

PARTICIPACIÓN DEL CEREBELO Y DEL HIPOCAMPO EN EL CONDICIONAMIENTO CLÁSICO DEL REFLEJO CORNEAL*

José M. Delgado-García**

SUMMARY

The classical conditioning of nictitating membrane/eyelid responses is one of the most frequently used experimental models for the study of learning and memory mechanisms in mammals. Our research group has carried out a detailed study of the kinetic properties of reflex, voluntary and emotional eyelid responses, as well as those characterizing classically conditioned blink responses. On the other hand, we have studied the location and, in particular, the firing properties of facial motoneurons innervating the orbicularis oculi muscle during the performance of those types of eyelid reflex and learned responses. Facial motoneurons encode the speed of eyelid displacement during reflexively evoked blinks, but they encode eyelid position during the performance of learned blink responses. This noticeable difference suggests a different processing and/or neural origin of both types of motor command. The paravermal cortex and the rostral pole of the posterior interpositus nucleus are apparently involved in reflex and learned eyelid responses, contributing to their correct performance, but not to the acquisition of new motor abilities carried out with the lid. Another cerebral structure involved in classical conditioning of eyelid responses is the hippocampus, contributing to determine the relevance or predictive value of the conditioning stimulus, during classical conditioning paradigms. Finally, an integrated view of the premotor facial system and of the future lines of research in this experimental model of associative learning in mammals is also presented.

Key words: Cerebellum, hippocampus, classical conditioning, eyelid, cats.

RESUMEN

Uno de los modelos experimentales más utilizados para el estudio de los procesos de aprendizaje y memoria en mamíferos es el condicionamiento clásico del reflejo corneal. Nuestro grupo de investigación ha realizado un estudio detallado de las características cinéticas de las respuestas palpebrales reflejas, voluntarias y emocionales, así como de las aprendidas mediante técnicas de

condicionamiento clásico. Por otra parte, hemos estudiado la localización y, en particular, las propiedades funcionales de las motoneuronas que inervan el músculo *orbicularis oculi* que hacen posible la realización de dichos tipos de movimientos palpebrales. Las motoneuronas faciales codifican la velocidad de contracción de los párpados durante respuestas reflejas, pero sólo codifican su posición durante respuestas condicionadas o aprendidas. Esta diferencia indica un diferente procesamiento (y/u origen) de ambas órdenes motoras. Tanto la corteza paravermal como el polo rostral del núcleo interpósito posterior del cerebelo están relacionados con los movimientos palpebrales reflejos y aprendidos, contribuyendo posiblemente a su correcta realización, pero no a la adquisición de respuestas palpebrales aprendidas. El hipocampo parece participar en este tipo de condicionamiento asociativo contribuyendo a la identificación de la relevancia o valor predictivo del estímulo condicionado, durante condicionamientos de tipo pavloviano. Se presentan, por último, una visión integrada del sistema premotor facial y las previsibles líneas futuras de estudio en este modelo experimental de aprendizaje asociativo en mamíferos.

Palabras clave: Cerebelo, hipocampo, condicionamiento clásico, párpado, gatos.

INTRODUCCIÓN

El texto que sigue es una exposición, algo más detallada, de la Conferencia "Hernández-Peón" que tuve el honor de impartir el 28 de octubre del año 2002 en el Instituto Nacional de Psiquiatría. He procurado respetar en lo posible el formato de un texto preparado para una charla, evitando acumular en exceso referencias demasiado específicas, más propias de un artículo de investigación. En cualquier caso, una descripción detallada desde el punto de vista cuantitativo, y contrastada con la bibliografía disponible, se puede encontrar en varios artículos

* Resumen de la Conferencia "Hernández-Peón", dictada el 28 de octubre de 2002 en el Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente.

** Laboratorio Andaluz de Biología, Universidad Pablo de Olavide, 41013-Sevilla, España.

Correspondencia: Prof. José M. Delgado-García. Laboratorio Andaluz de Biología, Universidad Pablo de Olavide. Ctra. de Utrera, Km. 1, 41013-Sevilla, España. Tel: + 34-954-349374, Fax: + 34-954-349375, e-Mail: jmdelgar@dex.upo.es

publicados por nuestro grupo de investigación, a los cuales remito al lector interesado (6, 7, 13-19, 22, 24, 25, 28), así como en revisiones globales del mismo tema, realizadas por otros autores (9, 11, 12, 27, 30).

La conferencia se centró en la descripción del sistema motor del párpado como modelo experimental usado frecuentemente en el estudio de los mecanismos neuronales que subyacen al aprendizaje motor en los mamíferos. De hecho, el condicionamiento clásico de la respuesta palpebral (o de la membrana nictitante) se viene utilizando desde hace más de 50 años como ejemplo de generación de nuevas habilidades motoras mediante aprendizajes de tipo asociativo (11, 12, 27). Respetando pues las líneas principales de la conferencia impartida en el I.N.P., a continuación se presentará una descripción sucinta de las características funcionales del sistema motor facial más relevantes, la metodología que se sigue en este tipo de estudios, la mecánica palpebral y la fisiología de las motoneuronas que inervan el músculo *orbicularis oculi* y, finalmente, la contribución del cerebelo y del hipocampo a este tipo de aprendizaje motor. Conviene señalar aquí que está de moda considerar los procesos de aprendizaje motor desde el exclusivo punto de vista de la plasticidad neuronal, con especial referencia a los "sitios" (lugares del sistema nervioso central) donde aquéllos tienen lugar (27), así como sus substratos moleculares (3, 8, 20, 21, 23), olvidando los aspectos funcionales que tienen lugar *in vivo*, durante el momento mismo del aprendizaje (7). A estos aspectos funcionales se dedicará una atención especial en esta breve revisión sobre el condicionamiento clásico de la respuesta palpebral en mamíferos.

EL SISTEMA MOTOR DEL PÁRPADO COMO MODELO EN EL ESTUDIO DE APRENDIZAJES DE TIPO ASOCIATIVO

El sistema motor facial es peculiar por diversas razones. Desde el punto de vista evolutivo, este sistema motor es de aparición tardía, desarrollándose principalmente en felinos y primates. Es un conjunto muscular de origen visceral modificado, lo que explica en parte su fácil entrenamiento con condicionamiento clásico o pavloviano. En el hombre, la musculatura facial está compuesta por más de 20 músculos distintos. Una característica común a casi todos los músculos faciales es su pequeña masa, por lo que se afectan escasamente por la fuerza de la gravedad. Por ejemplo, los párpados se cierran cuando se relaja el músculo elevador que los mantiene abiertos, incluso si nos colocamos cabeza abajo. Por tanto, el cierre de los párpados no ocurre por acción de la gravedad,

sino por la liberación de las tensiones acumuladas en los tendones y aponeurosis palpebrales, tras la relajación del músculo elevador de los párpados. Los músculos faciales, y entre ellos los que mueven el párpado, se denominan de carga constante, porque no están sometidos a cambios en el peso que deben movilizar cuando se contraen. Además, gran parte de la musculatura facial (incluyendo la de los párpados) presenta una disposición plana, en mapa, ya que cada unidad motora ocupa un lugar preciso y exclusivo dentro del músculo. Esta disposición tiene una gran importancia funcional, pues cada motoneurona facial puede tener una contribución específica y única a la mímica de la cara. De hecho, las motoneuronas faciales están organizadas en subnúcleos dentro del núcleo motor facial y, a su vez, mantienen un alto grado de somatotopía en cada subnúcleo (24). También es sabido que, dentro de cada subnúcleo, hay aferencias específicas para pequeñas agrupaciones motoneuronales. Por ejemplo, las motoneuronas que inervan la porción palpebral (tarsal) del músculo *orbicularis oculi* se localizan en la región más dorsal del núcleo intermedio facial y se activan principalmente durante respuestas reflejas originadas por estímulos mecánicos de la córnea y de la piel de los párpados (28, 29). Por el contrario, las motoneuronas que inervan la porción orbitaria (septal) del músculo *orbicularis oculi* se activan preferentemente durante expresiones faciales relacionadas con el estado emocional del sujeto (10).

Con alguna excepción, los músculos faciales y, en concreto, los del párpado, carecen de propioceptores típicos. Desde el punto de vista funcional, esto se traduce en que no hay reflejo miotático directo, o de estiramiento, en la musculatura palpebral. Por otra parte, las motoneuronas que inervan el músculo *orbicularis oculi* carecen de información relativa a la posición que ocupa el párpado sobre el globo ocular. La posición palpebral durante la vigilia la determina el músculo elevador de los párpados, ya que las motoneuronas que lo inervan tienen información de la posición del ojo en la órbita (mirada arriba o abajo) como el resto de la musculatura extraocular que mueve el ojo en el plano vertical (2). Durante los movimientos palpebrales (denominados sacádicos) que acompañan los movimientos oculares rápidos, el músculo *orbicularis oculi* está completamente relajado. Este músculo se activa cuando los párpados se cierran de forma refleja (por estímulos trigeminales, sonoros o visuales) y durante movimientos voluntarios y de origen emocional. La respuesta palpebral condicionada, aprendida mediante condicionamiento clásico, es más parecida en su cinética a la respuesta palpebral de tipo emocional que a la respuesta de tipo reflejo

(13), lo que sugiere algo respecto a los mecanismos neuronales subyacentes a su génesis.

En primates, el cierre de los párpados es el resultado exclusivo de la contracción del músculo *orbicularis oculi*, mientras su apertura depende de la acción del músculo elevador. Pero en animales con membrana nictitante (la mayoría de vertebrados terrestres) existe un músculo que se inserta en el polo posterior del globo ocular, el músculo *retractor bulbi*, que retrae el ojo hacia el fondo de la órbita, para permitir el deslizamiento de dicha membrana por la superficie corneal. Esta retracción del globo ocular contribuye también al cierre de los párpados (7). Por último, algunas especies como el conejo y el gato son capaces de co-contrair los cuatro músculos rectos que se insertan en el globo ocular, sobre todo en respuesta a estímulos corneales muy intensos, lo que hace que el ojo se retraiga hacia el fondo de la órbita, contribuyendo al cierre de los párpados.

En resumen, un movimiento tan simple en apariencia como el de cerrar los párpados es el resultado motor de la acción de muy diversos músculos, gobernados a su vez por diferentes centros motores troncoencefálicos. Asimismo, se pueden hacer movimientos palpebrales muy diferentes, algunos de ellos de extraordinaria precisión y expresividad.

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

El modelo experimental utilizado en este tipo de estudios se ilustra en la figura 1. Al animal se le implantan de forma crónica electrodos bipolares para el registro de la actividad electromiográfica del músculo *orbicularis oculi* y una pequeña bobina metálica para el registro de la posición palpebral por el método del seguidor magnético de la posición. El animal se prepara también para el registro con pipetas de vidrio de alta resistencia (3-5 Mohms) de la actividad eléctrica unitaria en estructuras seleccionadas, como el núcleo motor facial, el núcleo interpósito del cerebelo o las células piramidales del hipocampo. Las neuronas registradas se identifican *in vivo* mediante su activación antidrómica desde sus sitios de proyección. Por ejemplo, las motoneuronas faciales se activan antidrógicamente desde el nervio facial, las neuronas del núcleo interpósito desde el núcleo rojo y las células piramidales del hipocampo desde el fórnix. Una descripción detallada de este modelo experimental se puede encontrar en artículos especializados (13, 25).

Como prueba de aprendizaje, en estos estudios se ha utilizado el condicionamiento clásico del reflejo corneal, con paradigmas de traza y de demora (figura

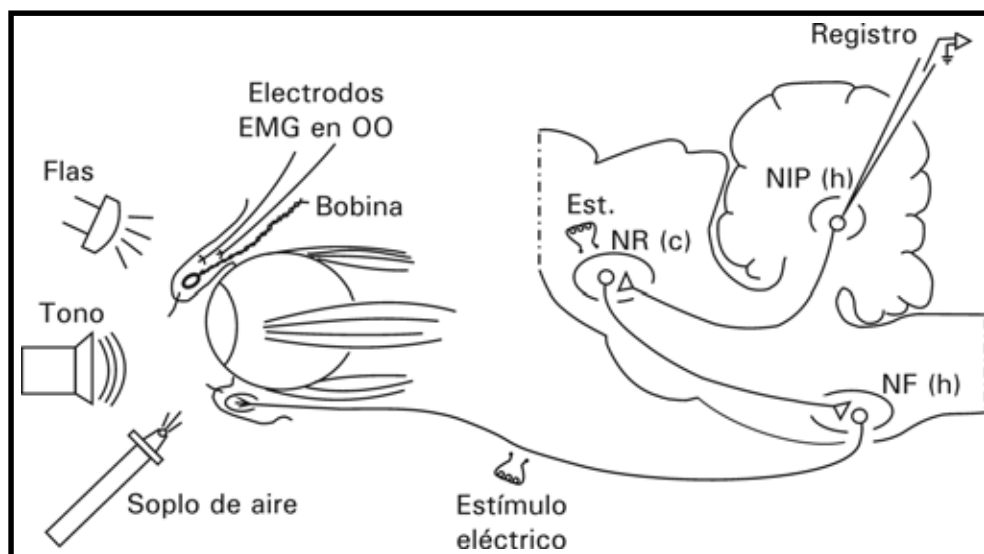


Fig. 1. Modelo experimental. El diseño experimental consiste en la implantación crónica de una pequeña bobina metálica en el párpado superior para medir los desplazamientos del mismo con la técnica del seguidor magnético de la posición. En esencia, el animal se coloca dentro de un campo magnético y el desplazamiento de la bobina metálica dentro del campo induce un voltaje proporcional al ángulo de desplazamiento (13, 16). De forma adicional, se pueden implantar otras dos bobinas alrededor del globo ocular para medir los desplazamientos rotacionales y traslacionales del mismo (6). También se implanta un electrodo bipolar para registrar la actividad electromiográfica (EMG) del músculo *orbicularis oculi* (OO). Se pueden utilizar estímulos como soplos de aire (20-100 ms, 1-3 kg / cm²) aplicados a la córnea, sonidos (20-350 ms, 600-6.000 Hercios, 90 dB) o flashes de luz (1 ms). Las neuronas se registran con micropipetas de vidrio rellenas de una solución conductora y se identifican *in vivo* mediante su activación antidrómica desde sus sitios de proyección (se indican algunos puntos de estimulación eléctrica). Abreviaturas: NF, núcleo motor facial; NIP, núcleo interpósito posterior del cerebelo; NR, núcleo rojo; c, h, contra- y homolateral.

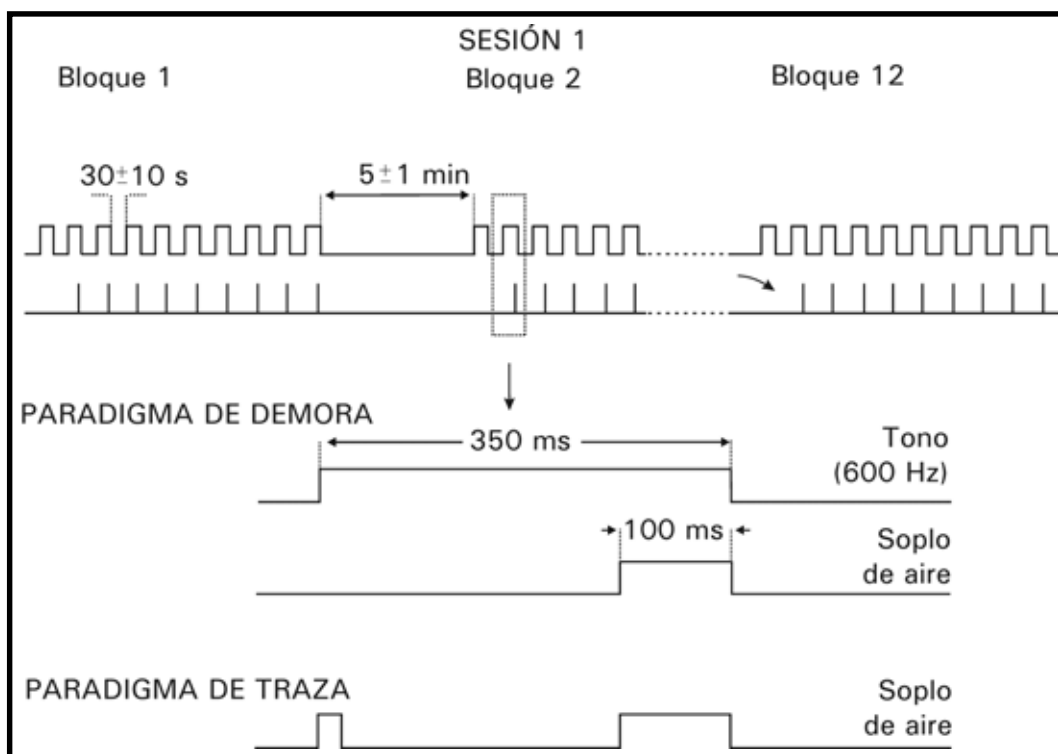


Fig. 2. Paradigmas de condicionamiento. Normalmente, una sesión de condicionamiento dura unas dos horas para gatos, una hora para conejos y 30 min para ratas y ratones. Los estímulos condicionado e incondicionado se presentan emparejados en bloques de 10, con un intervalo variable entre parejas de unos 30 s. Cada bloque (1, ...12) está separado del anterior unos 5 minutos. Se indica el diseño experimental para los paradigmas de demora y traza. Ver texto para más detalles.

2). En el paradigma de demora, se presenta un sonido (600 Hercios, 90 dB) como estímulo condicionado que dura 350 ms. A los 250 ms de iniciado el sonido se presenta un soplo intenso en la córnea izquierda (100 ms, 3 kg / cm²) como estímulo incondicionado, que termina simultáneamente con el estímulo condicionado. En el paradigma de traza se presenta un breve (20 ms) soplo de aire en la córnea izquierda (1 kg / cm²) o un tono (600 Hercios, 90 dB) como estímulo condicionado. Unos 250 ms después de terminado el estímulo condicionado se presenta un intenso (100 ms, 3 kg / cm²) soplo de aire en la misma córnea, como estímulo incondicionado. En cada sesión de condicionamiento se presentan las parejas de estímulos condicionado e incondicionado entre 60 y 120 veces, según la especie animal a condicionar, separados en bloques de 10 parejas. Más detalles de este modelo experimental se pueden encontrar en trabajos más específicos de nuestro grupo (13, 19).

FISIOLOGÍA DE LAS MOTONEURONAS FACIALES QUE INERVAN EL MÚSCULO ORBICULARIS OCULI

La actividad de las motoneuronas faciales que inervan al músculo *orbicularis oculi* ha sido registrada en el gato despierto y alerta durante la realización de

respuestas palpebrales reflejas y condicionadas (28, 29). En la misma serie de experimentos se estudió también la actividad de las motoneuronas que inervan el músculo *retractor bulbi*, localizadas en el núcleo accesorio del motor ocular externo. Las motoneuronas del *orbicularis oculi* y del *retractor bulbi* generan dos brotes de potenciales de acción (a los 4-6 y 10-16 ms) en respuesta a la presentación de un soplo de aire intenso a la córnea homolateral (Figura 3). En el gato, las motoneuronas faciales, pero no las del *orbicularis oculi*, responden a la presentación de tonos o de flases de luz. Mediante análisis de regresión se ha comprobado que las motoneuronas faciales codifican la velocidad con que el párpado se cierra durante el reflejo corneal, pero no la posición del párpado sobre el globo ocular (28, 29). De hecho, la posición del párpado sobre el ojo viene determinada por la actividad de las motoneuronas que inervan el músculo elevador de los párpados (2).

En el caso de respuestas palpebrales aprendidas, estas motoneuronas funcionan de un modo muy distinto. En primer lugar, las motoneuronas que inervan el músculo *retractor bulbi* no se activan durante las respuestas palpebrales condicionadas (28). Esto puede deberse a que la respuesta aprendida tiene una velocidad pico que no llega al 10% de la que se alcanza durante las respuestas palpebrales reflejas.

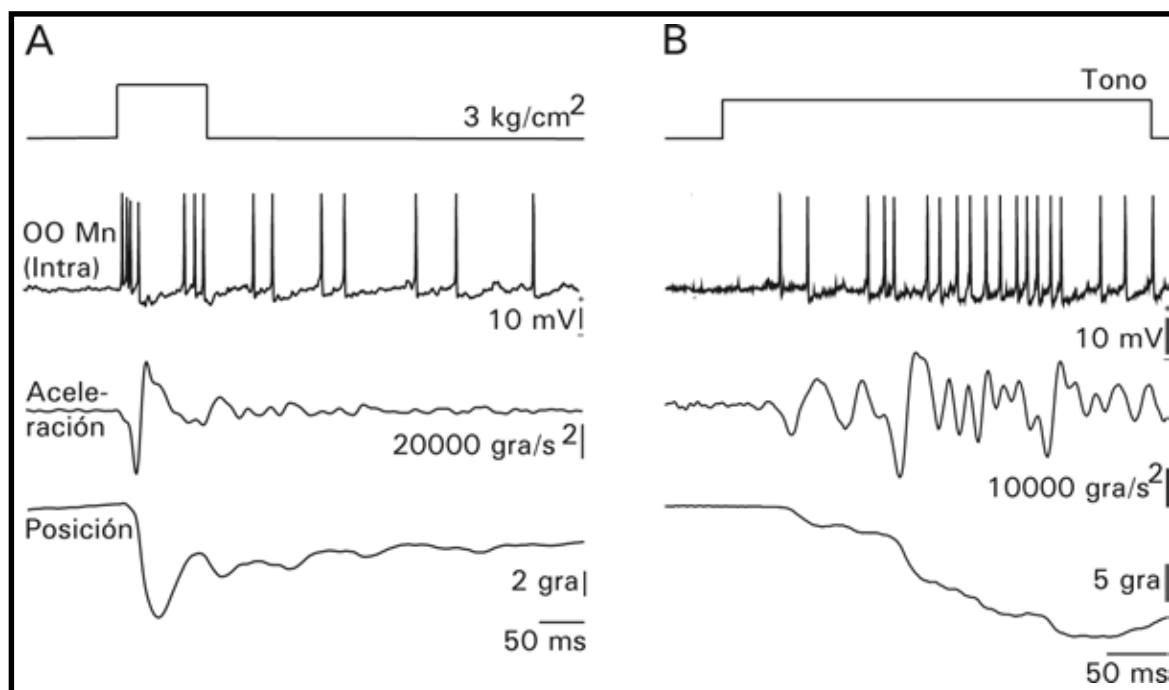


Fig. 3. Actividad de las motoneuronas faciales que innervan el músculo *orbicularis oculi* durante respuestas palpebrales reflejas (A) y condicionadas (B). De arriba a abajo se muestra el estímulo aplicado, el registro intracelular de una motoneurona facial y la aceleración (en grados / s²) y posición (en grados) del párpado. El desplazamiento hacia abajo del trazado de la posición del párpado indica su cierre. En A, se aplicó un soplo de aire durante 100 ms a la córnea homolateral al registro. En B, se muestra un ejemplo de respuesta condicionada evocada por la sola presentación del estímulo condicionado (un tono, ver texto para detalles). Modificado de Trigo y col. (28).

Esto indica que la señal de activación que llega a las motoneuronas del *retractor bulbi* durante el condicionamiento no es suficientemente intensa para despolarizarlas. Por el contrario, las motoneuronas faciales que innervan el músculo *orbicularis oculi* sí se despolarizan lo suficiente para producir potenciales de acción ante la presentación de los estímulos condicionado e incondicionado. De todas formas, la activación de estas motoneuronas durante el condicionamiento clásico del reflejo corneal es más débil que la que tienen durante la realización de respuestas palpebrales reflejas. Es importante señalar, que las motoneuronas no codifican la velocidad del desplazamiento del párpado durante las respuestas condicionadas, sino su posición. De hecho, en la figura 3 se puede observar el disparo preferentemente fásico (o en brotes) que tienen estas motoneuronas durante las respuestas palpebrales reflejas (figura 3A) y preferentemente tónico durante las respuestas palpebrales aprendidas (figura 3B). Estos datos sugieren que las respuestas reflejas se elaboran preferentemente en el soma de las motoneuronas, por lo que producen una gran despolarización de la misma, mientras que las respuestas aprendidas se elaboran preferentemente en las dendritas, causando una despolarización sostenida, pero menos intensa (28). Recientemente, se ha descrito que determinados

aferentes colinérgicos a las motoneuronas faciales pueden intervenir en la generación del disparo tónico que caracteriza la producción de respuestas palpebrales aprendidas (22, 28).

MECANISMOS NEURONALES QUE SUBYACEN AL APRENDIZAJE ASOCIATIVO

Una pregunta que se sigue de lo dicho hasta ahora es ¿dónde se originan las señales neuronales que llevan a las motoneuronas faciales los órdenes correspondientes para la generación de respuestas motoras condicionadas o aprendidas? En un estudio reciente (24), hemos identificado el complejo sistema pre-motor que proyecta sobre las motoneuronas que innervan el músculo *orbicularis oculi*. Este estudio se realizó utilizando el virus atenuado de la rabia como marcador transináptico retrógrado. De dicho estudio se concluye que hay numerosos centros troncoencefálicos, cerebelosos y de la corteza cerebral relacionados más o menos directamente con la elaboración de las diferentes órdenes motoras que determinan la producción de movimientos palpebrales reflejos, voluntarios, emocionales y aprendidos. En el resto de esta revisión se presentan los estudios que ya hemos realizado en algunas de las estructuras identificadas por su carácter

pre-motor, es decir que proyectan mono-, bi- o polisinápticamente sobre las motoneuronas del músculo orbicular de los párpados.

Dos de las estructuras que más se han propuesto como el sitio donde ocurren los procesos moleculares que subyacen al aprendizaje motor son el hipocampo y el cerebelo (4, 5, 16, 25, 27, 30). En particular, se ha sugerido que en el hipocampo ocurren procesos funcionales y estructurales relacionados con la potenciación a largo plazo (LTP, siglas en inglés de *long-term potentiation*), mientras que en el cerebelo se han descrito mecanismos de inhibición a largo plazo (LTD, siglas en inglés para *long-term depression*). En ambos casos, la mayoría de estudios realizados, hasta el momento, han sido en preparaciones *in vitro* (3, 8, 20, 21, 23, 30). Por lo tanto, nuestro grupo ha prestado un interés especial al estudio de la actividad neuronal que se registra en dichas estructuras en el animal en condiciones fisiológicas y durante el proceso mismo de la adquisición de las respuestas palpebrales condicionadas.

PAPEL DEL CEREBELO EN EL CONDICIONAMIENTO CLÁSICO DEL REFLEJO CORNEAL

En un estudio preliminar hemos descrito que en los tres núcleos cerebelosos (fastigial, interpósito y dentado) se encuentran neuronas relacionadas de un modo u otro con los movimientos reflejos del párpado producidos por estímulos trigeminales, acústicos y visuales (15). En efecto, el marcaje de los núcleos cerebelosos con el virus atenuado de la rabia indica una localización difusa de neuronas nucleares relacionadas con la motórica palpebral (24). En cualquier caso, existe una zona nuclear donde se concentra un importante cúmulo de neuronas relacionadas con los movimientos palpebrales. Esta zona se ubica, tanto en la rata como en el gato, en el polo rostral del núcleo interpósito posterior, en inmediata vecindad con el núcleo dentado (14-16, 24).

Las neuronas del polo rostral del interpósito posterior presentan una actividad eléctrica claramente relacionada con respuestas palpebrales reflejas y condicionadas. Dichas neuronas han sido clasificadas en dos tipos (A y B) en función de la actividad eléctrica que presentan durante el movimiento palpebral. Las neuronas tipo A se activan unos ms después del inicio del movimiento palpebral (figura 4) y el perfil de su frecuencia instantánea de disparo semeja a veces el perfil del movimiento palpebral. Sin embargo, no se ha podido demostrar que la frecuencia instantánea de disparo de estas neuronas tipo A esté linealmente

relacionada con la posición, velocidad o aceleración del párpado durante movimientos reflejos, voluntarios o aprendidos. Las neuronas tipo A tienen una frecuencia media de disparo de 10-60 potenciales de acción / s en el gato despierto y alerta. Esta frecuencia se incrementa considerablemente (hasta los 300 potenciales de acción/s) durante los movimientos palpebrales.

Por otra parte, las neuronas tipo B localizadas en el mismo polo rostral del interpósito posterior se inhiben durante el movimiento palpebral, ya sea de origen reflejo o condicionado (figura 4). Las neuronas tipo B tienen una frecuencia espontánea de disparo de 30-80 potenciales de acción/s, frecuencia que disminuye hasta desaparecer durante el movimiento palpebral. En este caso también, la inhibición en el disparo neuronal se inicia unos ms después que el movimiento palpebral.

Los cambios en frecuencia (activación o inhibición) característicos de las neuronas tipo A y B del núcleo interpósito del cerebelo no ocurren inmediatamente del comienzo de las sesiones de condicionamiento, sino que ocurren con una pendiente muy poco pronunciada (del orden de 0.05 potenciales de acción/s/ensayo). Esta pendiente indica que dichas neuronas aumentan (las tipo A) o disminuyen (las tipo B) sus frecuencias medias de disparo de potenciales de acción alrededor de 5 potenciales de acción / s cada 100 ensayos, es decir, cada sesión de entrenamiento. Su actividad está ligada a la aparición de la respuesta condicionada y no a la mera presentación de la pareja de estímulos condicionado e incondicionado. Esto último indica que el núcleo interpósito está claramente relacionado con la realización del movimiento palpebral aprendido, pero no con su iniciación o génesis, ya que la activación (tipo A) o inhibición (tipo B) no precede, sino que sigue al inicio de la respuesta condicionada (16).

Un experimento que evidencia el importante papel del núcleo interpósito posterior del cerebelo en la realización de la respuesta palpebral aprendida o condicionada es que la micro-estimulación de la zona de registro produce una respuesta palpebral similar en perfil a la respuesta condicionada, sobre todo si se acompaña de la presentación de un estímulo condicionado (figura 5). Por el contrario, la microinyección de muscimol (un conocido agonista del receptor GABA_A) en la misma zona produce una disminución en la amplitud de la respuesta palpebral condicionada (figura 5). En este caso, la inhibición de las neuronas del núcleo interpósito disminuye su efecto facilitador (a través del núcleo rojo) sobre la activación de las motoneuronas que inervan el músculo *orbicularis oculi*.

Así pues, el núcleo interpósito posterior del cere-

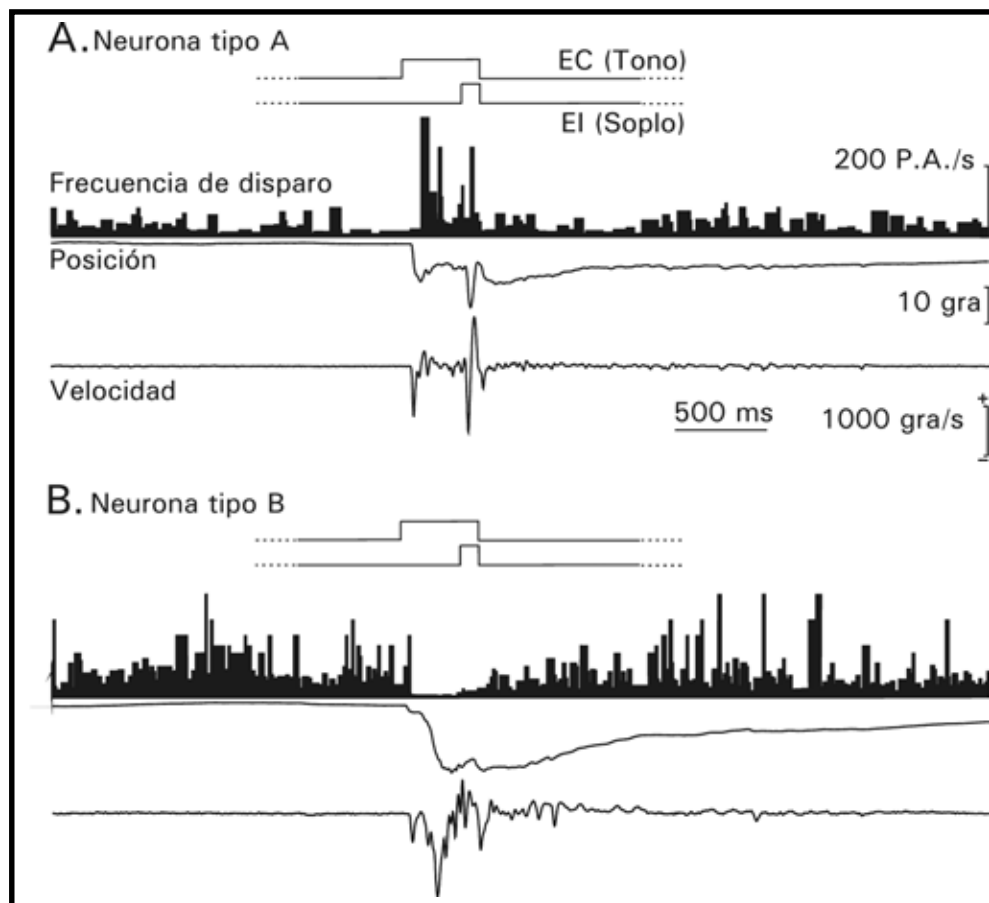


Fig. 4. Actividad de dos tipos neuronales localizados en el núcleo interpósito posterior del cerebelo durante la realización de respuestas palpebrales condicionadas. En **A** se muestra la actividad de una neurona tipo A, mientras que en **B** se muestra la actividad eléctrica de una neurona tipo B. En ambos casos, de arriba a abajo se ilustran el paradigma de condicionamiento (demora), la frecuencia de disparo (en potenciales de acción / s), y la posición (en grados) y velocidad (en grados / s) del párpado. El desplazamiento hacia abajo del trazado de la posición del párpado indica su cierre. Las calibraciones incluidas en **A** son también para **B**. Modificado de Gruart y col. (16).

belo contribuye a la despolarización de las motoneuronas faciales durante el intervalo de tiempo entre el inicio del estímulo condicionado y del incondicionado, momento en que aparece la respuesta palpebral condicionada. Este efecto se ejerce preferentemente por las neuronas tipo A, las cuales proyectan a la región dorso-medial del núcleo rojo, mientras que las neuronas rubrales proyectan monosinápticamente sobre las motoneuronas del músculo *orbicularis oculi*. A su vez, es probable que las neuronas tipo B proyecten sobre interneuronas localizadas en las proximidades del núcleo del tercer par craneal y que contribuyan a inhibir (o facilitar) la actividad de las motoneuronas del músculo elevador de los párpados, contribuyendo así a facilitar el cierre de los mismos durante la respuesta condicionada (16).

En este sentido, pues, el cerebelo no funciona como un órgano coordinador, integrador y computador del movimiento aprendido (27), sino más bien como un órgano reforzador (16) de la orden motora

procedente de alguna otra estructura cerebral, principalmente, la corteza motora y pre-motora (1, 17).

PAPEL DEL HIPOCAMPO EN EL CONDICIONAMIENTO CLÁSICO DEL REFLEJO CORNEAL

Hemos estudiado también la actividad de neuronas piramidales de las capas CA1 y CA3 del hipocampo durante la realización de respuestas palpebrales reflejas y aprendidas (25). Las células piramidales registradas en el gato despierto producen un breve brote de potenciales de acción unos 60-80 ms después de presentado un estímulo novedoso (figura 6). Esta respuesta tiende a desaparecer con la presentación repetida del mismo estímulo. Sin embargo, cuando un estímulo condicionado (soplo de aire débil, tono) se empareja repetidamente con un estímulo incondicionado (soplo de aire fuerte aplicado a la córnea), la respuesta neuronal al estímulo condicionado aumenta considerablemente a lo largo de las sesiones de condicionamiento (figura 6). Este aumento en la fre-

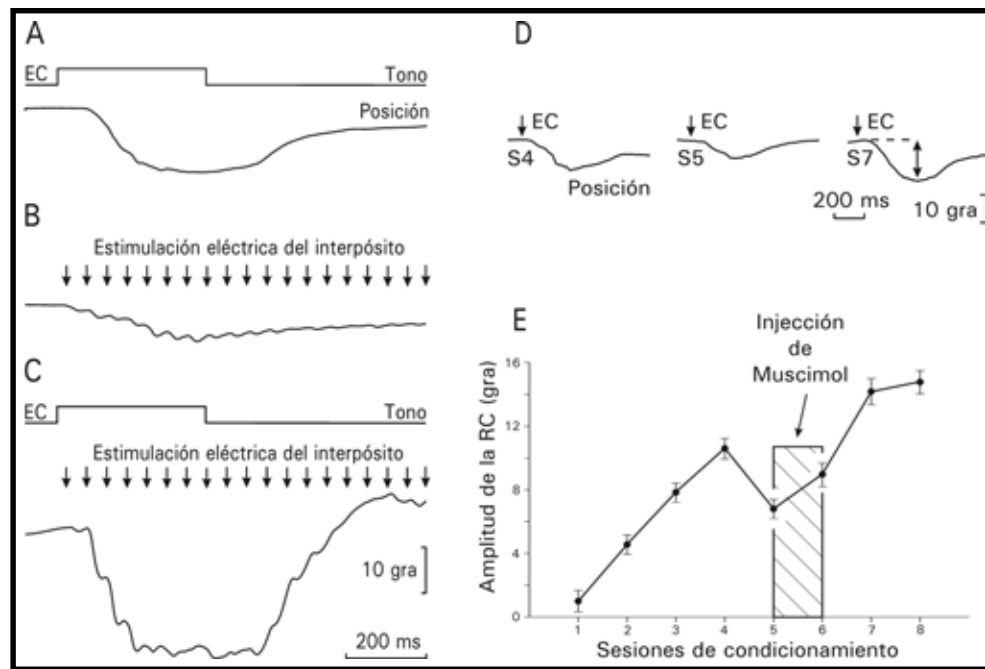


Fig. 5. Efectos de la micro-estimulación (A-C) y de la inyección de muscimol (D-E) en el núcleo interpósito posterior del cerebelo durante el condicionamiento clásico del reflejo corneal. En A se muestra la respuesta condicionada del párpado a la presentación del estímulo condicionado (EC, un tono de 600 Hercios y 350 ms de duración). En B se presenta la respuesta del párpado en el mismo animal a la estimulación del núcleo interpósito posterior a 20 Hercios. En C se presenta la respuesta del párpado a la presentación simultánea del EC y del tren de estímulos eléctricos. Las calibraciones en C son también para A y B. El desplazamiento hacia abajo del trazado de la posición del párpado indica su cierre. En D se presentan respuestas condicionadas a la presentación del EC, registradas en las sesiones 4, 5 y 7. Nótese la pequeña respuesta en la sesión 5, debido a la inyección de muscimol en el núcleo interpósito. En E se presenta la curva de aprendizaje del mismo animal. Véase el efecto de la inyección de muscimol en las sesiones 5 y 6. Modificado de Gruart y col. (16).

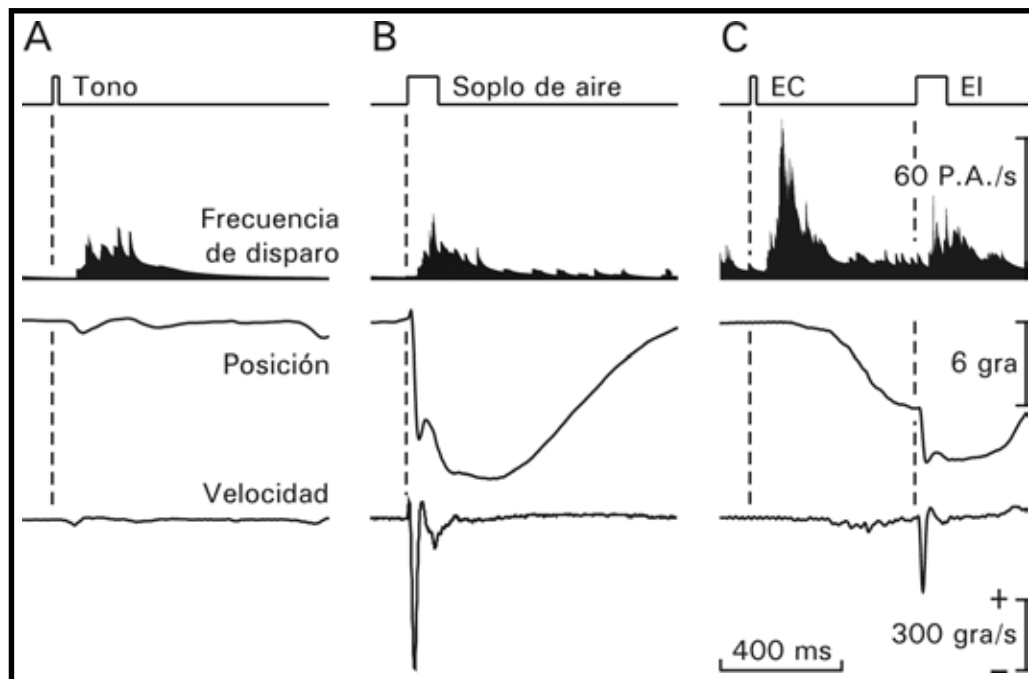


Fig. 6. Actividad eléctrica de neuronas piramidales del hipocampo durante el condicionamiento clásico del reflejo corneal. En A se ilustra la respuesta de una neurona piramidal del hipocampo representativa durante la presentación de un tono (20 ms, 600 Hercios, 90 dB). En B se ilustra la respuesta de otra neurona típica a la presentación de un soplo de aire (100 ms, 3 Kg / cm²). En C se ilustra la respuesta de otra neurona piramidal del hipocampo durante la sexta sesión de condicionamiento. De arriba a abajo se muestran los estímulos utilizados, la frecuencia de disparo de la neurona (en potenciales de acción / s) y la posición (en grados) y velocidad (en grados / s) del párpado. El desplazamiento hacia abajo del trazado de la posición del párpado indica su cierre. Modificado de Múnera y col. (25).

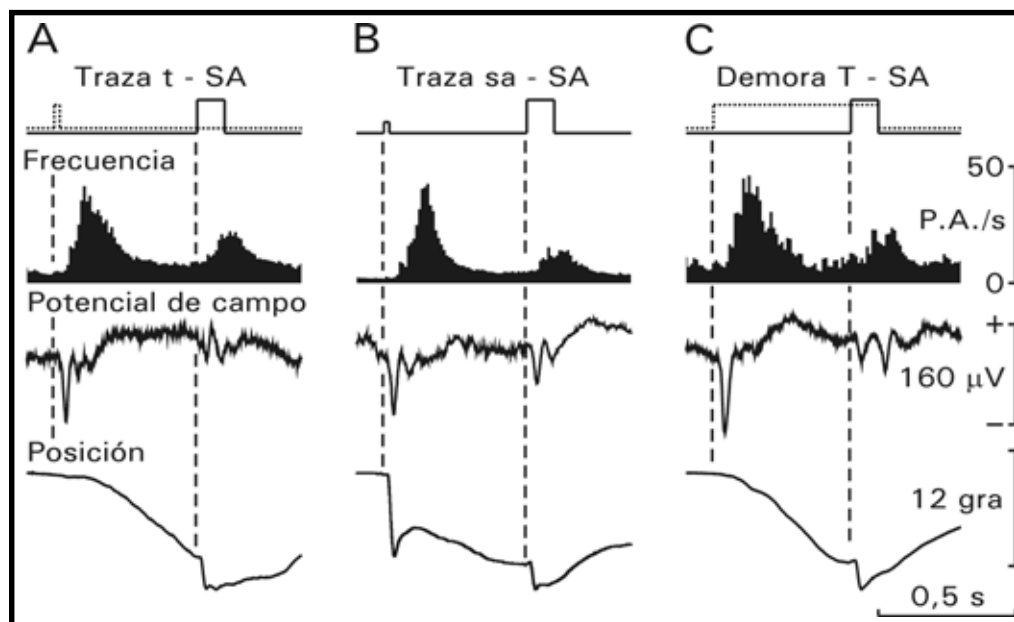


Fig. 7. Actividad de las células piramidales del hipocampo durante distintos paradigmas de condicionamiento clásico. En **A** se muestra la actividad de una neurona piramidal durante un condicionamiento clásico del reflejo corneal con un paradigma de traza. Como estímulo condicionado (EC) se utilizó un tono breve (20 ms, 600 Hercios, 90 dB). En **B** se utilizó como EC un soplo débil (20 ms, 1 Kg / cm²), mientras que en **C** el EC fue un tono duradero (350 ms, 600 Hercios, 90 dB). En los tres casos, el estímulo incondicionado fue un soplo de aire largo e intenso (100 ms, 3 Kg / cm²). De arriba a abajo se muestran el paradigma experimental, la frecuencia de disparo de la neurona (en potenciales de acción / s), el potencial de campo (en mV) evocado por los estímulos condicionado e incondicionado y la posición (en grados) del párpado. El desplazamiento hacia abajo del trazado de la posición del párpado indica su cierre. Nótese que los tres paradigmas produjeron una respuesta similar en la actividad neuronal, pero un movimiento palpebral claramente distinto. Las calibraciones en **C** son también para **A-B**. Modificado de Múnera y col. (25).

cuencia instantánea de disparo de las células piramidales tiene una pendiente similar (0.05 potenciales de acción/s/ensayo) que la ya descrita para las neuronas del cerebelo, lo que sugiere que los procesos de aprendizaje pueden estar ocurriendo en muy diversos lugares del cerebro a la vez. Estos cambios pues se corresponderían a un estado funcional específico que abarcaría numerosas estructuras cerebrales y que sería específico para este tipo de aprendizaje (7).

Por otra parte, se ha descrito que el hipocampo sólo estaría relacionado con la adquisición de condicionamiento clásico utilizando paradigmas de traza, pero no en los de demora, que serían específicos del cerebelo (5, 7, 27). Esta afirmación se pone en duda por los datos ilustrados en la figura 7, en la que se muestra que las neuronas piramidales del hipocampo en el gato despierto responden prácticamente del mismo modo a paradigmas de traza y de demora. Incluso, su respuesta parece independiente de la modalidad sensorial del estímulo condicionado utilizado (soplo de aire débil, tono breve o tono prolongado (figura 7). Así pues, el hipocampo parece estar más relacionado con la relevancia, saliencia o valor predictivo del estímulo condicionado (25, 26), más que con la determinación del intervalo de tiempo

entre los estímulos condicionado e incondicionado (27), o con el paradigma de traza en exclusiva (7).

PERSPECTIVAS FUTURAS

Una pregunta aún pendiente de respuesta es el lugar (o lugares) donde se genera o elabora la respuesta palpebral condicionada. Estudios electrofisiológicos en gatos (1) y estudios recientes sobre genes de expresión temprana (17) sugieren que amplias zonas de la corteza motora y sensorial podrían estar relacionadas con el aprendizaje de este tipo de respuesta motora. Parece necesario pues estudiar en detalle estas zonas corticales, en experimentos *in vivo*, durante el momento mismo de la adquisición del movimiento palpebral condicionado. Además, se ha indicado más arriba la importancia que tendría la realización de registros de la actividad neuronal de modo simultáneo en muy diversas regiones corticales y sub-corticales relacionadas con el movimiento palpebral (24) durante el proceso de aprendizaje.

El objetivo a medio plazo sería determinar no ya el sitio, sino el estado funcional subyacente al aprendizaje motor. Esta última línea de trabajo tiene por tanto un prometedor futuro.

Agradecimientos

A la doctora Agnès Gruart por la ayuda prestada en la realización de las figuras que ilustran el texto. Este trabajo ha sido realizado con ayudas del MCyT (BFI2002-00936), FISS (01/0194), Junta de Andalucía (CVI-122) y Fundació La Caixa (00/032-00).

REFERENCIAS

1. AOU S, WOODY CD, BIRT D: Changes in the activity of units of the cat motor cortex with rapid conditioning and extinction of a compound eye blink movement. *J Neurosci*, 12:549-559, 1992.
2. BECKER W, FUCHS AF: Lid-eye coordination during vertical gaze changes in man and monkey. *J Neurophysiol*, 60:1227-1252, 1988.
3. BLISS TVP, COLLINGRIDGE GL: A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 361:31-39, 1993.
4. BRACHA V, BLOEDEL JR: The multiple-pathway model of circuits subserving the classical conditioning of withdrawal reflexes. En: Bloedel JR, Ebner TJ, Wise SP (eds.) *The Acquisition of Motor Behavior in Vertebrates*. The MIT Press, 175-204, Cambridge, 1996.
5. CLARK RE, SQUIRE LR: Classical conditioning and brain systems: The role of awareness. *Science*, 280:77-81, 1998.
6. DELGADO-GARCIA JM, EVINGER C, ESCUDERO M, BAKER R: Behavior of accessory abductors and abductors motoneurons during eye retraction and rotation in the alert cat. *J Neurophysiol*, 64:413-422, 1990.
7. DELGADO-GARCIA JM, GRUART E: The role of interpositus nucleus in eyelid conditioned responses. *Cerebellum*, 1:289-308, 2002.
8. EDWARDS FA: LTP — a structural model to explain the inconsistencies. *TINS*, 18:250-255, 1995.
9. EVINGER C, MANNING KA, SIBONY PA: Eyelid movements. Mechanisms and normal data. *Invest Ophthalmol Visual Sci*, 32:387-400, 1991.
10. GORDON G: Observations upon the movement of the eyelids. *Br J Ophthalmol*, 35:339-351, 1951.
11. GORMEZANO I, KEHOE EJ, MARSHALL BS: Twenty years of classical conditioning research with the rabbit. *Prog Psychobiol Physiol Psychol*, 10:197-275, 1983.
12. GORMEZANO I, SCHNEIDERMAN N, DEAX E, FUENTES I: Nictitating membrane: classical conditioning and extinction in the albino rabbit. *Science*, 138:33-34, 1962.
13. GRUART A, BLAZQUEZ P, DELGADO-GARCIA JM: Kinematics of spontaneous, reflex, and conditioned eyelid movements in the alert cat. *J Neurophysiol*, 74:226-248, 1995.
14. GRUART A, BLAZQUEZ P, PASTOR AM, DELGADO-GARCIA JM: Very short term potentiation of climbing fiber effects on deep cerebellar nuclei neurons by conditioning stimulation of mossy fiber afferents. *Exp Brain Res*, 101:173-177, 1994.
15. GRUART A, DELGADO-GARCIA JM: Discharge of identified deep cerebellar nuclei neurons related to eye blinks in the alert cat. *Neuroscience*, 61:665-681, 1994.
16. GRUART A, GUILLAZO-BLANCH G, FERNANDEZ-MAS R, JIMENEZ-DIAZ L, DELGADO-GARCIA JM: Cerebellar posterior interpositus nucleus as an enhancer of classically conditioned eyelid responses in alert cats. *J Neurophysiol*, 84:2680-2690, 2000.
17. GRUART A, MORCUENDE S, MARTINEZ S, DELGADO-GARCIA JM: Involvement of cerebral cortical structures in the classical conditioning of eyelid responses in rabbits. *Neuroscience*, 100:719-730, 2000.
18. GRUART A, PASTOR AM, ARMENGOL JA, DELGADO-GARCIA JM: Involvement of cerebellar cortex and nuclei in the genesis and control of unconditioned and conditioned eyelid motor responses. *Prog Brain Res*, 114:511-528, 1997.
19. GRUART A, SCHREURS BG, DOMINGUEZ DEL TORO E, DELGADO-GARCIA JM: Kinetic and frequency-domain properties of reflex and conditioned eyelid responses in the rabbit. *J Neurophysiol*, 83:836-852, 2000.
20. HAWKINS RD, ABRAMS TW, CAREW TJ, KANDEL ER: A cellular mechanism of classical conditioning in *Aplysia*: activity-dependent amplification of presynaptic facilitation. *Science*, 219:400-405, 1983.
21. ITO M: Long-term depression. *Annu Rev Neurosci*, 12:85-102, 1989.
22. MAGARIÑOS-ASCONE C, NUÑEZ A, DELGADO-GARCIA JM: Different discharge properties of rat facial nucleus motoneurons. *Neuroscience*, 94:879-886, 1999.
23. MALENKA RC: LTP and LTD: dynamic and interactive processes of synaptic plasticity. *Neuroscientist*, 1:35-42, 1995.
24. MORCUENDE S, DELGADO-GARCIA JM, UGOLINI G: Neuronal premotor networks involved in eyelid responses: retrograde transneuronal tracing with rabies virus from the orbicularis oculi muscle in the rat. *J Neurosci*, 22:8808-8818, 2002.
25. MUNERA A, GRUART A, MUÑOZ MD, FERNANDEZ-MAS R, DELGADO-GARCIA JM: Hippocampal pyramidal cell activity encodes stimulus conditioned predictive value during classical conditioning in alert cats. *J Neurophysiol*, 86:2571-2582, 2001.
26. RESCORLA RA: Behavioral studies of pavlovian conditioning. *Annu Rev Neurosci*, 11:329-352, 1988.
27. THOMPSON RF, KRUPA DJ: Organization of memory traces in the mammalian brain. *Annu Rev Neurosci*, 17:519-549, 1994.
28. TRIGO J A, GRUART A, DELGADO-GARCÍA J M: Discharge profiles of abductors, accessory abductors, and orbicularis oculi motoneurons during reflex and conditioned blinks in alert cats. *J Neurophysiol*, 81:1666-1684, 1999.
29. TRIGO JA, GRUART A, DELGADO-GARCIA JM: Role of proprioception in the control of lid position during reflex and conditioned blink responses in the alert behaving cat. *Neuroscience*, 90:1515-1528, 1999.
30. WOODY CD: Understanding the cellular basis of memory and learning. *Annu Rev Psychol*, 37:433-493, 1986.