividad.

Antes del inicio de cada exploración, se limpió el laberinto con una solución de agua, alcohol y jabón para eliminar huellas olfativas.

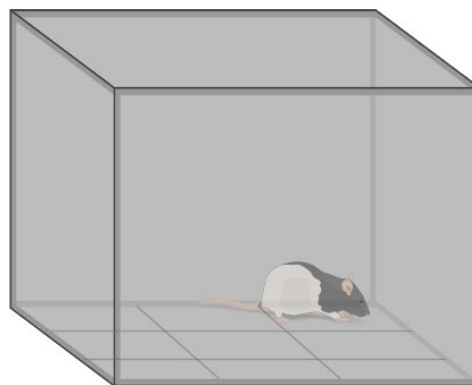


Figura 2. Campo Abierto. Esquema de la caja utilizada en los experimentos de Campo abierto. Se pueden observar los cuadrantes en el suelo de la caja que se emplean para el conteo del número de cruces.

Laberinto de reconocimiento de objetos en Y (RO-Y):

En una tercera instancia, siguiendo el protocolo de (De Landeta et al. 2020) y (Mathiasen y DiCamillo 2010) se realizó el reconocimiento de objetos en el Laberinto en Y

como se observa en la Figura 3. El mismo es un laberinto de acrílico en forma de Y, cada brazo del laberinto mide 27 cm de largo y 10 cm de ancho, con paredes blancas de 40 cm de alto, impidiendo que el animal visualice alguna señal externa. Los brazos en los que se colocaron los objetos se acortaron a 8,5 cm. El paradigma de reconocimiento se basa en el comportamiento natural de los roedores para explorar objetos o contextos novedosos. Para ello se realizaron tres sesiones en días consecutivos. En la primera, se realizó una habituación al contexto con una duración de 10 minutos, sin objetos. Al segundo día, los animales fueron re-expuestos al mismo laberinto, pero en este caso había dos objetos idénticos de vidrio o plástico, cada uno colocado en un extremo de la Y. Esta segunda sesión tuvo una duración de 5 minutos y se midió el tiempo de exploración de cada uno de los objetos. Es condición necesaria que en la sesión de entrenamiento ambos objetos sean explorados por una cantidad de segundos equivalentes. Esto asegura que ni el objeto ni la posición del objeto presenten preferencia *per se* para los animales. Por último, se realizó una sesión de testeo con una duración de 3 minutos, en este caso, uno de los objetos había sido presentado el día anterior en la misma posición (objeto familiar) y en la otra posición el objeto novedoso, sin modificar las posiciones de los objetos en la caja con respecto al entrenamiento.

El tiempo de exploración de cada objeto fue registrado igual que en la sesión de entrenamiento. La ubicación del objeto novedoso se seleccionó al azar y se equilibró entre animales. Se utilizaron cronómetros de mano para anotar el tiempo en el que el animal pasó explorando (ya sea olfateando o tocando) los objetos en ambas sesiones. Las sesiones 2 y 3 fueron registradas en video para posterior análisis. La cuantificación de esta memoria de reconocimiento y discriminación del objeto novedoso se realizó con el Índice de Preferencia (IP), que se calculó de la siguiente manera:

$$IP = \frac{\text{Tiempo de exploración del Objeto Novedoso} - \text{Tiempo de exploración del Objeto familiar}}{\text{Tiempo de exploración del Objeto Novedoso} + \text{Tiempo de exploración del Objeto familiar}}$$

Ecuación 2: Índice de preferencia entre dos objetos.

Un IP significativamente diferente de 0 es considerado como memoria de reconocimiento de objetos, mientras que no se consideró preferencia cuando los índices no fueron significativamente diferentes a cero. Analizamos datos de animales que tenían un mínimo tiempo de exploración de 15s por objeto en el entrenamiento y no mostró preferencia por ningún lado, y durante la fase de elección exploró más de 10s al menos uno de los objetos. Los objetos y el laberinto se limpiaron con una solución de jabón, alcohol y agua antes de ser presentado a cada animal.

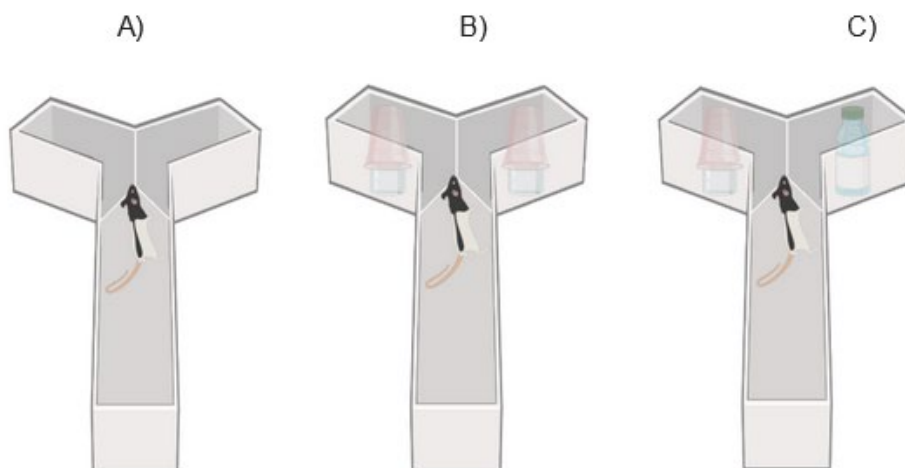


Figura 3. Laberinto de Reconocimiento de Objetos en Y. Esquema de la caja utilizada en los experimentos de reconocimiento de objetos. A) Caja utilizada en el día 1, sin objetos. B) Caja utilizada en el día 2, con dos objetos novedosos idénticos. C) Caja utilizada en el día 3 con dos objetos uno novedoso y uno familiar.

Laberinto Concéntrico Multivariado (LCM):

Esta tarea fue descrita anteriormente por (Meyerson et al. 2006) y (Fernández et al. 2020). Consiste en una caja de 100 cm x 100 cm, la cual posee 9 áreas con diferentes características: Un gran cuadrado central (con una región en su centro de 25 cm. de diámetro), tres pasillos, un refugio, un obstáculo, una rampa y un puente elevado iluminado con luz muy intensa, como se observa en la Figura 4. Se realizó una única sesión de 20 minutos la cual fue registrada en video. La cuantificación del tiempo de permanencia en cada sector se hizo de forma manual a partir de los videos obtenidos. Se analizó la frecuencia de visitas a cada una de las áreas, como así también la duración de las mismas, el tiempo transcurrido en áreas de riesgo y en áreas consideradas de refugio.

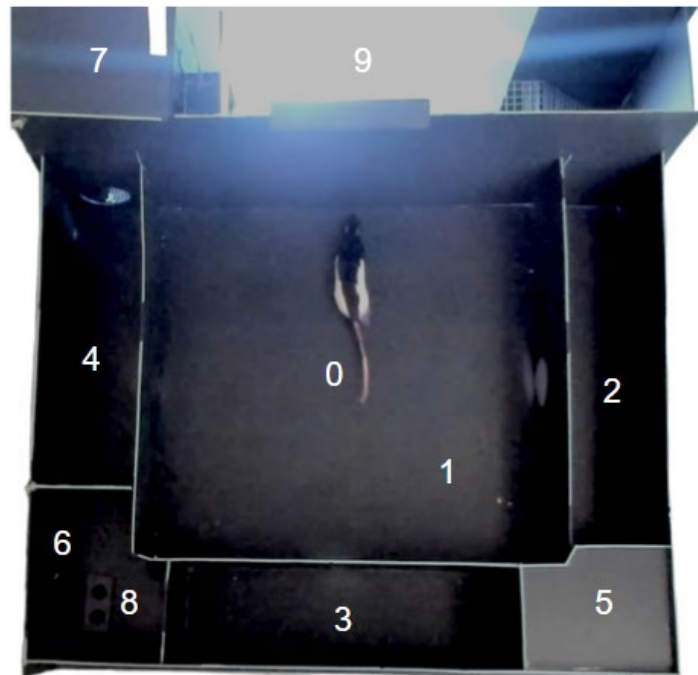


Figura 4. Laberinto Concéntrico Multivariado. Esquema de la caja utilizada en los experimentos de MVM. 0) Círculo Central 1) Región Central 2) Pasillo Derecha 3) Pasillo Inferior 4) Pasillo Izquierda 5) Esquina oscura 6) Obstáculo 7) Rampa 8) Hueco de exploración (*holeboard*) 9) Puente.

Análisis de datos:

Los datos de comportamiento de la tarea recompensada se procesaron con programas personalizados hechos en MATLAB y el análisis estadístico se realizó con *Graphpad Prism 8*. Aquellos datos de los experimentos de Campo Abierto y RO-Y fueron obtenidos *in situ* y se analizaron *a posteriori* con *Graphpad Prism 8* (GraphPad Software Inc). En todos los casos, el nivel α se fijó en 0,05. Todos los datos se presentan como media \pm SEM. Los datos de comportamiento de los experimentos de Laberinto Concéntrico Multivariado fueron obtenidos *a posteriori* mediante registros de video, se procesaron mediante *Jwatcher*, un script personalizado en Python y graficados mediante *Graph Pad Prism 8* (GraphPad Software Inc). Se utilizaron los test de Anova de Dos Vías de Medidas Repetidas, Curvas ROC y Test de T pareados para los experimentos de Tarea Recompensada, Curvas ROC y test de T no pareados para los experimentos de Campo Abierto, Test de T no pareados para los experimentos de RO-Y y Test de T no pareado, Anova de Dos Vías y test Mann-Whitney para los experimentos de Laberinto Concéntrico Multivariado.

Resultados

Tarea recompensada:

Con el fin de estudiar diferencias el aprendizaje de una tarea recompensada relacionadas con la edad, entrenamos ratas *Long Evans* adultas y adolescentes. Esta tarea requiere que, luego de esperar 2.5 s entre ensayos, los individuos ingresen su cabeza en el puerto de la caja de entrenamiento y realicen una secuencia de 8 lengüetazos para obtener una gota de agua como recompensa. A diferencia de otras tareas recompensadas en las que una clave visual o sonora indica el inicio de los ensayos, aquí son auto-iniciados por el animal, es decir, que él mismo decide en qué momento entrar al puerto.

Los ensayos se clasificaron en función del tiempo esperado para ingresar al puerto: si el animal respetó el intervalo mínimo de 2.5 s entre ensayos, los ensayos son “a tiempo”. Por el contrario, si ingresó antes de los 2.5 s los ensayos son “prematurados”. En los ensayos a tiempo, se enciende una clave visual que indica que respetó el intervalo mínimo de tiempo de espera. Además, para cada ensayo consideramos si el animal realizó la secuencia mínima de 8 lengüetazos o no. En consecuencia, hay 4 tipos de ensayo posibles: Ensayos prematuros sin secuencia, ensayos prematuros con secuencia, ensayos a tiempo sin secuencia y ensayos a tiempo con secuencia (Como se esquematizan en la Figura 1). Los únicos ensayos recompensados son aquellos ensayos a tiempo y con secuencia, de estos solo en la mitad se les entregó la recompensa.

A partir de la clasificación en los cuatro tipos de ensayos se realizaron curvas de aprendizaje de las ratas adolescentes (Figura 5) y de las ratas adultas (Figura 6) a lo largo de las 15 sesiones de entrenamiento. En ambos casos, podemos observar que los ensayos sin secuencia, ya sean prematuros o a tiempo, disminuyen en ambos grupos a medida que avanza el entrenamiento. Los adolescentes y los adultos aprenden rápidamente la tarea y necesitan de unas pocas sesiones para mejorar su desempeño, es decir, disminuir el porcentaje de ensayos prematuros y aumentar el número de ensayos a tiempo con secuencia. Incluso, se observa que desde la primera sesión de entrenamiento, realizan un porcentaje de ensayos correctos aproximadamente del 50 %.

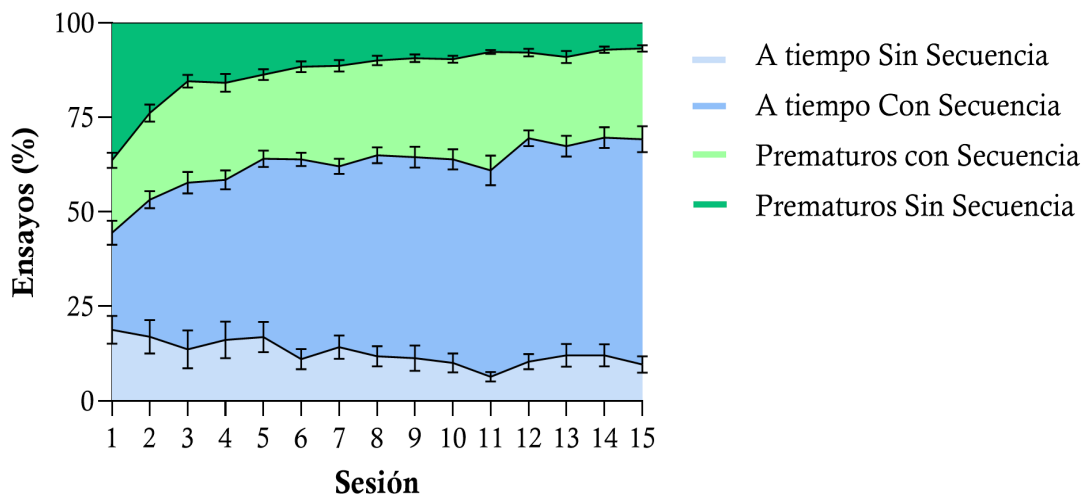


Figura 5. Curva de Aprendizaje de las ratas adolescentes. Porcentaje acumulado de ensayos a tiempo sin secuencia, ensayos a tiempo con secuencia, ensayos prematuros con secuencia y ensayos prematuros sin secuencia para las ratas adolescentes machos (N=8) y hembras (N=8) a lo largo de las 15 sesiones de entrenamiento. En celeste se muestran los ensayos a tiempo y en verde los ensayos prematuros.

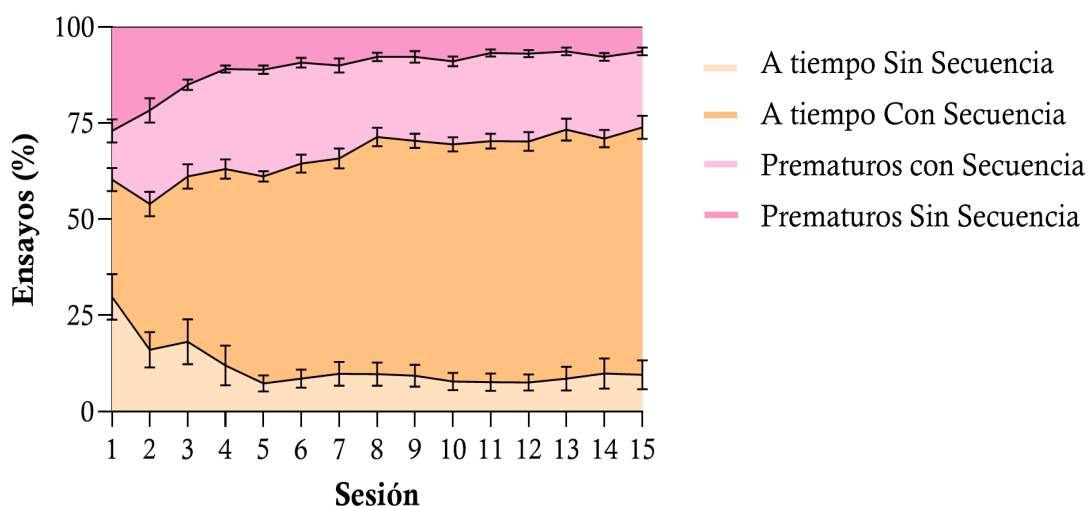


Figura 6. Curva de Aprendizaje de las ratas adultas. Porcentaje acumulado de ensayos a tiempo sin secuencia, ensayos a tiempo con secuencia, ensayos prematuros con secuencia y ensayos prematuros sin secuencia para las ratas adultas machos (N=8) y hembras (N=8) a lo largo de las 15 sesiones de entrenamiento. En naranja se muestran los ensayos a tiempo y en rosa los ensayos prematuros.

Es importante notar que, si bien los adolescentes, empiezan con un mejor desempeño (realizan aproximadamente el 55% de ensayos a tiempo con secuencia, mientras que los adultos sólo el 45%), con el entrenamiento los adultos mejoran significativamente,

disminuyendo las entradas prematuras y aumentando las entradas a tiempo. Esto contrasta con los adolescentes quienes aún en sesiones tardías presentan un mayor número de entradas prematuras aún en sesiones avanzadas del entrenamiento, lo que sugiere que tienen una conducta más impulsiva.

Luego de la construcción de las curvas de las Figuras 5 y 6, analizamos otros parámetros de aprendizaje seleccionando una sesión de la etapa temprana del entrenamiento y una sesión tardía de cada una de las ratas entrenadas en la tarea recompensada. En la Figura 7 podemos observar que, tanto para los adolescentes como para los adultos, el número de recompensas obtenidas al comienzo del entrenamiento (*Temprano*) es significativamente menor que las recompensas obtenidas hacia el final del entrenamiento (*Tardía*) ($p < 0,0001$).

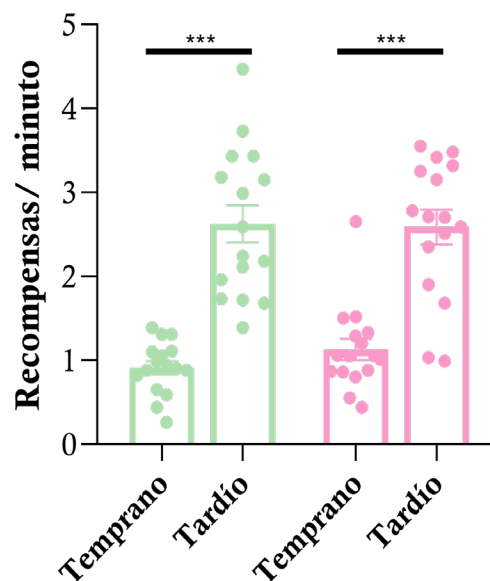


Figura 7. Cantidad de recompensas obtenidas por minuto para ratas adolescentes y ratas adultas. Recompensas obtenidas por minuto para ratas adolescentes (N=16, ●) y ratas adultas (N=16, ●), considerando una sesión *temprana* y una sesión *tardía* para cada rata. Los datos se presentan como media de la sesión \pm error estándar, *** $p < 0,0001$ factor tiempo, Anova de Dos vías de Medidas Repetidas.

Además del aumento en la tasa de obtención de recompensas, los animales de ambos grupos mejoran su desempeño en la tarea realizando cada vez más secuencias de lengüetazos en los ensayos. En las Figuras 8 y 9, se muestra el porcentaje de secuencias correctas realizadas en ensayos a tiempo y ensayos prematuros.

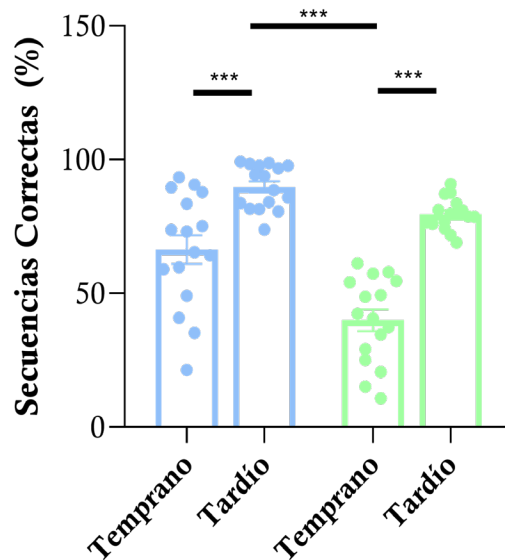


Figura 8. Cuantificación del porcentaje de secuencias correctas a tiempo (●) y prematuras realizadas de las ratas adolescentes (●). Porcentaje de secuencias correctas (8 lengüetazos o más) a tiempo y prematuras de ratas adolescentes (N=16) considerando una sesión *temprana* y una sesión *tardía* para cada rata. Los datos se presentan como media de la sesión \pm error estándar, *** $p < 0,0001$ factor tiempo, Anova de Dos vías de Medidas Repetidas.

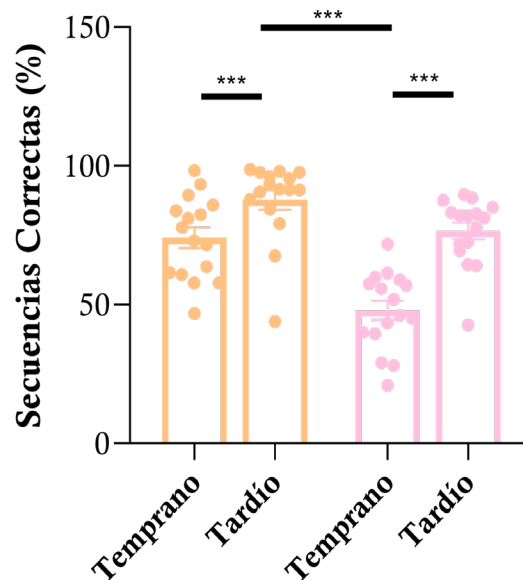


Figura 9. Cuantificación del porcentaje de secuencias correctas a tiempo (●) y prematuras realizadas de las ratas adultas (●). Porcentaje de secuencias correctas (8 lengüetazos o más) a tiempo y prematuras para ratas adultas (N=16), considerando una sesión *temprana* y una sesión *tardía* para cada rata. Los datos se presentan como media de la sesión \pm error estándar, *** $p < 0,0001$ factor tiempo, Anova de Dos vías de Medidas Repetidas.

Considerando la cantidad de secuencias que los animales hacen por recompensa obtenida en los ensayos prematuros, observamos que los adolescentes realizan más que los adultos tanto al inicio como al fin del entrenamiento (Figura 10, $p=0,0198$, Anova de Dos Vías). Es interesante destacar que ambos grupos en las sesiones tempranas realizan una mayor cantidad de secuencias por recompensa obtenida y en las sesiones tardías, el comportamiento está más ajustado. Por último, la diferencia entre edades se hace mayor cuando consideramos todos los ensayos prematuros por recompensa obtenida (Figura 11, $p=0,0004$, Anova de Dos Vías de Medidas Repetidas).

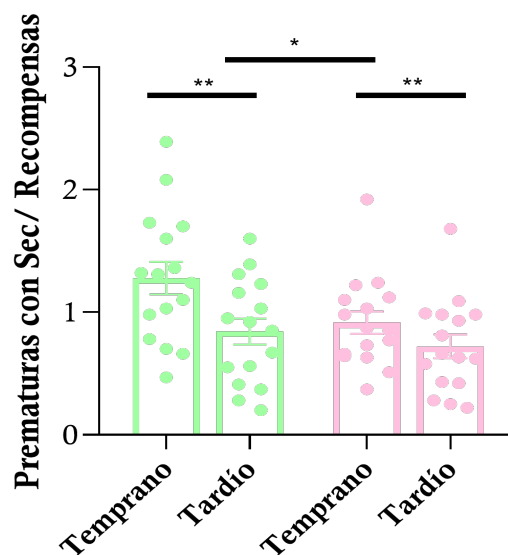


Figura 10. Cantidad de ensayos prematuros con secuencia por cantidad de recompensas obtenidas para ratas adolescentes y ratas adultas. Para ratas adolescentes (N=16, ●) y ratas adultas (N=16, ●), considerando una sesión *temprana* y una sesión *tardía* para cada rata. Los datos se presentan como media de la sesión \pm error estándar, ** $p=0,0016$ factor tiempo, * $p=0,0198$ factor edad, $p=0,3076$ factor interacción, Anova de Dos vías de Medidas Repetidas.

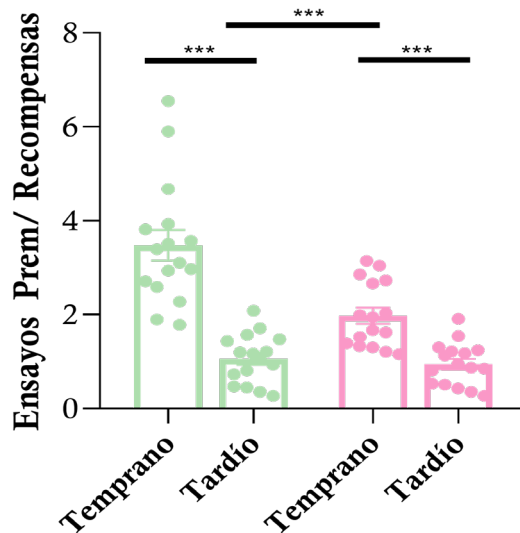


Figura 11. Cantidad de ensayos prematuros con y sin secuencia por cantidad de recompensas obtenidas para ratas adolescentes y ratas adultas. Para ratas adolescentes (N=16, ●) y ratas adultas (N=16, ●), considerando una sesión *temprana* y una sesión *tardía* para cada rata. Los datos se presentan como media de la sesión ± error estándar, **** p<0,0001 factor tiempo, *** p=0,0004 factor edad, ** p=0,0023 factor interacción, Anova de Dos vías de Medidas Repetidas.

Por este motivo, armamos un histograma de frecuencias de entradas acumuladas para los distintos tiempos de espera. En la Figura 12 se muestran las frecuencias acumuladas de la sesión tardía de cada animal (trazos completos) y en líneas punteadas se graficó el ajuste de las curvas a una función logística para cada edad. La función logística está definida por 3 parámetros diferentes: A y C están relacionados con el mínimo y máximo de la curva respectivamente, mientras que B está relacionado con la velocidad de crecimiento de la curva. Hallamos que el parámetro B, es significativamente mayor en los adolescentes. Esto muestra que la curva de tiempos de espera crece a mayor velocidad en adolescentes que en adultos.

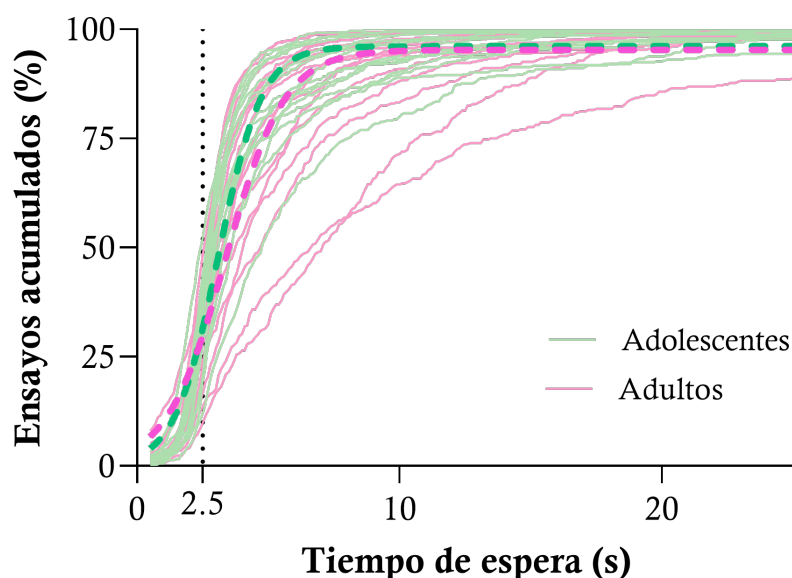


Figura 12. Porcentaje de ensayos acumulados en función del tiempo de espera. Para ratas adolescentes (N=16, ●) y ratas adultas (N=16, ●), se muestran sólo las sesiones de etapa tardía para cada grupo. Cada línea llena corresponde a una sesión y la línea punteada corresponde al ajuste. Para el análisis estadístico se realizó un ajuste logístico. Se encontraron diferencias significativas únicamente en el parámetro 2, siendo este la pendiente de la curva.

En resumen, los animales de ambos grupos aprenden a realizar los ensayos. Al inicio del entrenamiento cometen más entradas sin realizar secuencias. A medida que el aprendizaje se va consolidando, mejoran su desempeño realizando cada vez más secuencias (en entradas a tiempo y prematuras) y también aumentan la precisión respecto del tiempo mínimo requerido para realizar un ensayo. Sin embargo, a lo largo del entrenamiento, los adolescentes realizan un número mayor de entradas prematuras que se conserva aún en la etapa tardía.

Actividad locomotora y memoria de habituación:

Consideramos otros parámetros de aprendizaje que pudieran explicar o estar relacionados con la conducta impulsiva de las ratas adolescentes en la tarea recompensada. Dado que se suele asociar a la adolescencia como una etapa de locomoción exacerbada, en primer lugar, evaluamos la actividad locomotora y la memoria de habituación espacial de ambos grupos etarios en un CA. Para ello se entrenaron los animales en una sesión de 10 min de duración y fueron evaluados en una sesión de testeo a las 24 horas, estudiando la memoria de largo término. Observamos que los animales habitúan durante la sesión de entrenamiento, realizando una menor cantidad de cruces entre cuadrantes hacia el final de la sesión (Figura 13, $p < 0,0001$, test de t pareado).

Contrariamente a lo esperado, los adultos presentan una mayor actividad locomotora en el primer minuto con respecto a los adolescentes (Figura 13, $p=0,0164$, test de t no pareado).

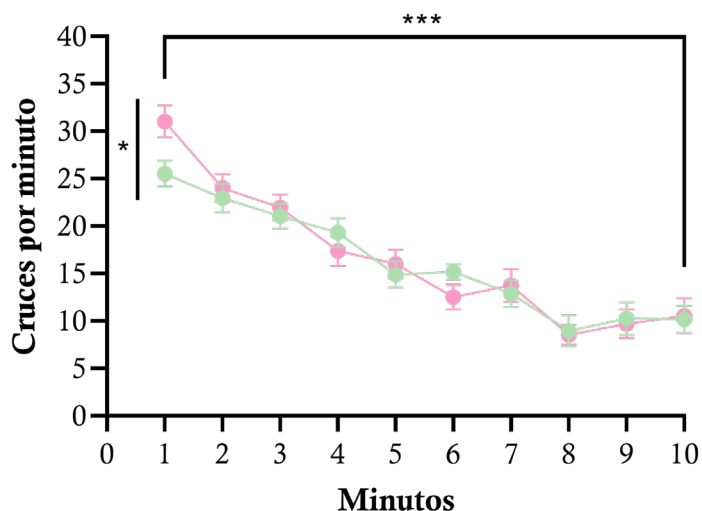


Figura 13. Cruces por minuto a minuto en el entrenamiento (Día 1). Para ratas adolescentes (N=16, ●) y ratas adultas (N=16, ●). Los datos se presentan como media ± error estándar. Se realizó el test de t pareado $***p<0,0001$ y no pareado $*p=0,0164$.

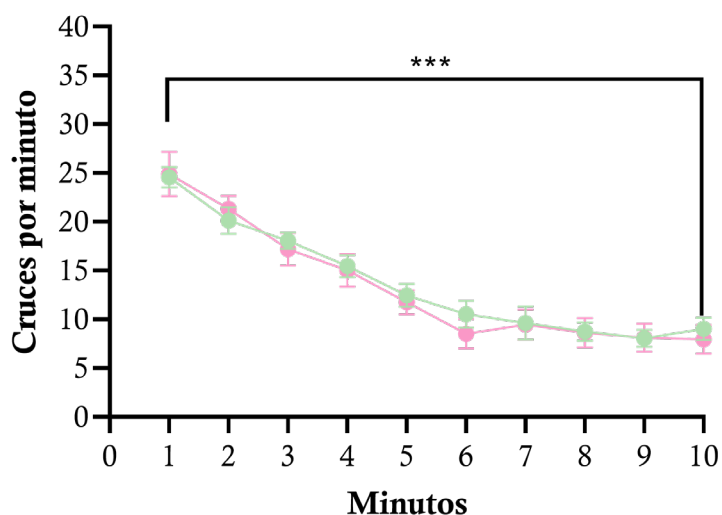


Figura 14. Cruces totales minuto a minuto en el testeo (Día 2). Para ratas adolescentes (N=16, ●) y ratas adultas (N=16, ●). Los datos se presentan como media ± error estándar. $***p<0,0001$, Test de t pareado.

En la sesión de testeo las ratas adolescentes y adultas no presentaron diferencias significativas en la cantidad de cruces. Al igual que en la sesión de entrenamiento, los

animales habituaron durante la sesión. Además, realizaron una menor cantidad de cruces entre ambas sesiones, evidenciando memoria de habituación al CA (Figura 15, $p=0,0173$, test de t no pareado).

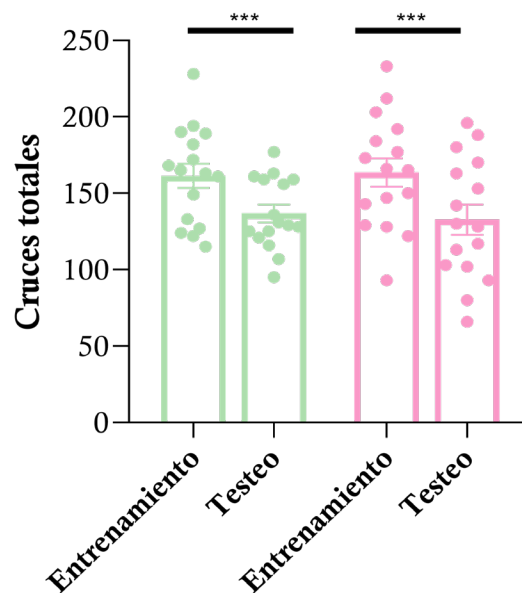


Figura 15. Cruces totales para adolescentes y adultos. Para ratas adolescentes (N=16, ●) y ratas adultas (N=16, ●). Los datos se presentan como media \pm error estándar. *** $p<0,0001$, factor tiempo, Anova de Dos Vías de Medidas Repetidas.

Por otro lado, cuantificamos los rearings. De igual manera que con los cruces, tanto los adolescentes como los adultos presentan diferencias significativas en el día del testeo respecto del training, como se observa en la Figura 16 ($p=0,0496$, test de t no pareado).

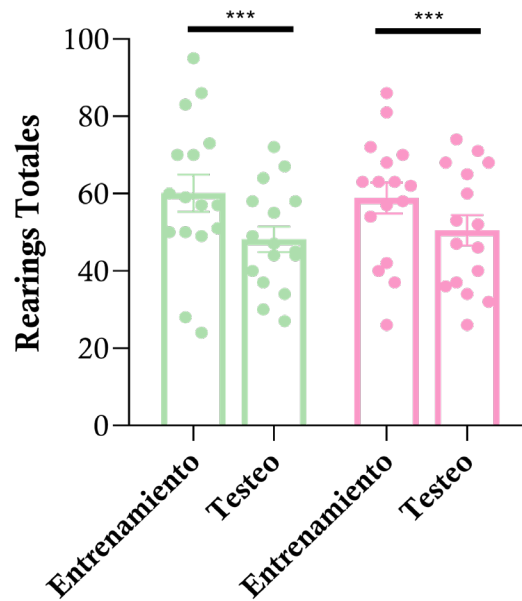


Figura 16. Rearings totales para adolescentes y adultos. Para ratas adolescentes (N=16, ●) y ratas adultas (N=16, ●). Los datos se presentan como media ± error estándar, *** $p < 0,0001$, Anova de Dos vías de Medidas Repetidas.

Finalmente, calculamos el índice de habituación para cruces y rearings. Ambos son significativamente diferentes de 0 pero no hallamos diferencias entre grupos (Figuras 17 y 18 $p=0,3450$ y $p=0,9894$, test de t no pareado). De esta manera, podemos concluir que la actividad locomotora de los adolescentes es comparable a la de los adultos y que la impulsividad en la tarea recompensada no se debe a una mayor actividad locomotora en los individuos más jóvenes.

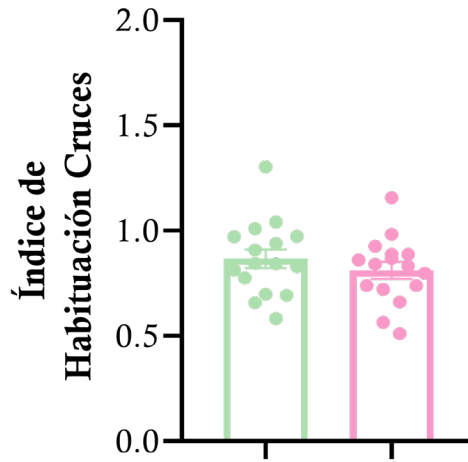


Figura 17. Porcentaje de habituación por la cantidad de cruces. Para ratas adolescentes (N=16, ●) y ratas adultas (N=16, ●). Los datos se presentan como media \pm error estándar. Se realizó el test de t no pareado con un $p < 0,05$ para evaluar la significancia de los datos dentro de ambos grupos.

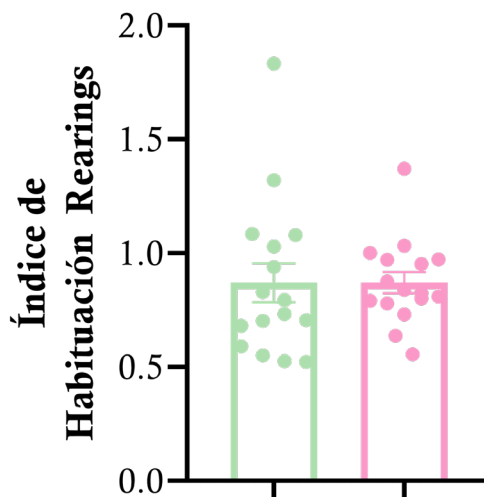


Figura 18. Porcentaje de habituación por la cantidad de Rearings. Para ratas adolescentes (N=16, ●) y ratas adultas (N=16, ●). Los datos se presentan como media \pm error estándar. Se realizó el test de t no pareado con un $p < 0,05$ para evaluar la significancia de los datos dentro de ambos grupos.

Memoria de Largo Término de reconocimiento de objetos en el laberinto en Y:

Hipotetizamos que la dificultad de las ratas adolescentes para hacer los ensayos a tiempo podría estar ligada a impedimentos en el aprendizaje no relacionados con la actividad motora. Por eso, evaluamos la memoria de reconocimiento de objetos en el laberinto en Y

(RO-Y). Este paradigma de reconocimiento de objetos (RO) se basa en la preferencia de los roedores por explorar lugares u objetos que le resulten novedosos. A diferencia de otros paradigmas de RO, en el RO-Y los objetos son presentados en un laberinto de pequeño tamaño, por lo que no hace falta un gran desplazamiento para poder explorar los objetos activamente.

En la Figura 19, podemos observar el tiempo de exploración de los objetos en el entrenamiento es igual, tanto para adolescentes (Figura 19, $p=0,9296$, test de t no pareado) como para adultos (Figura 20, $p=0,9504$, test de t no pareado).

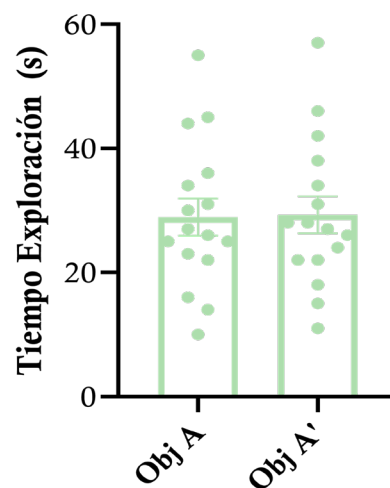


Figura 19. Tiempo de exploración en el entrenamiento (Día 1) de las ratas adolescentes. Tiempo de exploración activa hacia el objeto A y el Objeto B, siendo que $A \neq B$ para ratas adolescentes (●) machos (N=8) y hembras (N=8). Los datos se presentan como media \pm error estándar. Se realizó el test de t no pareado con un $p < 0,05$ para evaluar la significancia de los datos.

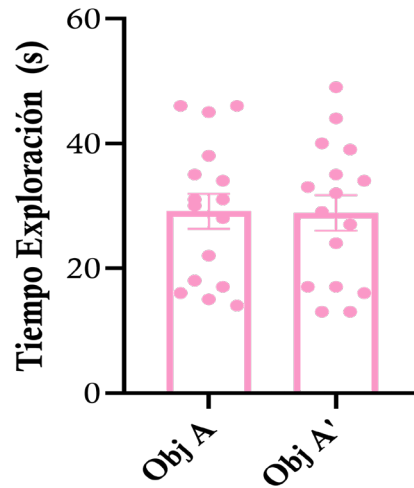


Figura 20. Tiempo de exploración en el entrenamiento (Día 1) de las ratas adultas. Tiempo de exploración activa hacia el objeto A y el Objeto A', siendo que A=A' para ratas adultas (●) machos (N=8) y hembras (N=8). Los datos se presentan como media ± error estándar. Se realizó el test de t no pareado con un $p < 0,05$ para evaluar la significancia de los datos.

En el día del testeo, registramos el tiempo de exploración pero en este caso había un objeto novedoso (Objeto B) y un objeto que había sido explorado el día anterior (Objeto A). En ambos casos podemos ver que el tiempo de exploración es significativamente mayor hacia el objeto novedoso (Objeto B) (Figura 21, $p < 0,0001$ y Figura 21, $p < 0,0001$, test de t no pareado).

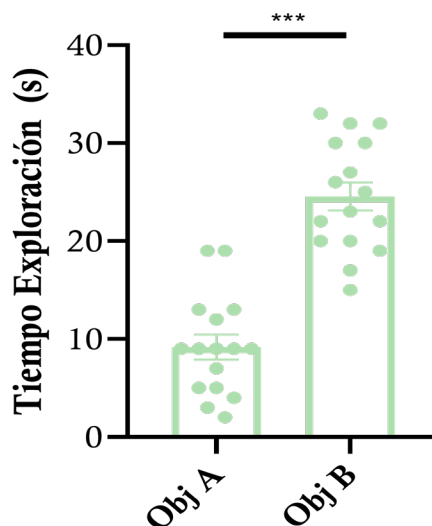


Figura 21. Tiempo de exploración en el testeo (Día 2) de las ratas adolescentes. Tiempo de exploración activa hacia el objeto A y el Objeto B, siendo que $A \neq B$ siendo B el objeto novedoso para ratas adolescentes (●) machos (N=8) y hembras (N=8). Los datos se presentan como media ± error estándar. *** $p < 0,0001$, Test de t pareado.

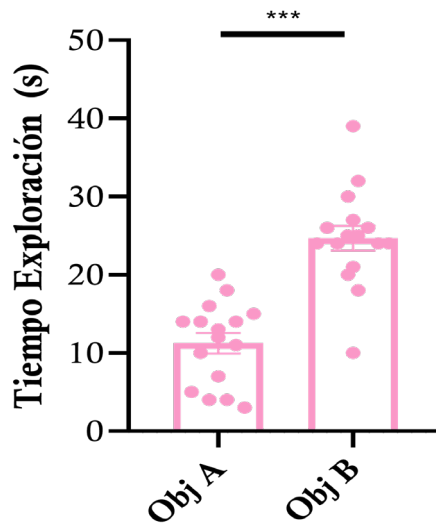


Figura 22. Tiempo de exploración en el testeo (Día 2) de las ratas adultas. Tiempo de exploración activa hacia el objeto A y el Objeto B, siendo que A≠B siendo B el objeto novedoso para ratas adultas (●) machos (N=8) y hembras (N=8). Los datos se presentan como media ± error estándar. *** $p < 0,0001$, Test de t pareado.

Posteriormente, calculamos el índice de preferencia para poder comparar el comportamiento entre edades. Tanto para adolescentes como para adultos el índice de preferencia es significativamente diferente de cero, por lo cual, presentan memoria de RO de largo término y esta memoria no varía según la edad (Figura 23, $p < 0,0001$, *Test de t de una muestra*).

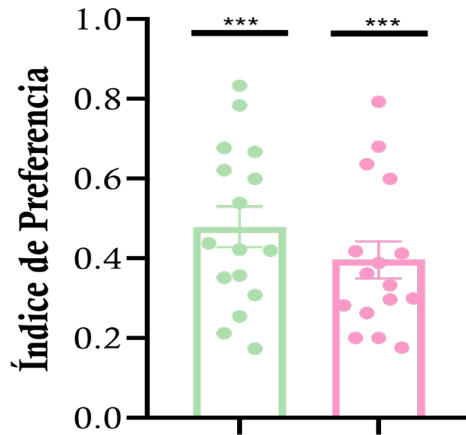


Figura 23. Índice de preferencia para Adolescentes y Adultos. Índice de preferencia hacia el objeto familiar por sobre el novedoso para ratas adolescentes (N=16, ●) y ratas adultas (N=16, ●). Los datos se presentan como media \pm error estándar. Se realizó el Test de t no pareado con un $p < 0,05$ para evaluar las diferencias entre edades con resultado no significativo y *** $p < 0,0001$, *Test t de una muestra* con valor hipotético cero para evaluar cada índice por separado.

Laberinto Concéntrico Multivariado:

Por último, completamos la caracterización del comportamiento de las ratas adolescentes y adultas utilizando el LCM. El LCM permite evaluar la preferencia por la toma de riesgos a partir de los patrones de exploración de los animales cuando son expuestos por primera vez al laberinto (Roman, 2006).

Se analizaron diferentes parámetros como la cantidad de visitas totales a las diferentes regiones, tiempo de permanencia en cada una de ellas y la cantidad de transiciones entre sectores en los 4 bloques de 5 minutos de duración de la sesión. En la Figura 24 se muestra la cantidad de visitas totales a lo largo de la sesión de exploración. Contrariamente a lo que se podría esperar, los adultos realizaron un número mayor de visitas a las diferentes zonas, lo que evidencia una mayor actividad exploratoria que los adolescentes.

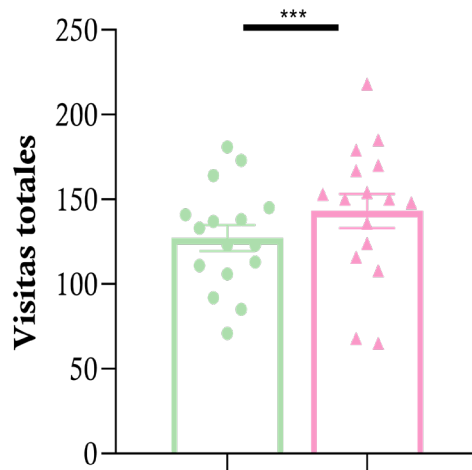


Figura 24. Visitas totales a todas las zonas para los dos grupos. Cantidad de visitas a todas las zonas para ratas adolescentes (N=16, ●) y ratas adultas (N=16, ▲). Los datos se presentan como media ± error estándar, *** $p < 0,0001$ test de t.

Como se observa en la Figura 25, si bien existen diferencias entre bloques, es decir, la cantidad de visitas varía a medida que transcurre la sesión, por lo que el animal va modificando su comportamiento a medida que transcurre la sesión, pero no se observan diferencias significativas entre edades. Los adolescentes comienzan haciendo un menor número de transiciones que los adultos (menor actividad exploratoria) y el bloque 2 es el de mayor actividad exploratoria. En cambio, los adultos presentaron mayor actividad exploratoria en los bloques 1 y 4 (inicio y final de la sesión).

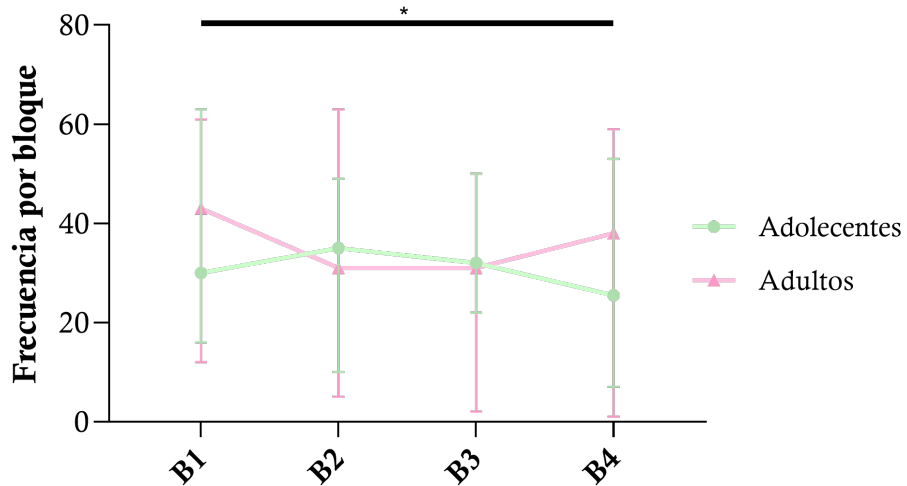


Figura 25. Frecuencia por bloque. Cantidad de visitas por cada bloque de tiempo de 5 minutos para ratas adolescentes (N=16, ●) y ratas adultas (N=16, ▲) en cada una de las zonas del Laberinto Multivariado Concéntrico. Los datos se presentan como media ± error estándar. *p<0,01 factor tiempo, Anova de dos vías de Medidas Repetidas. No se observan diferencias significativas en la interacción y en la edad.

En la Figura 26 se muestra el tiempo total de permanencia en cada una de las regiones para los dos grupos. Podemos observar que, a grandes rasgos, no hay diferencias significativas en el patrón de exploración de adolescentes y adultos. Hallamos que los adolescentes permanecieron más tiempo en la rampa, un sector que típicamente se asocia a la evaluación de riesgos.

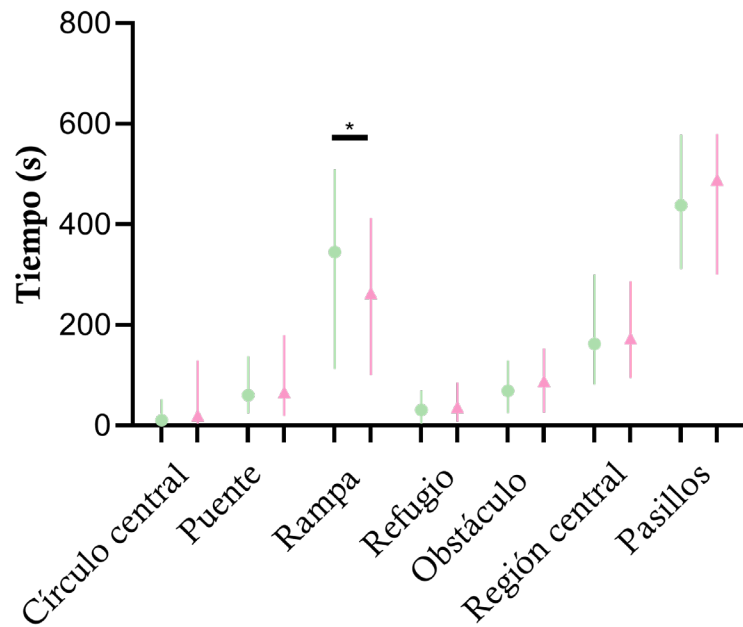


Figura 26. Tiempo empleado en cada una de las regiones presentes en el Laberinto Multivariado Concéntrico. Cuánto tiempo estuvieron ratas adolescentes (N=16,(●)) y ratas adultas (N=16, ▲) en cada una de las zonas del Laberinto Multivariado Concéntrico. Los datos se presentan como mediana ± error estándar.* $p < 0.010$ Test de Mann-Whitney (Test de t pareado no paramétrico).

En resumen, la actividad exploratoria en el LCM es similar entre adolescentes y adultos. No hallamos indicadores que avalen que los adolescentes muestran una preferencia por la toma de riesgos.

Discusión

En este trabajo de investigación, analizamos el comportamiento impulsivo en ratas Long Evans adolescentes y adultas, utilizando una tarea recompensada auto-iniciada. En este paradigma, los animales debían aprender a realizar una secuencia de lengüetazos oportunamente. La ejecución de esta secuencia de acciones les permite acceder a una gota de agua como recompensa si es realizada en el momento adecuado.

Las recompensas tienen influencia sobre una amplia gama de conductas, desde el control de las funciones vegetativas hasta la organización de comportamientos voluntarios dirigidos a metas. El control del comportamiento requiere la extracción de información de recompensa de una amplia variedad de estímulos y eventos. Esta información se refiere a la presencia y valores de las recompensas, su predictibilidad y accesibilidad, y los numerosos métodos y costos asociados con su obtención (Schultz 2000).

La tarea ya había sido utilizada previamente en el laboratorio en experimentos de electrofisiología, para estudiar la codificación del estriado dorsal durante la ejecución de la secuencia de acciones (Martínez et al. 2022) en estos experimentos se utilizaron únicamente ratas Long Evans macho y se observaron diferencias en el comportamiento de los animales relacionadas con la edad.

Considerando que actualmente la mayoría de las pruebas experimentales se realizan solamente con ratas adultas y hay pocos estudios en adolescentes (Lynn y Brown 2010) y sumado a que en general aunque en estudios biomédicos se incorporaron hembras humanas no es así en animales donde existe un gran sesgo sexual en la investigación (Beery y Zucker 2011) decidimos ampliar los resultados previos entrenando ratas de ambos grupos etarios y sexos. En concordancia con el trabajo anterior, se observaron diferencias conductuales en la tarea recompensada entre adolescentes y adultos. Las ratas adolescentes de ambos sexos realizan un mayor número de entradas prematuras en función de los ensayos totales para la obtención de una recompensa.

Si comparamos las curvas de aprendizaje de ambos grupos, podemos notar que presentan una tendencia similar, lo que muestra que tanto adolescentes como adultos son capaces de hacer los ensayos. A medida que van pasando las sesiones, los animales aumentan los ensayos realizados a tiempo con secuencia y disminuyen los ensayos a tiempo sin secuencia. Lo mismo ocurre con los ensayos realizados en el tiempo establecido. En ambos grupos, se llega a un *plateau*, lo que sugiere que añadir más sesiones no afectaría los

resultados obtenidos (Figura 5,6). Sin embargo, la diferencia fundamental que se observa en las curvas de aprendizaje y es uno de los puntos centrales de este estudio es que, a pesar de que se reducen los ensayos prematuros, los adolescentes siguen cometiendo un mayor número de entradas prematuras incluso en etapas avanzadas del aprendizaje (Figura 5).

Para caracterizar en profundidad el aprendizaje de la tarea, evaluamos diferentes parámetros del desempeño de los animales. Estudiamos la cantidad de recompensas obtenidas por minuto (Figura 7) y observamos que tanto adolescentes como adultos logran un mayor número de recompensas en la etapa tardía del entrenamiento. Esto muestra que aprenden la tarea y mejoran con la práctica. No se observan diferencias entre grupos, por lo que, los adolescentes a pesar de realizar un mayor número de ensayos prematuros, aprenden a obtener la recompensa y alcanzan una performance comparable a la de los adultos.

Si nos centramos en la ejecución de la secuencia, observamos que en ambos casos mejoran con el entrenamiento. Los animales realizan un mayor porcentaje de secuencias tanto para los ensayos a tiempo como para los ensayos prematuros (Figuras 8 y 9) a medida que avanzan las sesiones y esto no difiere entre edades.

En relación al *timing* de la ejecución de la secuencia, hallamos las diferencias entre edades. La pendiente de la curva es mayor en los adolescentes con respecto a los adultos, por lo que a menor tiempo de espera tiene un mayor porcentaje de ensayos acumulados (Figura 10). Es importante destacar que los ensayos son auto-iniciados, es decir que los animales deben estimar el tiempo transcurrido entre ensayos al comenzar la secuencia de lengüetazos. Al analizar la cantidad de ensayos prematuros (con y sin secuencia) que los animales realizan en función de la cantidad de recompensas obtenidas, vemos que en ambos grupos, a medida que avanzan en el entrenamiento, disminuyen este tipo de entradas, aunque significativamente los adolescentes tienen mayores entradas prematuras que los adultos (Figura 11). Si analizamos únicamente los ensayos prematuros con secuencia en función de las recompensas, podemos observar la misma tendencia, los adolescentes conservan un número alto de ensayos prematuros aún en la etapa tardía del entrenamiento (Figura 12).

Entonces, se observa que los adolescentes realizan una mayor cantidad de entradas prematuras para obtener la misma cantidad de recompensas. A partir de estos resultados, se puede inferir que este comportamiento no se debe a dificultades para ejecutar la secuencia en sí, sino más bien a una dificultad para estimar el tiempo de espera. La percepción de que el tiempo pasa demasiado lento se asocia con un costo percibido elevado, lo que lleva a la elección de alternativas que ofrecen resultados más inmediatos (Wallin, Alves, y Wood 2015).

En trabajos previos se vió que las ratas prefieren una recompensa grande de comida a una más pequeña. Ahora bien, esta recompensa se vuelve menos deseable si se le impone un costo, como un retraso o un requisito de esfuerzo (Wallin, Alves, y Wood 2015). Para resistir los impulsos y buscar una gratificación más tardía, es necesario persistir en comportamientos orientados por metas para lograr resultados positivos en el futuro. Las recompensas futuras (obtenidas luego de cierto tiempo de espera) se perciben subjetivamente como menos valiosas debido al retraso en su obtención (Wittmann y Paulus 2008). Esto plantea preguntas sobre si existe una valoración diferencial de la recompensa, lo que resultaría en tiempos de espera más cortos, o si esta impulsividad es una respuesta comportamental a una actividad locomotora excesiva.

Por otro lado, surge el interrogante de si este comportamiento impulsivo dificulta el proceso de aprendizaje al alterar la consolidación de un hábito. Incluso, se plantea la posibilidad de que los adolescentes tengan dificultades para formar memorias, lo cual podría manifestarse en un comportamiento repetitivo. En consecuencia, surge la pregunta de si los adolescentes y los adultos aprenden de la misma manera. Estas cuestiones son importantes para profundizar en la comprensión de los factores subyacentes al comportamiento de los adolescentes en relación con la ejecución de la tarea, la impulsividad y el aprendizaje.

Basándonos en el conocimiento de que la toma de decisiones en adolescentes varía según el contexto en el cual un animal aprende acerca de diferentes patrones de relación entre variables ambientales (Lloyd y Leslie 2013) y que las elecciones de los mismos pueden ser más o menos riesgosas dependiendo de la tarea estudiada, evaluamos el comportamiento en otros paradigmas. Esto nos brinda una visión más amplia de cómo es el desempeño de los animales en diferentes tareas y por lo tanto encontrar una posible explicación a estas diferencias en impulsividad observadas en la tarea recompensada. Por ese motivo, los animales además fueron entrenados en otros paradigmas conductuales cuando estaban en etapas avanzadas de la tarea recompensada.

Existe la posibilidad de que la actividad en el CA de los adolescentes sea marcadamente superior a la de los adultos. En ese caso, podríamos hipotetizar que la predisposición de los adolescentes a realizar más ensayos prematuros está asociada a una exacerbada actividad locomotora. Es conocido que los adolescentes se destacan por un aumento en la toma de riesgos, que abarca una variedad de comportamientos, incluyendo un aumento en los comportamientos locomotores y niveles altos de ansiedad (Spear 2000). Inclusive, algunos estudios informaron una actividad locomotora más alta de las ratas

adolescentes y un comportamiento más exploratorio en comparación con ratas adultas (Philpot y Wecker 2008).

En el CA, observamos que los animales de ambos grupos habitúan dentro de la sesión y muestran habituación a las 24 horas, por lo que presentan memoria de largo término (Figuras 13,14,15). La única diferencia observable entre ambos grupos se dió en el primer minuto de entrenamiento, donde contrariamente a lo esperado, los adultos realizaron un mayor número de cruces que los adolescentes. Esto puede deberse a una evaluación de riesgo por parte de los adolescentes, y por lo tanto, un mayor miedo, ya que realizaron una mayor respuesta de *freezing* que los adultos al colocarlos en la arena experimental. En conclusión, no se observan diferencias entre adolescentes y adultos por lo que la actividad locomotora, ambos grupos disminuyen los cruces totales en el entrenamiento y testeo, como así también disminuyen la exploración activa observada con los *rearings* (Figura 16). No existen diferencias significativas en la habituación de ambos grupos para los cruces ni para los *rearings*, por lo que se descarta como un factor diferencial de comportamiento entre ambos grupos (Figura 17,18). Además, no se observan diferencias entre macho y hembra entre ambos grupos a diferencia de lo que se observa en otros trabajos de campo abierto donde las hembras adolescentes presentan mayor actividad locomotora en pruebas sociales y no sociales relacionado con la ansiedad. (Scholl et al. 2019). También se vieron diferencias en experimentos donde se realizan pruebas en protocolos de aprendizaje y memoria, donde las hembras responden de manera más activa en paradigmas de condicionamiento y presentan cierta disminución en pruebas de memoria espacial en comparación con los machos (Simpson y Kelly 2012). Incluso en trabajos de estudio de ansiedad como el de (Lynn y Brown 2010) vieron que la locomoción aumentaba con la edad. Por lo que nuestros resultados se inclinan más a lo observado en un reciente paper publicado, donde sugieren que es poco probable que el aumento de las elecciones de tipo impulsivas se deba a alteraciones en la motivación o en la actividad locomotora (Cavallaro et al. 2023).

Así, descartamos el factor locomotor como posible explicación de las diferencias observadas en impulsividad. Además, sabiendo que la locomoción inducida por la novedad y la exploración de objetos nuevos representan medidas distintas de la respuesta a la novedad (Philpot y Wecker 2008) estudiamos la memoria de largo término de reconocimiento de objetos en el laberinto en forma de Y. Este paradigma permite evaluar una memoria de largo término sin tener a la actividad locomotora como variable de peso en el entrenamiento, además no requiere motivación externa, recompensa o castigo, aunque se requiere un poco de

entrenamiento o habituación, y se puede completar en un tiempo relativamente corto (Silvers et al. 2007).

En el laberinto en Y el animal puede moverse sobre su eje, pero no tiene espacio para realizar una exploración del ambiente que lo rodea. En el día de entrenamiento, se le presentaron dos objetos iguales y no se encontraron diferencias entre el tiempo de exploración de cada objeto (Figura 19 y 20) por lo que no existe una diferencia debida a la ubicación de los objetos o ya sea por una diferencia no observable por el humano pero que pueda ser percibida por el animal. Luego al día siguiente cuando se le presentó un objeto novedoso y un objeto familiar, en ambos grupos hallamos un índice de preferencia significativo (Figuras 21, 22, 23). Es decir, los animales recuerdan el objeto familiar y exploran el objeto novedoso en el día de testeo, por lo que forman memorias de reconocimiento de largo término. La preferencia por un objeto novedoso indica que la presentación del objeto familiar existe en la memoria de los animales (Ennaceur 2010). Por otro lado, se sabe que el sistema dopaminérgico sufre una importante reorganización durante la adolescencia y que los receptores de dopamina están involucrados en la memoria de reconocimiento (Sinani et al. 2022) y que por lo tanto, los adolescentes presentan una mayor atracción por la novedad y en consecuencia reconocimiento de objetos como se observó en (Silvers et al. 2007) donde los adolescentes mostraron niveles de actividad más altos en un entorno novedoso, se acercaron más rápidamente a un objeto novedoso en un entorno familiar y pasaron más tiempo con un objeto novedoso en comparación con los adultos. Incluso se observó que las ratas adultas muchas veces se comportaron como si los objetos novedosos fueran familiares, en lugar de tratar a los objetos familiares como novedoso (Antunes y Biala 2012).

Por último, habiendo descartado dos factores importantes como la formación de memoria de largo término de un lugar o un objeto y no habiendo hallado diferencias en la actividad motora, estudiamos la preferencia por el riesgo como posible causa a la impulsividad. La toma de riesgos y la búsqueda de novedades son características del comportamiento típico de los adolescentes, buscan nuevas experiencias y niveles más altos de estimulación gratificante y, a menudo, se involucran en conductas de riesgo, sin considerar los resultados o las consecuencias futuras (Kelley, Schochet, y Landry 2004). Es por ello que son un factor primario que contribuye al aumento de lesiones y mortalidad (Bishnoi, Ossenkopp, y Kavaliers 2021). Otra visión interesante sobre la toma de riesgos de los adolescentes podría ser que la propensión a correr riesgos no se debe a diferencias de edad en la percepción o valoración del riesgo sino a diferencias de edad en factores neurológicos que influyen en la autorregulación de su comportamiento (Steinberg 2008). Aunque existen

diferentes propuestas que expliquen los comportamientos observados, tanto en humanos como en ratas, se observa una tendencia a la mayor toma de riesgos en adolescentes con respecto a los adultos.

Utilizamos el laberinto concéntrico multivariado, una arena que presenta diferentes zonas, siendo algunas de ellas más asociadas al riesgo y otras a la búsqueda de refugio (Lundberg, Högman, y Roman 2019). En el LCM el animal puede explorar libremente un ambiente de características diversas. La libertad de acción del animal al poder elegir diferentes contextos novedosos contribuyen a un análisis más rico y un acercamiento más completo a su comportamiento. En la bibliografía está reportado que los adolescentes tienen un mayor número de entradas en áreas iluminadas (Áreas consideradas de riesgo) en comparación con los adultos y que por lo tanto, las ratas adolescentes parecen tener una evaluación de riesgo más baja que las adultas (Arrant, Schramm-Sapyta, y Kuhn 2013). También se ha postulado que el rendimiento de los adolescentes difiere considerablemente que el de los adultos, siendo que los más jóvenes tienen menor evaluación del riesgo (Lundberg, Högman, y Roman 2019). Aquí, los adultos realizaron un número significativamente mayor de visitas totales a las diferentes áreas (Figura 24) aunque no se observan diferencias en cuanto a la habituación al laberinto (Figura 25). Por otro lado, sólo hallamos que los adolescentes pasan más tiempo que los adultos en la rampa del LCM (Figura 26). Según los trabajos del grupo pionero en el uso del LCM (Meyerson et al. 2006) y avalado por otros trabajos tales como (Lundberg, Högman, y Roman 2019; Sturman y Moghaddam 2011), la rampa está asociada a la evaluación de riesgos ya que, a través de la misma, los animales pueden ingresar al puente, que es aversivo. Este hallazgo inesperado puede atribuirse a la ubicación espacial del laberinto y la colocación del sujeto experimental. La puerta de acceso al cuarto donde se encuentra el laberinto se encuentra en dirección opuesta al lugar donde se encuentra el experimentador. Esto significa que la rampa se encuentra más lejos del humano, lo que puede hacer que los animales, independientemente de su rango de edad, la perciban como un refugio. Estos resultados sugieren que el tiempo que los adolescentes pasan en la zona de evaluación de riesgos puede estar influenciado por la ubicación física del laberinto en relación con la proximidad del experimentador. Es importante considerar este factor al interpretar las diferencias observadas en el comportamiento de los animales.

En el estudio de esta tarea hasta el día de hoy se habían presentado resultados en adultos, machos y hembras (Meyerson et al. 2006), en adolescentes macho (Lundberg, Högman, y Roman 2019) y adolescentes macho y hembras (Gore-Langton, Werner, y Spear 2021). Además, en las caracterizaciones de la conducta en el LCM realizadas por otros

grupos de investigación se han descrito dos perfiles de exploración opuestos en ratas adolescentes: por un lado, los exploradores y por otro, los llamados buscadores de refugio. Esta distinción en las categorías de toma y evaluación de riesgos probablemente se debe a los niveles generalmente más altos de toma de riesgos e impulsividad en la adolescencia. Esta diferenciación entre grupos adolescentes (exploradores-no exploradores) no se vio entre adultos (Lundberg, Högman, y Roman 2019). En nuestro caso, no se encontraron diferencias entre grupos de adolescentes, pero puede deberse a que utilizamos una menor cantidad de sujetos experimentales con respecto a la bibliografía. Además, si bien estudios preclínicos en ratas también han identificado diferencias de género en las preferencias de riesgo que pueden estar relacionadas con las hormonas sexuales (Islas-Preciado et al. 2020), en nuestro caso, tampoco encontramos diferencias significativas entre sexos.

A lo largo de esta tesis de licenciatura, se ha destacado y hecho énfasis en que la adolescencia como un proceso de transformación crucial en el que aprendemos a controlar nuestras emociones, desarrollamos nuestras habilidades físicas y cognitivas, y consolidamos nuestras habilidades sociales y sexuales. Durante esta etapa, también adquirimos mayor autonomía, independencia y responsabilidad, junto con las herramientas necesarias para convertirnos en adultos (Crews et al. 2016). Es importante tener en cuenta que la búsqueda de sensaciones, que se manifiesta como una forma de impulsividad, experimenta un aumento significativo durante la adolescencia (Romer 2010). Inclusive, los modelos neurocognitivos del desarrollo del cerebro adolescente han sugerido que la asunción de riesgos y la toma de decisiones en los adolescentes están impulsadas por una mayor activación del sistema de recompensa neural durante la adolescencia, centrándose especialmente en el estriado ventral (Van Duijvenvoorde et al. 2016). A nivel neuronal se dan interacciones únicas entre sistemas de procesamiento como la corteza prefrontal, estriatal y otras estructuras que le dan valor a los estímulos y las acciones, donde ocurren los procesos que participan de la toma de decisiones (Hartley y Somerville 2015).

El comportamiento arriesgado puede tener costos individuales y sociales sustanciales, pero en algunos casos una mayor toma de riesgos podría ser una característica adaptativa, que puede ser particularmente prominente en la adolescencia (Crone y Dahl 2012). Por ejemplo, al explorar nuevos entornos, asumir un riesgo desconocido puede conllevar varios beneficios. Pero también, estos comportamientos arriesgados, pueden conllevar al abuso de drogas y adicciones, así como enfermedades mentales como la esquizofrenia, el trastorno por déficit de atención e hiperactividad, y los trastornos del estado de ánimo y de la alimentación (Philpot y Wecker 2008). Estos comportamientos están relacionados con una serie de cambios

neurobiológicos como se mencionó anteriormente, incluidos los hormonales (Sisk y Zehr 2005), como así también los relacionados con la capacidad cognitiva y motivacional (Doremus-Fitzwater, Varlinskaya, y Spear 2010). Por tanto, es de vital importancia el estudio de esta etapa de la vida en todas las dimensiones y puntos de vista posibles, para comprender las causas subyacentes de los comportamientos observados.

En relación a las diferencias encontradas en el comportamiento, se puede inferir que estas pueden ser atribuidas a las disparidades en el estriado dorsal, que desempeña un papel crucial en las tareas recompensadas (Burton, Nakamura, y Roesch 2015). Sin embargo, no se han identificado diferencias significativas entre edades en las tareas dependientes de otras estructuras cerebrales. Esto podría estar reflejando un menor control proveniente de la corteza medial prefrontal hacia el estriado, que codifica el aprendizaje dependiente del contexto y recompensa, incorporando señales motivacionales, de control y contextuales (Somerville et al. 2013) o, bien, por diferencias en el desarrollo de la corteza orbito-frontal, donde se recopila información y se llevan a cabo los eferentes en el núcleo accumbens que guía los comportamientos dirigidos a la recompensa (Loh y Rosenkranz 2022).

En conclusión, en este trabajo de investigación hemos abordado la caracterización del aprendizaje y la conducta impulsiva en ratas adolescentes y adultas en una tarea recompensada auto-iniciada. Aunque nuestros resultados no brindan una explicación definitiva para las conductas impulsivas observadas en las ratas adolescentes, hemos descartado ciertos aspectos que no parecen estar influyendo en la generación de este comportamiento. La impulsividad de acción que observamos en las ratas adolescentes no parece estar relacionada con una actividad locomotora exacerbada, una preferencia por el riesgo o una falta de formación de memorias a largo plazo. Un resultado similar ha sido descrito recientemente en relación a la impulsividad de elección en una tarea de “delay discounting” y la exploración de un CA (Cavallaro et al. 2023) Por eso, se podría pensar que la impulsividad es un rasgo de la personalidad en sí mismo que no guarda una relación inequívoca con otros indicadores de aprendizaje (Elliott et al. 2023; Klinteberg, Von Knorring, y Orelan 2004). Hay diferentes evidencias, a favor y en contra de la asociación entre impulsividad y otros aspectos del aprendizaje. Las revisiones del tema apuntan a que la impulsividad está relacionada con la toma de decisiones de riesgo, aunque los indicadores pueden variar en función de las tareas analizadas y los parámetros empleados para evaluar el riesgo (Elliott y col., 2023).

Por último, no encontramos diferencias entre los sexos en ambos grupos etarios. Sin embargo, para obtener conclusiones más sólidas en relación al papel del sexo, estimamos que deberíamos duplicar el tamaño de la muestra. No podemos descartar que no haya diferencias entre las acciones y elecciones impulsivas entre sexos, donde muchas veces la magnitud y la dirección de las conductas varían en función de la influencia de factores hormonales (Weafer y De Wit 2014). De todas formas, la inclusión de ambos sexos en nuestro estudio enriquece los resultados al introducir variabilidad y, al tratarse de sujetos experimentales animales, promovemos el uso responsable de los animales y cumplimos con los principios de las 3R (reducción, refinamiento y reemplazo) (Hampshire y Gilbert 2019).

En resumen, este estudio proporciona información importante sobre las diferencias en el aprendizaje y la conducta impulsiva entre ratas adolescentes y adultas. Próximamente evaluaremos la participación de diversas estructuras cerebrales en las respuestas impulsivas con experimentos de farmacología. Aunque aún hay aspectos por explorar, nuestros resultados contribuyen al conocimiento general y abren puertas para investigaciones futuras sobre las bases de la impulsividad de acción.

Agradecimientos

Para finalizar este trabajo de investigación, considero fundamental expresar mi más profundo agradecimiento a todas las personas que hicieron posible que logre llegar hasta acá.

En primer lugar, quiero agradecer a mi directora, Cecilia, quien me acompañó en este camino durante los últimos 4 años. Desde el inicio, me brindó innumerables herramientas no solo para el desarrollo de esta tesis sino también para mi formación como estudiante y futura profesional. Gracias por confiar en mí para este trabajo. Quiero extender mi agradecimiento al hermoso grupo del IFIBIO, quienes siempre estuvieron dispuestos a ayudarme y a brindarme palabras de aliento.

También quiero expresar mi agradecimiento a cada docente de la FCEN con quien tuve la suerte de compartir clases, quienes me transmitieron su pasión por la ciencia y por el conocimiento, dejando una marca en mi formación como futura bióloga. Sus enseñanzas y experiencias fueron fundamentales en mi desarrollo académico y personal, motivándome a seguir adelante en este desafiante camino de la biología y las neurociencias. También quiero agradecer a la Universidad de Buenos Aires por brindarme una educación excepcional y por permitirme estudiar la carrera que desde chica soñé.

En el ámbito personal, las palabras nunca serán suficientes para agradecer a mis papás Mario y Patricia y a mi hermano Adrián, por su amor, su dedicación y su esfuerzo. Por compartir los triunfos y por alentarme en los momentos que todo se hacía cuesta arriba. Hicieron lo imposible para hacerme el camino más fácil y sin ustedes no habría llegado hasta este momento. Todo lo que logré a lo largo de mi vida, cada éxito y cada pequeño logro, también es mérito suyo. Ellos son mi razón de ser, mi vida entera, y no hay forma suficiente de retribuirles todo lo que han hecho por mí. Gracias por soplar fuerte para que yo pueda volar.

A mi familia, por compartir cada uno de mis logros y acompañarme en cada frustración: A mis abuelas Susana y Haydee, por su incondicionalidad y por sus abrazos cargados de amor. A mi madrina Sol, por siempre entenderme y decirme las palabras que necesitaba escuchar. A mis sobrinas, Valen, Agos y Emi, por entender a pesar de su corta edad, cuando no podía dedicarles tiempo y cuando tenía que ir a ver a "las ratis". A mis primas, primos, tías y tíos, mi cuñada, a mis suegros y a Adriana por acompañarme en mi crecimiento y siempre estar a mi lado.

Una mención especial a Juani, mi novio, con quien crecí y compartí todas las etapas de este camino. Gracias por acompañarme, siempre. Fuiste un pilar fundamental.

No puedo dejar de hacer mención a mis amigos del alma, tanto mis hermanos de la vida, como quienes tuve la suerte de conocer a lo largo de la carrera y se volvieron imprescindibles, quienes han celebrado cada pequeño paso de este proceso como si fuera propio y por estar siempre al lado mío. Y por último, quiero hacer un pequeño reconocimiento a mi perra, Ellie, mi compañera de estudio en las noches, ella ha sido mi aliada en los momentos de descanso, compartiendo conmigo esos preciados recreos de estudio que me ayudan a desconectar.

Familia y amigos: A todos y cada uno, gracias por siempre hacerme sentir que estaban orgullosos de mí y por ser siempre justo lo que necesitaba en cada preciso momento. Cada uno de ustedes dejó una huella imborrable en mi camino y no tengo palabras suficientes para expresar lo agradecida que estoy por su presencia en mi vida, soy muy afortunada. Les dedico esta tesis, producto de mucho esfuerzo y dedicación, por todo lo que hicieron por mí.

Referencias Bibliográficas

- Ameen-Ali, K.E., A. Easton, y M.J. Eacott. 2015. «Moving beyond Standard Procedures to Assess Spontaneous Recognition Memory». *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 53 (junio): 37-51. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2015.03.013>.
- Antunes, M., y G. Biala. 2012. «The Novel Object Recognition Memory: Neurobiology, Test Procedure, and Its Modifications». *Cognitive Processing* 13 (2): 93-110. <https://doi.org/10.1007/s10339-011-0430-z>.
- Arrant, Andrew E., Nicole L. Schramm-Sapyta, y Cynthia M. Kuhn. 2013. «Use of the Light/Dark Test for Anxiety in Adult and Adolescent Male Rats». *Behavioural Brain Research* 256 (noviembre): 119-27. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.05.035>.
- Baker, Kathryn D., Madelyne A. Bisby, y Rick Richardson. 2016. «Impaired Fear Extinction in Adolescent Rodents: Behavioural and Neural Analyses». *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 70 (noviembre): 59-73. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.05.019>.
- Baker, Phillip M., y Michael E. Ragozzino. 2014. «Contralateral Disconnection of the Rat Prelimbic Cortex and Dorsomedial Striatum Impairs Cue-Guided Behavioral Switching». *Learning & Memory* 21 (8): 368-79. <https://doi.org/10.1101/lm.034819.114>.
- Baram, Tallie Z., Flavio Donato, y Gregory L. Holmes. 2019. «Construction and Disruption of Spatial Memory Networks during Development». *Learning & Memory* 26 (7): 206-18. <https://doi.org/10.1101/lm.049239.118>.
- Bari, Andrea, y Trevor W. Robbins. 2013. «Inhibition and Impulsivity: Behavioral and Neural Basis of Response Control». *Progress in Neurobiology* 108 (septiembre): 44-79. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.06.005>.
- Beery, Annaliese K., y Irving Zucker. 2011. «Sex Bias in Neuroscience and Biomedical Research». *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 35 (3): 565-72. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2010.07.002>.
- Bevins, Rick A, y Joyce Besheer. 2006. «Object Recognition in Rats and Mice: A One-Trial Non-Matching-to-Sample Learning Task to Study "Recognition Memory"». *Nature Protocols* 1 (3): 1306-11. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.205>.
- Bishnoi, Indra R., Klaus-Peter Ossenkopp, y Martin Kavaliers. 2021. «Sex and Age Differences in Locomotor and Anxiety-like Behaviors in Rats: From Adolescence to Adulthood». *Developmental Psychobiology* 63 (3): 496-511. <https://doi.org/10.1002/dev.22037>.

- Broche-Pérez, Y., L.F. Herrera Jiménez, y E. Omar-Martínez. 2016. «Bases neurales de la toma de decisiones». *Neurología* 31 (5): 319-25.
<https://doi.org/10.1016/j.nrl.2015.03.001>.
- Bunsey, M., y Howard Eichenbaum. 1996. «Conservation of Hippocampal Memory Function in Rats and Humans». *Letters to Nature* 379 (11794-2575): 255-57.
<http://dx.doi.org/10.1038/379255a0>.
- Burn, Charlotte C. 2008. «What Is It like to Be a Rat? Rat Sensory Perception and Its Implications for Experimental Design and Rat Welfare». *Applied Animal Behaviour Science* 112 (1-2): 1-32. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2008.02.007>.
- Burton, Amanda C., Kae Nakamura, y Matthew R. Roesch. 2015. «From Ventral-Medial to Dorsal-Lateral Striatum: Neural Correlates of Reward-Guided Decision-Making». *Neurobiology of Learning and Memory* 117 (enero): 51-59.
<https://doi.org/10.1016/j.nlm.2014.05.003>.
- Cardinal, Rudolf N., John A. Parkinson, Jeremy Hall, y Barry J. Everitt. 2002. «Emotion and Motivation: The Role of the Amygdala, Ventral Striatum, and Prefrontal Cortex». *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 26 (3): 321-52.
[https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(02\)00007-6](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(02)00007-6).
- Carelli, Regina M., Stephanie G. Ijames, y Alison J. Crumling. 2000. «Evidence That Separate Neural Circuits in the Nucleus Accumbens Encode Cocaine Versus “Natural” (Water and Food) Reward». *The Journal of Neuroscience* 20 (11): 4255-66.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-11-04255.2000>.
- Cavallaro, Julianna, Jenna Yeisley, Başak Akdoğan, Ronald E. Salazar, Joseph R. Floeder, Peter D. Balsam, y Eduardo F. Gallo. 2023. «Dopamine D2 receptors in nucleus accumbens cholinergic interneurons increase impulsive choice». *Neuropsychopharmacology*, mayo. <https://doi.org/10.1038/s41386-023-01608-1>.
- Chao, Owen Y., Susanne Nikolaus, Yi-Mei Yang, y Joseph P. Huston. 2022. «Neuronal Circuitry for Recognition Memory of Object and Place in Rodent Models». *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 141 (octubre): 104855.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2022.104855>.
- Crews, Fulton T., Ryan P. Vetreno, Margaret A. Broadwater, y Donita L. Robinson. 2016. «Adolescent Alcohol Exposure Persistently Impacts Adult Neurobiology and Behavior». Editado por Leslie A. Morrow. *Pharmacological Reviews* 68 (4): 1074-1109. <https://doi.org/10.1124/pr.115.012138>.
- Crone, Eveline A., y Ronald E. Dahl. 2012. «Understanding Adolescence as a Period of Social–Affective Engagement and Goal Flexibility». *Nature Reviews Neuroscience* 13

- (9): 636-50. <https://doi.org/10.1038/nrn3313>.
- Crystal, Jonathon D., y Alexandra E. Smith. 2014. «Binding of Episodic Memories in the Rat». *Current Biology* 24 (24): 2957-61. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.10.074>.
- Dahl, Ronald E. 2004. «Adolescent Brain Development: A Period of Vulnerabilities and Opportunities. Keynote Address». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1021 (1): 1-22. <https://doi.org/10.1196/annals.1308.001>.
- De Houwer, Jan, Dermot Barnes-Holmes, y Agnes Moors. 2013. «What Is Learning? On the Nature and Merits of a Functional Definition of Learning». *Psychonomic Bulletin & Review* 20 (4): 631-42. <https://doi.org/10.3758/s13423-013-0386-3>.
- De Landeta, Ana Belén, Magdalena Pereyra, Jorge H. Medina, y Cynthia Katche. 2020. «Anterior Retrosplenial Cortex Is Required for Long-Term Object Recognition Memory». *Scientific Reports* 10 (1): 4002. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60937-z>.
- Di Chiara, Gaetano. 1999. «Drug Addiction as Dopamine-Dependent Associative Learning Disorder». *European Journal of Pharmacology* 375 (1-3): 13-30. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(99\)00372-6](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(99)00372-6).
- Doremus-Fitzwater, Tamara L., y Linda P. Spear. 2016. «Reward-Centricity and Attenuated Aversions: An Adolescent Phenotype Emerging from Studies in Laboratory Animals». *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 70 (noviembre): 121-34. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.08.015>.
- Doremus-Fitzwater, Tamara L., Elena I. Varlinskaya, y Linda P. Spear. 2010. «Motivational Systems in Adolescence: Possible Implications for Age Differences in Substance Abuse and Other Risk-Taking Behaviors». *Brain and Cognition* 72 (1): 114-23. <https://doi.org/10.1016/j.bandc.2009.08.008>.
- Eichenbaum, Howard. 2017. «The Role of the Hippocampus in Navigation Is Memory». *Journal of Neurophysiology* 117 (4): 1785-96. <https://doi.org/10.1152/jn.00005.2017>.
- Eichenbaum, Howard, y Neal J. Cohen. 2014. «Can We Reconcile the Declarative Memory and Spatial Navigation Views on Hippocampal Function?» *Neuron* 83 (4): 764-70. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.07.032>.
- Elliott, Matthew V., Sheri L. Johnson, Jennifer G. Pearlstein, Daniela E. Muñoz Lopez, y Hanna Keren. 2023. «Emotion-Related Impulsivity and Risky Decision-Making: A Systematic Review and Meta-Regression». *Clinical Psychology Review* 100 (marzo): 102232. <https://doi.org/10.1016/j.cpr.2022.102232>.
- Ennaceur, A. 2010. «One-Trial Object Recognition in Rats and Mice: Methodological and Theoretical Issues». *Behavioural Brain Research* 215 (2): 244-54.

- <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.12.036>.
- Fernández, Macarena Soledad, Fabio Bellia, Ana Ferreyra, Florencia Chiner, Ana María Jiménez García, Claudio D'Addario, y Ricardo Marcos Pautassi. 2020. «Short-Term Selection for High and Low Ethanol Intake during Adolescence Exerts Lingering Effects in Stress-Induced Ethanol Drinking and Yields an Anxiety-Prone Phenotype». *Behavioural Brain Research* 380 (febrero): 112445. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112445>.
- Foerde, Karin, Barbara J. Knowlton, y Russell A. Poldrack. 2006. «Modulation of Competing Memory Systems by Distraction». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (31): 11778-83. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602659103>.
- Frank, Darya, y Alex Kafkas. 2021. «Expectation-Driven Novelty Effects in Episodic Memory». *Neurobiology of Learning and Memory* 183 (septiembre): 107466. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2021.107466>.
- Gavornik, Jeffrey P., Marshall G. Hussain Shuler, Yonatan Loewenstein, Mark F. Bear, y Harel Z. Shouval. 2009. «Learning Reward Timing in Cortex through Reward Dependent Expression of Synaptic Plasticity». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (16): 6826-31. <https://doi.org/10.1073/pnas.0901835106>.
- Gore-Langton, Jonathan Kent, David Francis Werner, y Linda Patia Spear. 2021. «The Effects of Age, Sex, and Handling on Behavioral Parameters in the Multivariate Concentric Square Field™ Test». *Physiology & Behavior* 229 (febrero): 113243. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2020.113243>.
- Guyer, Amanda E., Jennifer S. Silk, y Eric E. Nelson. 2016. «The Neurobiology of the Emotional Adolescent: From the inside Out». *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 70 (noviembre): 74-85. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.07.037>.
- Hampshire, Victoria A., y Samuel H. Gilbert. 2019. «Refinement, Reduction, and Replacement (3R) Strategies in Preclinical Testing of Medical Devices». *Toxicologic Pathology* 47 (3): 329-38. <https://doi.org/10.1177/0192623318797289>.
- Hartley, Catherine A, y Leah H Somerville. 2015. «The Neuroscience of Adolescent Decision-Making». *Current Opinion in Behavioral Sciences* 5 (octubre): 108-15. <https://doi.org/10.1016/j.cobeha.2015.09.004>.
- Horvath, Paula, y Marvin Zuckerman. 1993. «Sensation Seeking, Risk Appraisal, and Risky Behaviour» 14 (1): 41-52. [https://doi.org/10.1016/0191-8869\(93\)90173-Z](https://doi.org/10.1016/0191-8869(93)90173-Z).
- Huertas, Marco A, Marshall Hussain Shuler, y Harel Z Shouval. 2013. «Plasticity of Network Dynamics as Observed Experimentally Requires Heterogeneity of the Network Connectivity Pattern». *BMC Neuroscience* 14 (S1): P360, 1471-2202-14-S1-P360.

- <https://doi.org/10.1186/1471-2202-14-S1-P360>.
- Islas-Preciado, Danna, Steven R. Wainwright, Julia Sniegocki, Stephanie E. Lieblich, Shunya Yagi, Stan B. Floresco, y Liisa A.M. Galea. 2020. «Risk-Based Decision Making in Rats: Modulation by Sex and Amphetamine». *Hormones and Behavior* 125 (septiembre): 104815. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2020.104815>.
- Kelley, Ann E., Terri Schochet, y Charles F. Landry. 2004. «Risk Taking and Novelty Seeking in Adolescence: Introduction to Part I». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1021 (1): 27-32. <https://doi.org/10.1196/annals.1308.003>.
- Klinterberg, Britt, Lars Von Knorring, y Lars Oreland. 2004. «Chapter 22. On the Psychobiology of Impulsivity» 429 (451). <https://doi.org/10.1016/B978-008044209-9/50023-3>.
- Knowlton, Barbara J., Alexander L.M. Siegel, y Teena D. Moody. 2017. «Procedural Learning in Humans ☆». En *Learning and Memory: A Comprehensive Reference*, 295-312. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809324-5.21085-7>.
- Lisman, John, György Buzsáki, Howard Eichenbaum, Lynn Nadel, Charan Ranganath, y A David Redish. 2017. «Viewpoints: How the Hippocampus Contributes to Memory, Navigation and Cognition». *Nature Neuroscience* 20 (11): 1434-47. <https://doi.org/10.1038/nn.4661>.
- Lloyd, Kevin, y David S. Leslie. 2013. «Context-Dependent Decision-Making: A Simple Bayesian Model». *Journal of The Royal Society Interface* 10 (82): 20130069. <https://doi.org/10.1098/rsif.2013.0069>.
- Loh, Maxine K, y J Amiel Rosenkranz. 2022. «Shifts in Medial Orbitofrontal Cortex Activity from Adolescence to Adulthood». *Cerebral Cortex* 32 (3): 528-39. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhab231>.
- Lundberg, Stina, Cecilia Högman, y Erika Roman. 2019. «Adolescent Exploratory Strategies and Behavioral Types in the Multivariate Concentric Square Field™ Test». *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 13 (marzo): 41. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00041>.
- Lynn, Debra A., y Gillian R. Brown. 2010. «The Ontogeny of Anxiety-like Behavior in Rats from Adolescence to Adulthood». *Developmental Psychobiology* 52 (8): 731-39. <https://doi.org/10.1002/dev.20468>.
- Mailly, Philippe, Verena Aliane, Henk J. Groenewegen, Suzanne N. Haber, y Jean-Michel Deniau. 2013. «The Rat Prefrontostriatal System Analyzed in 3D: Evidence for Multiple Interacting Functional Units». *The Journal of Neuroscience* 33 (13): 5718-27. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5248-12.2013>.

- Marquardt, Ashley E., Jonathan W. VanRyzin, Rebeca W. Fuquen, y Margaret M. McCarthy. 2023. «Social Play Experience in Juvenile Rats Is Indispensable for Appropriate Socio-Sexual Behavior in Adulthood in Males but Not Females». *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 16 (enero): 1076765. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2022.1076765>.
- Martinez, Maria Cecilia, Camila Lidia Zold, Marcos Antonio Coletti, Mario Gustavo Murer, y Mariano Andrés Belluscio. 2022. «Dorsal Striatum Coding for the Timely Execution of Action Sequences». *ELife* 11 (noviembre): e74929. <https://doi.org/10.7554/eLife.74929>.
- Mathiasen, Joanne R., y Amy DiCamillo. 2010. «Novel Object Recognition in the Rat: A Facile Assay for Cognitive Function». *Current Protocols in Pharmacology* 49 (1). <https://doi.org/10.1002/0471141755.ph0559s49>.
- Meyerson, Bengt J., Hanna Augustsson, Marita Berg, y Erika Roman. 2006. «The Concentric Square Field: A Multivariate Test Arena for Analysis of Explorative Strategies». *Behavioural Brain Research* 168 (1): 100-113. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2005.10.020>.
- Moncada, Diego, y Haydée Viola. 2006. «Phosphorylation State of CREB in the Rat Hippocampus: A Molecular Switch between Spatial Novelty and Spatial Familiarity?». *Neurobiology of Learning and Memory* 86 (1): 9-18. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2005.12.002>.
- Nyberg, Nils, Éléonore Duvelle, Caswell Barry, y Hugo J. Spiers. 2022. «Spatial Goal Coding in the Hippocampal Formation». *Neuron* 110 (3): 394-422. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.12.012>.
- Palm, Sara, Shima Momeni, Stina Lundberg, Ingrid Nylander, y Erika Roman. 2014. «Risk-Assessment and Risk-Taking Behavior Predict Potassium- and Amphetamine-Induced Dopamine Response in the Dorsal Striatum of Rats». *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 8 (julio). <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00236>.
- Panfil, Kelsey, Carrie Bailey, Ian Davis, Anne Mains, y Kimberly Kirkpatrick. 2020. «A Time-Based Intervention to Treat Impulsivity in Male and Female Rats». *Behavioural Brain Research* 379 (febrero): 112316. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112316>.
- Panoz-Brown, Danielle, Hannah E. Corbin, Stefan J. Dalecki, Meredith Gentry, Sydney Brotheridge, Christina M. Sluka, Jie-En Wu, y Jonathon D. Crystal. 2016. «Rats Remember Items in Context Using Episodic Memory». *Current Biology* 26 (20): 2821-26. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.08.023>.
- Pavlov, Ivan. 1927. «Conditioned reflexes: An investigation of the physiological activity of the

- cerebral cortex» 17 (3). <https://doi.org/10.5214/ans.0972-7531.1017309>.
- Philpot, Rex M., y Lynn Wecker. 2008. «Dependence of Adolescent Novelty-Seeking Behavior on Response Phenotype and Effects of Apparatus Scaling.» *Behavioral Neuroscience* 122 (4): 861-75. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.122.4.861>.
- Reber, Paul J. 2013. «The Neural Basis of Implicit Learning and Memory: A Review of Neuropsychological and Neuroimaging Research». *Neuropsychologia* 51 (10): 2026-42. <https://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2013.06.019>.
- Romer, Daniel. 2010. «Adolescent Risk Taking, Impulsivity, and Brain Development: Implications for Prevention». *Developmental Psychobiology*, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/dev.20442>.
- Roth, Kevin A., y Richard J. Katz. 1979. «Stress, Behavioral Arousal, and Open Field Activity—A Reexamination of Emotionality in the Rat». *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 3 (4): 247-63. [https://doi.org/10.1016/0149-7634\(79\)90012-5](https://doi.org/10.1016/0149-7634(79)90012-5).
- Scholl, Jamie L., Anum Afzal, Laura C. Fox, Michael J. Watt, y Gina L. Forster. 2019. «Sex Differences in Anxiety-like Behaviors in Rats». *Physiology & Behavior* 211 (noviembre): 112670. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2019.112670>.
- Schultz, Wolfram. 2000. «Multiple Reward Signals in the Brain». *Nature Reviews Neuroscience* 1 (3): 199-207. <https://doi.org/10.1038/35044563>.
- Shultz. 2015. «Neuronal Reward and Decision Signals: From Theories to Data». *Physiological Reviews* 95 (3): 853-951. <https://doi.org/10.1152/physrev.00023.2014>.
- Schultz. 2016. «Dopamine Reward Prediction-Error Signalling: A Two-Component Response». *Nature Reviews Neuroscience* 17 (3): 183-95. <https://doi.org/10.1038/nrn.2015.26>.
- Silvers, Janelle M., Steven B. Harrod, Charles F. Mactutus, y Rosemarie M. Booze. 2007. «Automation of the Novel Object Recognition Task for Use in Adolescent Rats». *Journal of Neuroscience Methods* 166 (1): 99-103. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2007.06.032>.
- Simpson, Joy, y John P. Kelly. 2012. «An Investigation of Whether There Are Sex Differences in Certain Behavioural and Neurochemical Parameters in the Rat». *Behavioural Brain Research* 229 (1): 289-300. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.12.036>.
- Sinani, Ada, Ada Mitsacos, Giota Tsotsokou, y Andriana Vassi. 2022. «Early Life Stress Influences Basal Ganglia Dopamine Receptors and Novel Object Recognition of Adolescent and Adult Rats», abril, 342-54. <https://doi.org/10.1016/j.ibneur.2022.04.008>.

- Sisk, Cheryl L., y Julia L. Zehr. 2005. «Pubertal Hormones Organize the Adolescent Brain and Behavior». *Frontiers in Neuroendocrinology* 26 (3-4): 163-74.
<https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2005.10.003>.
- Smith, Aaron P., Andrew T. Marshall, y Kimberly Kirkpatrick. 2015. «Mechanisms of Impulsive Choice: II. Time-Based Interventions to Improve Self-Control». *Behavioural Processes* 112 (marzo): 29-42. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2014.10.010>.
- Somerville, Leah H., Rebecca M. Jones, Erika J. Ruberry, Jonathan P. Dyke, Gary Glover, y B. J. Casey. 2013. «The Medial Prefrontal Cortex and the Emergence of Self-Conscious Emotion in Adolescence». *Psychological Science* 24 (8): 1554-62.
<https://doi.org/10.1177/0956797613475633>.
- Spear, L.P. 2000. «The Adolescent Brain and Age-Related Behavioral Manifestations». *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 24 (4): 417-63.
[https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(00\)00014-2](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(00)00014-2).
- Squire, Larry R. 2004. «Memory Systems of the Brain: A Brief History and Current Perspective». *Neurobiology of Learning and Memory* 82 (3): 171-77.
<https://doi.org/10.1016/j.nlm.2004.06.005>.
- Steinberg, Laurence. 2008. «A Social Neuroscience Perspective on Adolescent Risk-Taking». *Developmental Review* 28 (1): 78-106.
<https://doi.org/10.1016/j.dr.2007.08.002>.
- Sturman, David A., y Bitá Moghaddam. 2011. «The Neurobiology of Adolescence: Changes in Brain Architecture, Functional Dynamics, and Behavioral Tendencies». *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 35 (8): 1704-12.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.04.003>.
- Tannenbaum, Cara, Robert P. Ellis, Friederike Eyssel, James Zou, y Londa Schiebinger. 2019. «Sex and Gender Analysis Improves Science and Engineering». *Nature* 575 (7781): 137-46. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1657-6>.
- Van Duijvenvoorde, Anna C.K., Sabine Peters, Barbara R. Braams, y Eveline A. Crone. 2016. «What Motivates Adolescents? Neural Responses to Rewards and Their Influence on Adolescents' Risk Taking, Learning, and Cognitive Control». *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 70 (noviembre): 135-47.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.06.037>.
- Wallin, Kathryn G., Jasmin M. Alves, y Ruth I. Wood. 2015. «Anabolic–Androgenic Steroids and Decision Making: Probability and Effort Discounting in Male Rats». *Psychoneuroendocrinology* 57 (julio): 84-92.
<https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2015.03.023>.

- Weafer, Jessica, y Harriet De Wit. 2014. «Sex Differences in Impulsive Action and Impulsive Choice». *Addictive Behaviors* 39 (11): 1573-79.
<https://doi.org/10.1016/j.addbeh.2013.10.033>.
- Wilmouth, Carrie E., y Linda P. Spear. 2009. «Hedonic Sensitivity in Adolescent and Adult Rats: Taste Reactivity and Voluntary Sucrose Consumption». *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 92 (4): 566-73. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2009.02.009>.
- Wise, Roy A. 1989. «Opiate Reward: Sites and Substrates». *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 13 (2-3): 129-33. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(89\)80021-1](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(89)80021-1).
- Wittmann, Marc, y Martin P. Paulus. 2008. «Decision Making, Impulsivity and Time Perception». *Trends in Cognitive Sciences* 12 (1): 7-12.
<https://doi.org/10.1016/j.tics.2007.10.004>.
- Zhang, Qianwen, Mingxi Li, Zhiru Wang, y Fujun Chen. 2023. «Sex Differences in Learning and Performing the Go/NoGo Tasks». *Biology of Sex Differences* 14 (1): 25.
<https://doi.org/10.1186/s13293-023-00504-z>.
- Zold, C. L., y M. G. Hussain Shuler. 2015. «Theta Oscillations in Visual Cortex Emerge with Experience to Convey Expected Reward Time and Experienced Reward Rate». *Journal of Neuroscience* 35 (26): 9603-14. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0296-15.2015>.