

El DNA dirigido a las proteínas de los receptores D2 de la corteza rinal bloquea de forma reversible el aprendizaje de indicaciones que predicen recompensas.

Zheng Liu*, Barry j. Richmond*, Elisabeth A. Murray*, Richard C Saunders*, Sara Steenrod*, Barbara K. Stubblefield^S, Deldra M. Montague¹, and Edward I. Ginns^{SI*}

Cuando las sesiones de varios intentos operantes tienen que ser completadas con éxito para obtener una recompensa, los monos aprenden rápidamente a ajustar su actuación de conducta mediante el uso de indicaciones visuales que señalan cuántos intentos se han completado y cuántos quedan por completar en la sesión en curso. Las ablaciones bilaterales de la corteza rinal (perirrinal y entorrinal) impiden de forma irreversible este aprendizaje. En este estudio aplicamos una técnica de DNA recombinante para investigar el papel del receptor de dopamina D2 en la corteza rinal para este tipo de aprendizaje. Se inyectó una construcción de ADN en la corteza rinal que disminuía de forma significativa la unión del ligando con el receptor de D2 y producía de forma temporal el mismo déficit de aprendizaje profundo que se observaba tras la ablación. Sin embargo, al contrario que en el caso de la ablación, los monos tratados con DNA cuyo blanco eran los receptores de D2 recuperaban la capacidad de aprendizaje con indicaciones tras 11-19 semanas. El hecho de inyectar una construcción de DNA que disminuía la unión entre ligando y receptor de N-metil-D-aspartato pero no la del receptor de D2, no interfirió con las asociaciones de aprendizaje entre las indicaciones y las sesiones. Un segundo tratamiento dirigido al receptor D2 administrado tras la recuperación del primer tratamiento a base de DNA dirigido a los receptores D2 (un mono), tras el tratamiento con DNA dirigido a los receptores de N-metil-D-aspartato (dos monos), o tras un tratamiento con el vector (un mono), indujeron también a un déficit de aprendizaje de la misma duración. Estos resultados sugieren que el receptor D2 en la corteza rinal de los primates es esencial para aprender a relacionar las indicaciones visuales con las sesiones. La especificidad de la manipulación de los receptores que se estudia aquí sugiere que este enfoque podría generalizarse en este u otro camino cerebral para relacionar los mecanismos moleculares con las funciones cognitivas

Corteza perirrinal - corteza entorrinal - antisentido - dopamina - receptor de N-metil-D-Aspartato

Los monos, de la misma forma que los humanos, aprenden rápido a utilizar las indicaciones para ajustar su comportamiento basado en cuánto trabajo se ha completado y cuánto trabajo queda (el volumen de trabajo relativo) para alcanzar el objetivo u obtener una recompensa (1-4). Debido al fuerte flujo de entrada por el camino visual ventral y por las proyecciones a la formación hipocámpal (5-13), la corteza rinal (perirrinal y entorrinal) se ha investigado a fondo por su papel en la memoria de reconocimiento visual (14) y la adquisición de asociaciones estímulo-estímulo (15-18). Además, nos interesó su papel en el aprendizaje relacionado con la recompensa por su densa innervación a base de fibras ricas en dopamina (19-22), las cuales parecen comenzar en la pars compacta de la sustancia negra/complejo del núcleo del tegmento ventral (23). Mediante la utilización de una tarea conductual, las sesiones con recompensa acompañadas con indicaciones visuales en las que los monos realizan múltiples pruebas operantes para obtener una recompensa al final de la sesión, demostramos que las ablaciones rinales bilaterales evitan que los monos aprendan a usar indicaciones visuales para llevar a cabo los ajustes conductuales en la sesión (2) y que las respuestas de neuronas aisladas en la corteza perirrinal del mono reflejan una relación entre la indicación visual y el progreso a lo largo de la sesión, esto es, volumen de trabajo relativo (3). Estos últimos dos estudios nos llevan a concluir que la corteza rinal de los monos tiene un papel decisivo para establecer las asociaciones entre indicaciones visuales y esta forma de contingencia mediante una recompensa.

Para poner a prueba la hipótesis de que la dopamina (en este caso el receptor D2) es decisiva para establecer estas asociaciones, necesitamos un método para manipular los receptores de dopamina durante el periodo en el que los monos normalmente aprenden a asociar indicaciones visuales con el volumen de trabajo relativo. Hasta ahora, el enfoque principal para la conexión entre los mecanismos receptores y el comportamiento ha sido la intervención farmacológica. Para los experimentos que describimos aquí, el enfoque farmacológico convencional utilizando ligandos (en este caso un antagonista), es difícil de aplicar. Los efectos farmacológicos tienen un tiempo de vida relativamente corto, con una vida media de acción del orden de minutos hasta pocas horas, mientras que el proceso de aprendizaje que estamos estudiando requiere un margen de una semana o más para ser observado (2). Además, cuando la localización anatómica es necesaria, a la vez que aconsejable para nuestros cuatro experimentos, el agente farmacológico necesita ser inyectado localmente y el efecto del agente está generalmente limitado a regiones a pocos milímetros alrededor de los puntos de inyección. En este estudio necesitábamos tratar toda la corteza rinal, que es una franja de corteza de aproximadamente 15mm de longitud y unos 7-12mm de ancho, dependiendo de la posición rostral-caudal. Cubrir esta región de forma adecuada con un agente farmacológico requeriría muchas inyecciones (alrededor de 40; ver el *Text of Support* publicado como información de apoyo en la página web de PNAS), y para los agentes que tengan un tiempo de vida corto, las inyecciones deberían repetirse a diario durante varias semanas a lo largo de las pruebas conductuales. Aunque es probable que cada grupo de inyecciones cause sólo un daño tisular pequeño, el daño tisular acumulado a lo largo de todas las semanas podría ser sustancial, de ese modo las inferencias sobre la causa de cualquier daño en el comportamiento serían más dudosas.

Teniendo en cuenta estos requisitos experimentales, adaptamos un enfoque molecular que ha sido utilizado con éxito para disminuir la conexión al ligando por parte del receptor D2 de mureina (24-26). En el ratón, las inyecciones intraestriales de una construcción de expresión antisentido de ADN dirigida al recep-

tor de D2 fueron acompañadas de cambios en los comportamientos mediados por D2, incluyendo la catalepsia y el comportamiento de escalada (*climbing* en inglés), que duraron varias semanas. La conexión del ligando al receptor D2 se alteró paralelamente con los resultados conductuales (25, 26). La especificidad y la larga duración de los efectos observados al usar esta técnica sugirieron que podría tratarse de un enfoque particularmente atractivo para aplicar a los experimentos de aprendizaje en primates.

En este estudio, se inyectó en la corteza rinal del mono construcciones de expresiones antisentido de ADN diseñadas para interferir en la formación de receptores de dopamina D2 funcionales y/o los receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA) (24). Después probamos si este tratamiento afectaba al aprendizaje de la asociación de indicaciones visuales sobre el volumen de trabajo relativo. Examinamos la dopamina por dos razones. La primera es que se cree que la dopamina tiene un papel importante en el comportamiento relacionado con la recompensa (27-29), y, la segunda, que la dopamina está presente en cantidades relativamente elevadas en la corteza rinal de los primates (19-22). Aunque el receptor D1 se ha implicado a menudo como promotor del aprendizaje por asociación, nos centramos inicialmente en el receptor D2 por dos razones. La primera, que el receptor D2 muestra una distribución característica que incrementa la densidad en las capas profundas de la corteza rinal, lo que sugiere que este subtipo de receptor puede tener un papel especial en este tejido, mientras que el receptor D1 muestra una distribución más difusa y con un pico menos denso (20, 21).

La segunda, y muy importante para nosotros, era que el tratamiento de ADN, cuyo blanco era el receptor de D2, tuvo un efecto suficiente en los receptores D2 en un modelo de mureina acompañado de grandes consecuencias en el comportamiento motor (24-26), lo que nos llevaba a creer que el material dirigido al D2 podía ser efectivo también en el mono. Desde que se emprendió nuestro estudio, ha surgido nueva información que demuestra que el receptor de D2 puede jugar un papel importante en la regulación del aprendizaje asociativo (30).

El receptor de NMDA fue elegido como blanco alternativo porque también es abundante en la corteza rinal (31), y una fuerte hipótesis alternativa sugiere que los receptores de NMDA son decisivos para algunos aspectos del aprendizaje asociativo (32-34). Finalmente, el uso de dos agentes proporcionaba una forma de evaluar la especificidad de los tratamientos con ADN, en el caso de tener efectos en la conducta.

En este estudio, las inyecciones de construcciones de ADN en la corteza rinal redujeron la cantidad de conexiones de ligandos dirigidas a los receptores D2 o NMDA. Además, el tratamiento a base de ADN con los receptores de D2 como objetivo causaron el mismo déficit de aprendizaje conductual, tal y como ocurre tras ablaciones bilaterales de la corteza rinal, con la notable diferencia de que los monos se recuperan completamente varias semanas después del tratamiento (11-19). Por el contrario, el tratamiento a base de ADN con los receptores de NMDA como objetivo no afectó al aprendizaje. La explicación más lógica de nuestros resultados es que un mecanismo mediado por dopamina que incluya el receptor D2 es esencial para el aprendizaje de asociación de indicaciones visuales con el volumen de trabajo relativo.

Materiales y métodos

Equipo experimental. Monos Rhesus sentados en una silla para primates de cara a una pantalla de proyección trasera (90° x 90°) localizada a 57cm. Un fondo de pantalla con un punto blanco o negro al azar cubría toda la pantalla. Una palanca que se accionaba mediante el tacto, montada dentro de la silla del primate a la altura de la cintura, servía para registrar las respuestas de los monos. Se puso un dispensador enfrente de los monos para proporcionarles una gota de agua (0,4ml) como recompensa.

Preparación del animal. Se utilizaron siete monos. Antes del adiestramiento o pruebas conductuales, se practicó a cada mono extirpación unilateral de la corteza rinal. Esto se hizo para hacer que el conjunto de inyecciones fuera técnicamente menor que en el caso de tratar ambos hemisferios con ADN. Como se

anticipó en informes anteriores en los que las ablaciones corticales unilaterales se hicieron a los monos antes del adiestramiento o examen, los monos con ablaciones unilaterales de la corteza rinal aprendieron la tarea que les propusimos en un porcentaje similar al de los monos intactos (ver *Text of Support*). Todos los experimentos con animales se llevaron a cabo de acuerdo con las indicaciones de los Institutos Nacionales de Salud y se aprobaron por el National Institute of Mental Health, Animal Care and Use Committee (Instituto Nacional de Salud Mental, Cuidado de Animales y Comité de Uso).

Comportamiento: Sesiones de recompensas mediante indicaciones visuales. Se pidió a los monos que llevaran a cabo sesiones mezcladas de uno, dos o tres intentos de pruebas operantes idénticas para obtener una recompensa (refs. 1 y 2; Fig. 1a). En cada intento, cuando el mono tocaba la palanca, una indicación visual aparecía mostrando qué intento se estaba llevando a cabo en la sesión en curso. Para completar el intento correctamente, el mono tenía que soltar la palanca cuando un punto rojo que aparecía en el centro de la indicación cambiaba a verde. Un punto azul reemplazaba rápidamente al verde en los intentos correctos. Si la palanca era liberada demasiado rápido o después de que la luz verde desapareciera, el intento se contaba como incorrecto y se repetía. Se le proporcionaba una gota de líquido como recompensa tras completar correctamente el último intento de una sesión (Fig. 1a; ver Texto de Apoyo para más detalles). Los grupos de indicaciones se muestran en la Fig. 1b.

Inyecciones Corticales Rinales. Se construyeron ADNs dirigido a los receptores de NMDA y D2 y se inyectaron para cubrir la zona de la corteza rinal tal y como se describe en la información de apoyo.

Autoradiografía de unión del receptor. Se utilizaron dos monos experimentalmente vírgenes para las autoradiografías de radioligandos unidos a receptores de NMDA y D2 utilizando los métodos estándar (ver *Text of Support*). Cada uno recibió inyecciones de ADN de un solo tipo.

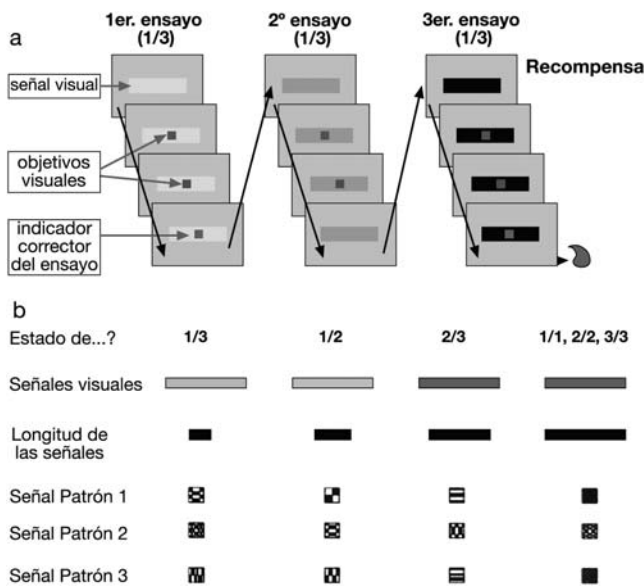


Fig. 1. Proceso de sesiones con recompensa mediante indicaciones visuales. (a) diagrama esquemático de una sesión de tres intentos con indicaciones luminosas. En cada intento, el mono tenía que responder cuando un objetivo visual cambiaba de rojo a verde (ver Materiales y Métodos para más detalles). El mono empezaba cada intento presionando una palanca. Un intento contaba como correcto si el mono soltaba la palanca 200-1.000ms después de que el objetivo verde (objetivo visual) apareciera. Si el intento se había llevado a cabo correctamente aparecía un punto azul (indicador de intento correcto) en el lugar del objetivo verde. Se proporcionaba una gota de agua (recompensa) sólo después de que el tercer intento de la sesión se hubiera completado correctamente. Se asignó a cada intento una indicación visual; la indicación mostraba cuántos intentos se habían realizado y cuántos quedaban por completar antes de obtener la recompensa (trabajo relativo). En el ejemplo mostrado aquí, el rectángulo gris claro es la indicación de la fase 1/3 de la sesión, el rectángulo gris oscuro es la indicación para la fase 2/3, y el rectángulo negro es la indicación para la fase 3/3, donde la fracción de la sesión indica en el numerador el número del intento y en el denominador la duración de la sesión. (b) Los cinco conjuntos de indicaciones visuales utilizados en este estudio. En la fila de arriba se muestra las fases de las sesiones que se corresponden con las indicaciones.

Análisis de los datos. Se recogieron y analizaron los datos sobre el comportamiento de todas las sesiones en las que los monos fueron examinados mediante programas de recompensa indicada visualmente. La actuación de cada mono se evaluó individualmente utilizando el test X^2 con las cifras de intentos correctos y fallidos. Los análisis de grupo se examinaron utilizando repetidas mediciones ANOVA con errores porcentuales (índice de error) de cada mono de cada grupo. Para los estudios de las uniones de los receptores, se evaluaron las diferencias de la densidad óptica mediante el uso del test t (pareado de una cola). Se examinaron todas las estadísticas a niveles de $P = 0,05$.

Resultados

A la segunda semana de haber introducido las sesiones de recompensa, la cifra de errores que cometía cada mono estaba directamente relacionada con el número de

intentos que quedaba por hacer antes de recibir la recompensa (Fig. 2a; para datos de los individuos ver Fig. 4, que se publica como información de apoyo en la página web de PNAS). Los monos hacían menos errores progresivamente a la vez que disminuía el número de intentos restante antes de recibir su recompensa (es decir, en los intentos más cercanos a la recompensa), y cometían menos errores en el intento final de cada sesión, que es cuando recibían la recompensa. Para cada uno de los siete monos, el número de errores era significativamente diferente a lo largo de los tres estados de la sesión sin recompensa, es decir, las fases 1/3, 1/2, y 2/3 (test X^2 , $P < 0,05$ para cada mono; las fracciones de la fase de la sesión, 1/3, 2/3, 3/3, 1/2, 2/2, y 1/1, indican el número del intento en el numerador y la duración de la sesión en el denominador). El número de errores no resultó estadísticamente distinguible en todas las fases de la sesión en las que había recompensa (1/1, 2/2, 3/3), sin importar qué sesión (uno, dos o tres intentos) se estaba llevando a cabo (test X^2 , $P > 0,05$).

Finalmente, el número de errores para cada una de las fases de la sesión resultó significativamente diferente según qué intento de la sesión se estuviera realizando (test X^2 , $P < 0,05$). Para el grupo entero de monos, la relación entre la tasa media de error y la fase de la sesión fue siempre la misma desde la segunda semana a la cuarta semana de estudio (término de interacción de un ANOVA en dos direcciones, $F_{10,125} = 0,329$, $P = 0,97$; Fig. 2a). Los patrones de aprendizaje y actuación de los siete monos, a los que se había extirpado unilateralmente la corteza rinal antes de iniciar el adiestramiento, eran similares a los observados en monos intactos (1, 2).

Por ejemplo, el aprendizaje y la actuación no eran distinguibles del aprendizaje inicial mostrado por los cinco monos intactos en nuestro estudio de ablaciones anteriores (ref. 2; término de interacción de un ANOVA en dos direcciones, $F_{5,71} = 1,74$, $P = 0,14$).

Tal y como se ha visto anteriormente (1), el índice de error era mayor en la fase 1/2 que en la 2/3 para los siete monos (test t pareado de una cola, $df = 6$, $t = 1,94$, $P < 0,1$). De esta manera, los índices de error dependen no sólo del número de intentos que hay que completar antes de recibir una recompensa, sino también del número de

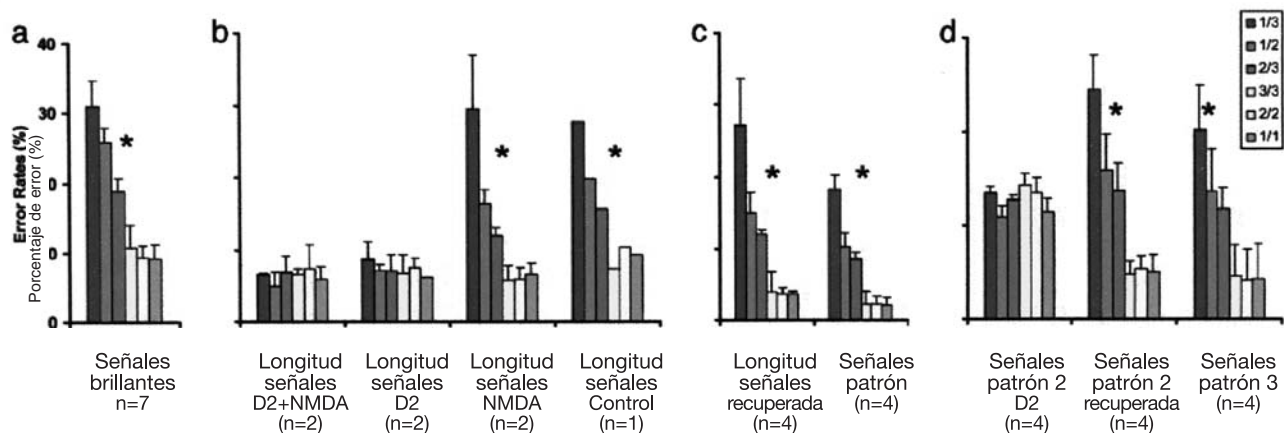


Fig. 2. Índices de error en monos realizando las sesiones de recompensa con indicaciones visuales en las diferentes condiciones. Cada barra representa el índice de error medio para esa fase de la sesión; las barras de error son SEMs. Los asteriscos (*) marcan las condiciones en las que los índices de error eran distinguibles (ANOVA de un sólo factor, $P < 0,05$) a lo largo de las fases de la sesión, indicando que los monos utilizaban las indicaciones para ajustar su conducta (ver el texto para más detalles). (a) Índices de error de monos utilizando indicaciones luminosas en la cuarta semana de pruebas tras la introducción de indicaciones antes de ser tratados. (b) Índices de error de diferentes grupos de monos utilizando indicaciones de duración en la octava semana tras serles administrados construcciones de ADN en la corteza rinal, esto es, la cuarta semana tras la introducción de las indicaciones de duración. Se inyectó a los grupos de monos con lo siguiente: (i) una mezcla de construcciones dirigidas a los receptores de D2 y NMDA (indicaciones de duración, D2 + NMDA); (ii) construcciones dirigidas a los receptores D2 (indicaciones de duración, D2), (iii) construcciones dirigidas a los receptores de NMDA (indicaciones de duración, NMDA), y (iv) vector (indicaciones de duración, control). Los monos que recibieron o bien construcciones dirigidas a los receptores de D2+NMDA, o bien construcciones dirigidas a los receptores D2 sufrieron daños en el aprendizaje de asociaciones entre las indicaciones visuales y el volumen de trabajo esperado antes de recibir recompensa. (c) Índices de error de los cuatro monos que recibieron construcciones dirigidas a los receptores de D2 tras una recuperación conductual. Se obtuvo los datos durante la primera semana después de que la actuación se recuperara del efecto de tanto la mezcla de construcciones dirigidas a los receptores D2 y NMDA como de las construcciones dirigidas únicamente a los receptores D2 ($\approx 12-20$ semanas tras la inyección)(indicaciones de duración, recuperados), y durante la tercera semana después de haber introducido las nuevas indicaciones a los mismos monos (indicaciones patrón). (d) Índice de error de los monos que recibieron el segundo tratamiento a base de construcciones dirigidas a los receptores D2 (D2, $n = 3$; y mezcla de D2 y NMDA, $n = 1$). Se obtuvo los datos (indicaciones patrón 2, D2) durante la octava semana después del tratamiento y demuestran que los monos no utilizaron las indicaciones para ajustar su conducta. Los datos (indicaciones patrón 2, recuperados) fueron obtenidos de los mismos monos durante la 12ª semana después de la inyección, que es la primera semana tras la recuperación de la actuación del efecto de los tratamientos, y durante la tercera semana tras la introducción de las nuevas indicaciones (indicaciones patrón 3).

intentos ya completados en el programa en curso, es decir, el volumen de trabajo relativo. En general, los patrones de error indican que los monos utilizaron las indicaciones visuales para ajustar su conducta basada en el volumen de trabajo relativo.

Tras 4 semanas de pruebas con las sesiones de recompensa, cada mono recibió una serie de inyecciones para introducir uno de los cuatro siguientes agentes en la corteza rinal del hemisferio intacto: (i) ADN dirigido a los receptores de NMDA y dopamina D2 ($n = 2$ monos); (ii) ADN dirigido únicamente al receptor D2 ($n = 2$); (iii) ADN dirigido al receptor de NMDA ($n = 2$); o (iv) sólo un vector ($n = 1$). 0,98). Así, los monos que recibieron tratamiento dirigido a los receptores de NMDA de la corteza rinal o sólo el vector, aprendieron los nuevos conjuntos de indicaciones de una forma similar a la observada antes del tratamiento, lo que indicaba que estos tratamientos no tenían ningún efecto. Contrariamente, los cuatro monos que recibieron tratamiento dirigido a los receptores de D2 (los del tratamiento dirigido a los receptores de NMDA y de D2, $n = 2$; y los dirigidos a los receptores de D2, $n = 2$) fallaron al ajustar sus índices de error a lo largo de los diferentes estados de la sesión

durante las semanas comprendidas entre la 11 y la 19 tras las inyecciones (ver Text of Support). Los datos obtenidos en la cuarta semana posterior a la introducción de la indicación de duración (octava semana tras la inyección) se muestran en la Fig. 2b (ANOVA de un solo factor, $F_{5,23} = 0,368$). Durante las semanas 11-19 tras las inyecciones, los monos que habían recibido construcciones de ADN dirigidas a los receptores de D2 mostraron el mismo déficit al asociar las indicaciones visuales con las sesiones de recompensa, tal y como se había observado en los monos con extirpaciones bilaterales de la corteza rinal (2).o sólo el vector, aprendieron los nuevos conjuntos de indicaciones de una forma similar a la observada antes del tratamiento, lo que indicaba que estos tratamientos no tenían ningún efecto.

Contrariamente, los cuatro monos que recibieron tratamiento dirigido a los receptores de D2 (los del tratamiento dirigido a los receptores de NMDA y de D2, $n = 2$; y los dirigidos a los receptores de D2, $n = 2$) fallaron al ajustar sus índices de error a lo largo de los diferentes estados de la sesión durante las semanas comprendidas entre la 11 y la 19 tras las inyecciones (ver Text of Support)

Los datos obtenidos en la cuarta semana posterior a la introducción de la indicación de duración (octava semana tras la inyección) se muestran en la Fig. 2b (ANOVA de un solo factor, $F_{5,23} = 0,368$). Durante las semanas 11-19 tras las inyecciones, los monos que habían recibido construcciones de ADN dirigidas a los receptores de D2 mostraron el mismo déficit al asociar las indicaciones visuales con las sesiones de recompensa, tal y como se había observado en los monos con extirpaciones bilaterales de la corteza rinal (2). Tras recuperar la capacidad de utilización de las indicaciones, la conducta fue estable; las relaciones entre el índice de error medio y la fase de la sesión fue la misma de la primera a la tercera semana después de que se aprendieran las indicaciones (término de interacción entre la fase del programa y semana de pruebas en un ANOVA de dos direcciones, $F_{10,71} = 0,367$, $P = 0,96$). De esta manera, aunque el efecto de este tratamiento con ADN dura varias semanas, es, sin embargo, temporal.

Para determinar si el reaprendizaje fue causado por varias semanas de práctica con un conjunto específico de indicaciones y no por una recuperación del tratamiento, se mostró a los cuatro monos recuperados un nuevo conjunto de indicaciones con otro patrón (patrón de indicaciones 1; Fig. 1b). Tras dos semanas de prácticas con las nuevas indicaciones, la relación entre el índice de error y la fase de la sesión no era distinguible de la observada con el juego de indicaciones inicial (indicaciones luminosas) antes de las inyecciones (término de interacción de un ANOVA en dos direcciones, $F_{5,47} = 0,736$, $P = 0,60$; Fig. 2c). El descubrimiento de que la capacidad de aprender nuevas indicaciones se recupera tras un tratamiento y muestra el mismo índice de error que antes del tratamiento a base de ADN, sugiere claramente que el tratamiento a base de ADN dirigido a los receptores D2 tiene un tiempo de vida limitado, un efecto reversible en la conducta cognitiva.

Finalmente, como procedimiento de control con la intención de determinar si los monos que recibieron tratamiento dirigido a los receptores D2 podían distinguir las indicaciones de duración, se utilizaron rectángulos en las indicaciones de duración en lugar de los puntos

verdes y rojos de los intentos discriminatorios. Con los dos rectángulos con menor duración menos dentro de las indicaciones de duración, los monos consiguieron discriminar las indicaciones con un $< 90\%$ de respuestas correctas en la primera sesión de pruebas.

Para ir más lejos y demostrar que el tratamiento a base de ADN dirigido a los receptores D2 era el responsable de estas alteraciones reversibles de la conducta, se inyectó una segunda inyección con la combinación de construcciones dirigidas a los receptores D2 y los de NMDA ($n = 1$) o con construcciones dirigidas únicamente a los receptores D2 ($n = 3$), a cuatro de los siete monos ya inyectados previamente (uno había recibido con anterioridad una construcción dirigida a los receptores de D2, dos habían recibido previamente construcciones dirigidas a los receptores de NMDA, y el último había recibido solo el vector; para más detalles ver la Tabla 1, que está publicada como información de apoyo en la página web del PNAS). Los cuatro monos mostraron un periodo prolongado durante el cual un conjunto nuevo de indicaciones visuales (indicaciones patrón 2; Fig. 1b) no consiguió guiar su comportamiento (Fig. 2d). Como anteriormente, los cuatro animales aprendieron este juego de indicaciones tras un mínimo de 11 semanas después de las inyecciones (Tabla 1). Subsecuentemente, los cuatro monos aprendieron un quinto conjunto de indicaciones (indicaciones patrón 3; Fig. 1b) durante la primera semana después de la introducción.

Para examinar si los tratamientos a base de ADN realmente afectaban a los receptores diana, medimos la unión de los receptores utilizando dos monos rhesus experimentalmente vírgenes (ver el epígrafe Materiales y Métodos y Text of Support). Las autoradiografías de uniones [125I] yodosulpirida en un cerebro tratado con ADN dirigido a los receptores de D2 mostraban un descenso significativo en la densidad de uniones de ligandos en la corteza rinal del hemisferio tratado, en comparación con el hemisferio no tratado (de control) (Fig. 3 a y b; lado tratado con ADN dirigido a los receptores D2, $57,3 \pm 3,5$ nCi (nCi = nanocuries; media \pm SEM; $n = 36$ mediciones por lado; lado de control, $73,1 \pm 5,0$ nCi; test t pareado, $t_{47} = -3,5$, $p = 0,0005$).

Las autorradiografías de las uniones [3H]MK-801 de un cerebro tratado con ADN dirigido a los receptores de NMDA mostraron un descenso significativo en la densidad de uniones de ligandos en la corteza rinal del hemisferio tratado, en relación al hemisferio no tratado (Fig. 3c; lado tratado con ADN dirigido al receptor de NMDA, $12,8 \pm 0,4$ nCi; lado de control, $14,7 \pm 0,4$ nCi; test t pareado $t_{47} = -3,1$, $P = 0,0015$). Además, el tratamiento con ADN dirigido a los receptores de NMDA no alteró la densidad de unión del ligando al receptor D2 (Fig. 3d; lado tratado con ADN dirigido a la unión del receptor de D2 con el receptor de NMDA, lado tratado con ADN, $197,9 \pm 10,6$ nCi; unión del receptor D2 en el lado de control, $200,2 \pm 10,2$ nCi; test t pareado, $t_{47} = -0,5$, $P = 0,229$).

Discusión

Hemos demostrado que el tratamiento de la corteza rinal con una construcción de ADN diseñada para reducir la función del receptor D2 conlleva un importante, aunque reversible, déficit en el aprendizaje de la asociación de indicaciones visuales con el trabajo relativo, esto es, el número de intentos que se ha completado y el número de intentos que quedan por realizar en la sesión en curso. Cabe resaltar que estos animales mostraron una recuperación de la función cognitiva entre las semanas 11 y 19 posteriores al tratamiento, mientras que en el estudio previo, en el que se realizaron ablaciones bilaterales, los monos no se habían recuperado 32 semanas después de las ablaciones, momento en el que el estudio terminó. La conclusión de que hemos provocado un déficit de aprendizaje reversible a partir de una alteración en la función de los receptores de D2 se apoya en dos descubrimientos básicos: (i) nuestro tratamiento disminuyó la unión del ligando al receptor de D2 en la corteza rinal de forma significativa, y (ii) el efecto del tratamiento fue temporal, aunque reinstalable.

Paradigma conductual. Las indicaciones visuales proporcionan información sobre el número de intentos que queda por completar antes de recibir la recompensa, y en el primer intento de una sesión la indicación es la única fuente. El patrón de error indica que los monos utilizaban las indicaciones visuales para ajustar su conducta. Aunque utilizamos un proceso de condicionamiento operante y enfatizamos el papel de la corteza rinal en la asociación de indicaciones visuales con el trabajo relativo, se sabe que los procesos de condicionamiento operante a menudo tienen características comunes con el proceso de condicionamiento Pavloviano, aunque no resulta estrictamente necesario separar estos procesos (35).

En las sesiones con indicaciones visuales y recompensa, tanto en la fase 1/2 como en la 2/3 queda únicamente un intento para la fase con recompensa, aunque los monos intactos cometen menos errores en la fase 2/3 de la sesión, lo que demuestra que el número de intentos ya completados en una sesión afecta la actuación conductual (comparar Fig. 3), que es una relación condicionante ya observada (1, 2, 4). De esta manera, la actuación del mono refleja el aprendizaje de la relación entre las indicaciones visuales y el trabajo relativo, en contraposición al tiempo previo a la recompensa en sí mismo. Todavía queda por esclarecer cómo este patrón conductual depende de la relación existente entre el proceso de condicionamiento Pavloviano y los procesos operantes.

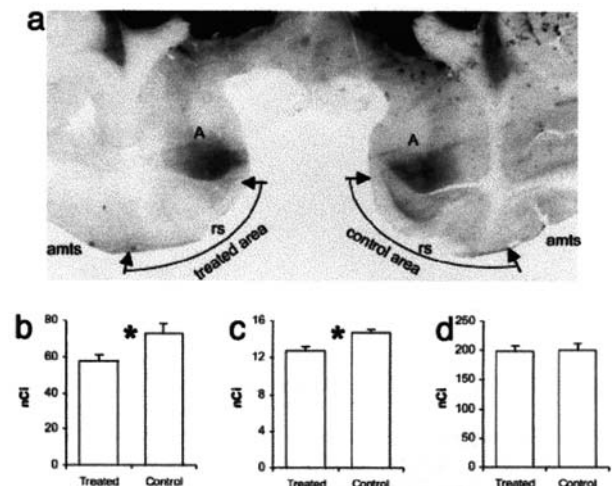


Fig. 3. Autoradiografía de la unión del receptor. (a) Autoradiografía de una sola sección del cerebro del mono tratado con construcciones de ADN dirigidas al receptor D2 que muestra la unión del ligando con el receptor D2 mediante [125I] yodosulpirida. La corteza rinal en el hemisferio izquierdo (entre las dos flechas) fue tratada con ADN dirigido a los receptores D2. Existe un descenso significativo en la densidad de unión del ligando al receptor d2 en la corteza rinal del hemisferio tratado con relación al hemisferio no tratado. Rs indica el surco rinal, amts indica el surco temporal mediano anterior, y A marca la amígdala. (b) La densidad óptica de la unión del ligando al receptor D2 en la corteza rinal del mono tratado con construcciones de ADN dirigidas a los receptores D2. Se muestra las medias y los SEMs de la densidad mediana de la unión del ligando al receptor D2 en la corteza rinal tratada con construcciones dirigidas a los receptores D2 (tratada) y en la corteza rinal no tratada (control). El lado tratado tiene una densidad significativamente menor de unión del ligando al receptor D2 que el lado no tratado. (c) Densidad óptica del ligando unido al receptor de NMDA en la corteza rinal del mono tratado con construcciones de ADN dirigidas a los receptores de NMDA. El tratamiento con ADN dirigido a los receptores de NMDA reduce la unión MK801 significativamente. (d) Densidad óptica de la unión del ligando al receptor D2 en la corteza rinal del mono tratado con construcciones de ADN dirigidas a los receptores de NMDA. El tratamiento a base de ADN dirigido a los receptores de NMDA no afectó a la unión del ligando al receptor de D2 (test t pareado, $P = 0,6$). Este descubrimiento indica que el tratamiento con las construcciones de ADN dirigidas a los receptores de NMDA no tiene un efecto inespecífico sobre la unión del ligando al receptor D2. El asterisco (*) indica una diferencia significativa entre los dos hemisferios (test t pareado, $P < 0,05$).

Enfoque molecular biológico en monos. El coste y el limitado suministro de monos hace que no sea práctico utilizar un gran número de primates no humanos para llevar a cabo caracterizaciones celulares y biológicomoleculares amplias. Sin embargo, obtuvimos la histoquímica de los ligandos para examinar la especificidad de los tratamientos a base de construcciones dirigidas a receptores concretos. La histoquímica muestra que los tratamientos a base de construcciones de ADN reducen significativamente la densidad de uniones específicas de los receptores diana a los ligandos. El descenso en número ($\approx 20\%$ para los de D2) de los receptores tras el tratamiento con ADN dirigido a los receptores de D2 era virtualmente idéntico al descenso ($\approx 18\%$) observado tras utilizar una técnica similar en el striatum del ratón, lo que conlleva cambios marcados en la conducta motora (25). Así, aunque el descenso observado en la unión de los ligandos no sea dramático, nuestro estudio es la segunda circunstancia en la que se ha observado un grado de reducción en la unión a ligandos que refleje un cambio suficientemente grande en la unión de los receptores como para ocasionar cambios conductuales claramente apreciables. Además, el tratamiento con ADN dirigido a los receptores de NMDA disminuyó la unión de ligandos con NMDA pero no con D2. Todos estos hechos puestos en común sugieren que el descenso en la cantidad de receptores de D2 funcionales fue específico y suficientemente importante como para producir un efecto. Aunque la cantidad de uniones de ligandos a NMDA y D2 se redujo de forma significativa, los resultados que obtuvimos en las autoradiografías no permiten determinar el número absoluto de receptores funcionales en el tejido diana porque algunos ligandos permanecieron sin unión. No obstante, es posible que el déficit conductual sea una consecuencia del descenso de uniones a los receptores D2. Para la falta de efecto del material NMDA, existen dos posibles explicaciones: que los receptores de NMDA tal y como se alteraron con este material no tengan ningún papel en esta conducta, o que la manipulación de NMDA no disminuya la densidad suficientemente como para causar un efecto conductual observable en este proceso.

La conducta de los monos tratados con ADN dirigido a los receptores D2 se interrumpía solo temporalmente. Existen dos razones que nos llevan a creer que la recuperación conductual fue causada por una recuperación funcional de los receptores D2, más que por una utilización de otros mecanismos o regiones del cerebro. La primera es que después de cada recuperación, los monos aprendieron los subsiguientes nuevos juegos de indicaciones a los mismos niveles que los monos intactos. La segunda es que en uno de los monos, un segundo tratamiento dirigido a los receptores D2 de la corteza rinal restableció el déficit de aprendizaje. Estos dos descubrimientos puestos en común sugieren que la corteza rinal media en el nuevo aprendizaje de un nuevo conjunto de indicaciones tras una recuperación. Si esto fuera así, el restablecimiento de la función de los receptores D2 sería la explicación más parca para la recuperación de las capacidades cognitivas aquí evaluadas.

También parece poco probable que el déficit conductual surja como consecuencia de daños mecánicos debidos a las inyecciones por tres razones. La primera es que ni el tratamiento con ADN dirigido a los receptores de NMDA ni el tratamiento con solo el vector tuvo efecto alguno, a pesar de que el daño mecánico debería haber sido comparable al producido por el tratamiento dirigido a los receptores de D2. La segunda es que la recuperación conductual seguida por un restablecimiento del déficit y alguna otra recuperación es incoherente con daños mecánicos de efectos permanentes (2). Finalmente, la cantidad de daño tisular observado en exámenes histológicos postmórtem de la corteza rinal en los casos en que la usamos para la histoquímica fue leve, y consistía en el rastro de la aguja de la inyección con gliosis leves alrededor de estos rastros.

También consideramos también la posibilidad de que un déficit perceptivo interfiriera con las capacidades de aprendizaje de indicaciones de los monos. Existen tres pruebas que contradicen esta idea. La primera es que los monos nunca mostraron dificultades con las discriminaciones rojo-verde.

De hecho, tras el tratamiento con ADN dirigido a los receptores D2, sus actuaciones realmente mejoraron en el hecho de que cometieron menos errores. La segunda es que los monos que padecían daños en el aprendizaje de las asociaciones entre las indicaciones y el trabajo relativo actuaron bien cuando se cambiaron las mismas indicaciones por las de colores en los intentos discriminatorios. De esta manera, los monos no encontraron dificultad al discriminar las indicaciones visuales entre ellas. La tercera es que estudios anteriores han demostrado que los monos con extirpaciones bilaterales de la corteza rinal pueden aprender problemas discriminatorios visuales con el mismo éxito que los monos intactos (36-39). Por lo tanto, es posible que el déficit que observamos sea específico para el aprendizaje de asociaciones entre indicaciones visuales y trabajo relativo, en contraposición al daño perceptivo visual.

Aunque nuestros experimentos no revelan la manera en la que el receptor D2 permite este aprendizaje, varios estudios recientes utilizando roedores o porciones de tejido de roedor han demostrado que los receptores D2 interfieren con la despotenciación (40), pueden mediar en depresiones a largo plazo (LTD, del inglés Long-Term Depression) (41), pueden tener un papel en la consolidación de la memoria (42), y pueden tener un papel en la inducción de potenciación efímera (duración menor a 4h) o de la forma “débil” de potenciación a largo plazo (LTP, del inglés Long-Term Potentiation) (40). Los descubrimientos en estos otros estudios que muestran un papel importante de los receptores de D2 en la formación de la memoria y LTP/LTD en experimentos conductuales, hacen particularmente interesante el diseño y la realización de experimentos fisiológicos adecuados para investigar la conexión entre los receptores D2 y el tipo de aprendizaje asociativo de nuestro estudio. Finalmente, un estudio reciente demuestra que la manipulación de los receptores D2 afecta a la actividad de neuronas aisladas en la corteza prefrontal durante un proceso de trabajo

de memoria en una sacada retrasada (43). Wang et al. (43) sugieren que la actividad afectada está relacionada con la actividad motora, que está a su vez relacionada con la sacada más que con una recompensa. Dados nuestros resultados que demuestran que los receptores de D2 son necesarios para aprender que las indicaciones tienen relación con la predicción de recompensa, sería más coherente que la actividad neural prefrontal estuviera relacionada con haber aprendido la asociación entre las indicaciones, la sacada y la recompensa.

Objetivos moleculares de los receptores. El mecanismo o mecanismos moleculares precisos de acción de las construcciones antisentido de ADN están todavía por identificar, incluso en el ratón. A pesar de ello, cada uno de nuestros ocho tratamientos a base de ADN dirigido a los receptores D2 (únicamente receptores D2: cuatro monos con un total de 5 tratamientos; receptores de D2 + NMDA: tres monos con un tratamiento cada uno) iba seguido por un grave, aunque temporal, daño en el aprendizaje de asociaciones entre indicaciones visuales y trabajo relativo. Por el contrario, el tratamiento a base de ADN dirigido a los receptores NMDA (dos monos con un tratamiento cada uno) o consistente en solo el vector (un mono con un tratamiento) no tuvieron efecto alguno sobre el aprendizaje. Este efecto repetido en nuestros tratamientos con construcciones dirigidas a los receptores D2 sugiere un mecanismo consecuente.

Las construcciones de ADN utilizadas en este estudio estaban diseñadas para interferir específicamente con la producción de receptores funcionales de D2 o NMDA. Un mecanismo de acción posible es que la secuencia antisentido de ADN dirigido a los receptores en cada construcción produjera ácido nucleico complementario, y que hibridara con la secuencia respectiva a las transcripciones de los receptores de D2 o NMDA celulares. De forma alternativa, la construcción de ADN podría unirse directamente a las transcripciones de receptores celulares.

Cualquiera de los dos mecanismos podría inutilizar las transcripciones diana para una traducción a proteínas de los receptores de D2 o NMDA normales (25, 26) mediante una serie de mecanismos que incluyen el bloqueo de la iniciación de la traducción, o mediante la activación de una segmentación endógena mediada por RNasaH del ARN diana (44). Nuestros coherentes resultados en monos macacos deberían proporcionar un incentivo adicional a caracterizaciones adicionales de los mecanismos mediante los cuales surge la especificidad de dianas del ADN. Los enfoques que utilizan el ARN de pequeña interferencia (en inglés siRNA, de Short Interfering RNA) son también útiles para la alteración de expresiones genéticas, pero no está claro cuál puede ser la relación de los mecanismos moleculares de las técnicas de este estudio con los caminos postulados como responsables de los efectos del siRNA.

En los estudios farmacológicos convencionales, los efectos de los ligandos ocurren porque éstos interactúan y se unen a un receptor. Cualquier falta de especificidad por un receptor conlleva efectos secundarios asociados que ocurren porque la estructura terciaria/cuaternaria del ligando permite que se una a diferentes subtipos de receptores. En nuestros experimentos, la especificidad viene dada presumiblemente por un descenso inducido de la cantidad de una proteína en concreto del receptor, con lo cual se reduce la cantidad de receptor funcional. Puesto que es posible que el mecanismo de acción esté específicamente relacionado con algún aspecto de la secuencia de ácidos nucleicos, deberíamos esperar una especificidad relajada solo si las secuencias que codifican proteínas fueran similares. Las secuencias de NMDA y D2 de nuestras construcciones no son homólogas (ver Text of Support); tampoco existe una homología importante entre la familia de las secuencias de los receptores D1 y D2 (45), así que parece poco probable que el ADN dirigido a los receptores de D2 haya podido afectar al funcionamiento de la familia de los receptores de D1 (incluyendo D5). Cabría estudiar si algún otro receptor de dopamina con una secuencia similar a la de la proteína del receptor de D2 ha jugado algún papel, por ejemplo el receptor D3 o el D4.

Puesto que no tenemos constancia de que la aplicación de este enfoque molecular haya sido utilizado antes en monos, sería interesante comparar los resultados de este tratamiento a base de ADN recombinante con dianas con los resultados de los clásicos agentes farmacológicos inculcados que están dirigidos a los mismos receptores. Los agentes que utilizamos para los experimentos de unión de ligandos, sulpirida y MK801, son ejemplos de candidatos. Sin embargo, por razones dadas en la Introducción, es poco probable que estas series de experimentos puedan llevarse a cabo con éxito. Debido al tamaño y la configuración de la corteza rinal, hubiera sido necesario casi con toda seguridad utilizar varias cánulas de inyección para tratar la corteza rinal entera, lo que conlleva la posibilidad de inducir cantidades sustanciales de daño tisular mecánico.

Hemos demostrado que la inyección directa de construcciones de ADN que interfiera con la función del receptor de D2 de la corteza rinal provoca una incapacidad temporal completa para aprender relaciones entre indicaciones visuales y el trabajo relativo antes de obtener la recompensa. De esta forma, parece que los mecanismos mediados por la dopamina D2 subrayan el papel funcional que la corteza rinal del mono juega en el aprendizaje de este tipo de asociaciones. Estudios futuros podrán determinar si otros tipos de conducta cognitiva que dependen de la corteza rinal de una forma parecida dependen de los mecanismos mediados por D2 y también clarificar el o los mecanismos moleculares precisos por los que las construcciones de ADN interfieren con la conducta y la unión de ligandos a receptores. Nuestros descubrimientos ofrecen un fuerte incentivo para conseguir este enfoque de ADN recombinante como una forma de interrogar y modular los papeles de componentes específicos en los caminos moleculares subyacentes en la conducta.

Agradecemos a D. Yu por medir la densidad de unión del ligando al receptor; y a los Drs. Y. Chudasama, R. Hampton, D. A. Pollen, S. Ravel, J. Simona y el Programa de Investigación Intramural (Intramural Research Program) del Instituto Nacional de Salud Mental, Departamento de Salud y Servicios Humanos.