

Tesis Doctoral

Influencia de diversos factores biológicos y experimentales sobre la memoria en la rata: el "valor de la experiencia previa"; rol de los receptores muscarinicos y NMDA del hipocampo

Colettis, Natalia Claudia

2011

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Colettis, Natalia Claudia. (2011). Influencia de diversos factores biológicos y experimentales sobre la memoria en la rata: el "valor de la experiencia previa"; rol de los receptores muscarinicos y NMDA del hipocampo. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Colettis, Natalia Claudia. "Influencia de diversos factores biológicos y experimentales sobre la memoria en la rata: el "valor de la experiencia previa"; rol de los receptores muscarinicos y NMDA del hipocampo". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Influencia de diversos factores biológicos y experimentales
sobre la memoria en la rata:**

El “valor de la experiencia previa”;

Rol de los receptores muscarinicos y NMDA del hipocampo.

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de
Buenos Aires en el área Ciencias Biológicas.

Autor

Lic. Natalia Claudia Colettis

Director

Dra. Diana Jerusalinsky

Lugar de Trabajo:

Instituto de Biología Celular y Neurociencias “Prof. E. De Robertis”

Facultad de Medicina, UBA, Buenos Aires, Argentina.

Ciudad Autónoma de Buenos Aires

Influencia de diversos factores biológicos y experimentales sobre la memoria en la rata:

El “valor de la experiencia previa”; Rol de los receptores muscarínicos y NMDA del hipocampo.

- Resumen PARTE I

- En la primera parte de esta Tesis se investigaron los efectos de ciertos factores biológicos y experimentales sobre la formación de memorias en la rata, analizando su desempeño en la evitación inhibitoria (IA) y en un campo abierto (OF). La tarea de IA de un choque eléctrico en un paso, involucra aprendizaje asociativo y es uno de los paradigmas con componentes aversivos más utilizados en estudios sobre memoria y aprendizaje, especialmente en roedores; es dependiente de hipocampo y otras estructuras. Se investigaron los efectos de la intensidad del estímulo, de la manipulación sistemática desde el destete, del ciclo luz/oscuridad, posibles diferencias entre machos y hembras, así como la influencia de una experiencia previa de exposición y habituación a otro ambiente, sobre el desempeño de ratas en IA.

- No hubo diferencias significativas en el desempeño entre hembras y machos. Los animales con manipulación sistemática, entrenados en IA con estimulación “fuerte”, tuvieron mejor desempeño que aquellos sin manipulación; hubo correlación entre la intensidad del estímulo durante el entrenamiento en IA y la expresión de la memoria de larga duración (LTM), mientras que no la hubo en los grupos sin manipulación sistemática. El estímulo para evidenciar aprendizaje fue menor para hembras que para machos de la misma edad, y permitió la expresión tanto de LTM como de una memoria de corta duración (STM) de IA.

- Una exposición al OF de 3 o 5 min, no modificó el desempeño en IA cuando el entrenamiento fue suave. Los animales expuestos 2 veces al OF en días consecutivos, mostraron habituación. La exposición a 1 o 2 OF – es decir, con o sin habituación - no produjo cambios en la LTM de la IA con entrenamiento suave. En cambio, 2 OF facilitaron la memoria de IA con entrenamiento fuerte.

- El efecto del OF sobre la IA parece depender del nivel de entrenamiento, lo que sugiere que la relevancia comportamental del estímulo podría ser determinante. Se puede especular que un choque más intenso - más doloroso y, en consecuencia, más aversivo -, sería muy relevante para el comportamiento ya que produciría una estimulación sensorial mayor, con la posibilidad de establecer más asociaciones y más fuertes; se reclutarían más circuitos neurales de la misma región en el substrato previamente “sembrado” por el OF, y tal vez de otras áreas cerebrales, induciendo cambios plásticos en más sinapsis, dando lugar a un registro robusto de esa memoria. Desde un enfoque evolutivo, podría representar menos costo el que una experiencia poco o nada aversiva (OF) se asociara fuertemente con una aversiva (IA/choque), sólo cuando esta última fuera comportamentalmente relevante (por ej., produciendo fuerte dolor o daño).

- Resumen PARTE II

- La transmisión muscarínica es requerida tanto durante la adquisición como durante la consolidación temprana para la formación de una LTM de IA, ya que el bloqueo de los receptores muscarínicos (RACHM) extendido o restringido al hipocampo dorsal produce amnesia. El bloqueo de los receptores de glutamato NMDA (RNMDA) del hipocampo durante la consolidación también produce amnesia.

- Se analizó el efecto del bloqueo de receptores RNMDA y RACHM en la memoria de la IA luego de: 1) exposición única al OF - novedad - y 2) exploración de un ambiente familiar - 2 OF - ; ambas condiciones posibilitaron la formación de una LTM a pesar del bloqueo extendido de RACHM o de RACHM del hipocampo. La doble exposición al OF también permitió prevenir o superar la amnesia por bloqueo de los RNMDA del hipocampo así como por la inhibición de la síntesis proteica. Durante y luego de la exploración y reexposición al OF se produce un incremento sostenido en la liberación de acetilcolina en hipocampo y corteza, lo que podría contribuir a “preparar el substrato” (aumento de excitabilidad?) para la necesaria plasticidad sináptica que daría lugar a la LTM. Por este y otros mecanismos podría haber disminución del umbral para la inducción de cambios plásticos subyacentes a la formación de la traza, su codificación y consolidación en una LTM. En el marco de la hipótesis de “Etiquetado sináptico y captura de proteínas de plasticidad”, se puede interpretar que dichas proteínas sintetizadas durante el OF previo a la IA facilitarían la plasticidad sináptica en la misma estructura; sin

embargo, la inhibición de la síntesis proteica por administración de anisomicina en hipocampo, antes o después del OF previo, que produjo amnesia anterógrada en IA aún cuando se administró 2 horas antes del entrenamiento, también fue superada por la previa exposición al OF, lo que sugiere fuertemente que otra región o estructura debería estar involucrada en este efecto.

- También se analizó el rol de subtipos de RNMDA del hipocampo en la consolidación temprana de la memoria de IA. Se ha propuesto que los RNMDA que contienen la subunidad NR2B tiene un papel crítico en determinar el umbral de la plasticidad en el establecimiento de una memoria. El bloqueo selectivo de estos receptores ejerció un efecto promotor en la consolidación de LTM de la IA con entrenamiento subumbral, y facilitador cuando el entrenamiento fue suave. Los resultados corroboran que los RNMDA del hipocampo dorsal son requeridos durante la consolidación de IA, aunque aquellos conteniendo NR2B se comportan como inhibidores durante la consolidación, al menos en etapas tempranas.

Palabras clave: memoria; receptores muscarínicos; receptores NMDA; campo abierto; evitación inhibitoria; hipocampo; rata.

The influence of diverse biological and experimental factors on memory in the rat:

“The value of the previous experience”; Role of hippocampal muscarinic and NMDA receptors

Abstract PART I

In the first part of this Thesis the effects of diverse biological and experimental factors over memory formation in the rat were investigated, by analyzing the performance in inhibitory avoidance (IA) and in an open field (OF). The IA of an electric foot shock in one step involves associative learning and is one of the most commonly used behavioral paradigms with aversive content in learning and memory studies, particularly in rodents; it depends on the hippocampus and other central structures.

The effects of the stimulus intensity, of systematic handling, of the light/dark cycle, the possible males and females differences, as well as the influence of previous exposure and habituation to another environment (OF) on IA performance of rats were investigated. There were no significant differences in performance between males and females. The rats with handling that were trained in IA with a strong stimulus showed a better performance than those without handling. Statistical correlation was found between footshock intensity and long term memory (LTM) expression, while no correlation was found in rats without this handling. The shock level that allowed to evidence learning was lower for females than for males of same age and that led to LTM expression as well as short term memory (STM) of IA.

Neither 3 or 5 minutes exposure to the OF showed any significant effect over rats' performance in IA when trained with a mild shock. Two OF sessions, in two consecutive days, led to habituation. The previous exposure to one or two OF sessions – i.e. with or without habituation – did not modify IA LTM with a mild training but 2 OF sessions facilitated IA memory with a strong stimulus instead. The OF effects on the IA seemed to depend on the training level, suggesting that the behavioral relevance of the stimulus could be determinant. It could be speculated that a more intense shock – more painful and consequently, more aversive – would be very relevant for behavior since it would entail a higher sensorial stimulation, giving the possibility for setting more and/or stronger associations; more neural circuits would be recruited in the same region, in the OF previously “seeded substrate”, and maybe, of other brain areas, producing plastic changes induction in more synapses, leading to a robust recording of that memory. From an evolutionary point of view it could represent a lower cost if a little or none aversive experience (OF) would be strongly associated with an aversive one (IA/strong shock) only when the latest were behaviorally relevant - i.e., causing pain or damage - .

Abstract PART II

The cholinergic muscarinic transmission is required for acquisition as well as for early consolidation of an IA LTM, since the blockade of muscarinic receptors (MACHR) either extended or restricted to dorsal hippocampus causes amnesia. The blockade of hippocampal glutamate NMDA receptors (NMDAR) during consolidation produces amnesia also. The participation of MACHR and NMDAR in memory of IA was analyzed following: 1) only one exposure to the OF – novelty -, and 2) the exploration of a familiar environment – 2 OF -; both conditions led to LTM formation in spite of either the extensive or restricted to the hippocampus, MACHR blockade. The double exposure to the OF also allowed to prevent or overcome the amnesia caused by hippocampal NMDAR blockade or protein synthesis inhibition. During and after OF exposure and reexposure there is a continuous increase in ACh release from both hippocampus and cortex which could contribute to “prime the substrate” (increase in excitability?) for the necessary synaptic plasticity that would lead to LTM. By this and other mechanisms, the threshold for induction of plastic changes underlying the trace formation, its codification and consolidation into an LTM, could be lowered. In the frame of the “Synaptic tagging and capture of plasticity-related proteins” hypothesis, these proteins synthesized during the previous OF would facilitate synaptic plasticity for the next task, in the same structure. However, the hippocampal protein synthesis inhibition by anisomycin, administered either before or after de OF, which induced anterograde amnesia in the IA, even 2 hours before training, was also prevented or overcome by previous exposure to the OF, strongly suggesting that other region or structure should be involved in this effect.

Then we studied the differential role of this NMDAR of the dorsal hippocampus in memory consolidation. It has been suggested that NMDAR containing NR2B play a critical role in determining the plasticity threshold in memory formation. The selective blockade of this receptors 1) promoted memory consolidation enabling the LTM formation of the IA with an underthreshold training, 2) had a facilitatory effect over LTM formation of the IA with a mild training. The results corroborated that the NMDAR in dorsal hippocampus are required during IA consolidation, whereas those subtypes containing NR2B behave as inhibitors during memory consolidation, at least in early stages.

Key words: memory; muscarinic receptors; NMDA receptors; Open Field task; One step inhibitory avoidance task; hippocampus; rat.

Agradecimientos:

Al CONICET y a la Universidad de Buenos Aires por haber financiado el desarrollo de esta Tesis.

A Diana que me dio la posibilidad de trabajar en su grupo y me brindó su orientación y conocimiento; además de darme un gran apoyo en los momentos difíciles. Muchísimas gracias por compartir conmigo tantas largas noches de tesis y acompañarme en el esfuerzo que significó esta última etapa que parecía que nunca iba a terminar: ¡Lo logramos!

A Marina, con quien hicimos gran parte del cuerpo de experimentos de esta Tesis, y con quien compartí el día a día de esta etapa de doctorado, habiendo ganado así una amiga con quien compartir, no sólo momentos de trabajo, sino que también los momentos de la vida.

A Edgar, Carlos, Gonzalito, Vero, Vicky, Ale, Nico que me dieron una mano cada vez que lo necesité. Gracias Vero por cebarme tantos mates invitándome gentilmente a escribir. Gracias Vicky (Vickus) por ponerme un sobrenombre tan personalizado. Gracias Ale (Treius) por salvarme de emergencias computadoriles. Gracias chicas por la calidez! Las voy a extrañar. Gracias Edgar por aportarme tu experiencia a la hora de discutir resultados, y por aguantar reiteradas veces el mismo CD de Silvio. Gracias Gonzalito por todo lo que me enseñaste, y por compartir garrapiñadas en una ollita de cobre. Gracias Carlos por hacerme reír. Gracias Nico por compartir con tan buena onda tantas horas de *set up*.

A mi familia, en especial a Miguel y a Martín que con mucho amor y mucha paciencia me acompañaron, me apoyaron y me dieron las fuerzas necesarias para que esta Tesis sea posible. Esta Tesis significó un gran esfuerzo de parte de los tres. ¡Gracias por la buena onda que le pusieron! ¡Gracias por las noches de Tesis acompañadas con trenes y mates! ¡Los quiero muchísimo!

A mis amigos: Cristina, Laura Lucía, Florencia, Andrés, Ariel, Luciano, Yuli, Lorena y Sandra que me alentaron constantemente, me tuvieron paciencia y supieron entender que estos meses de ausencia fueron a favor de un esfuerzo que dio lugar a que este trabajo sea posible. ¡Gracias a todos! ¡Gracias Cristina por el termo! ¡Gracias Andrés por hacer más divertidos los congresos que compartimos!

A Beatríz que me ayudó a enfrentar las dificultades (¡y que fueron muchas!) que fueron presentándose a lo largo de todos estos años de doctorado, para que pudiera levantarme y seguir adelante, y de esa forma me ayudó a crecer.

En especial a Mariana que si bien esta lejos, supo estar muy cerca. Gracias por las noches de guitarra por *skype*. Gracias por todos tus consejos. ¡Gracias por todo lo hiciste gran hermana!

Al mate y al hielo, que me brindaron compañía en las largas noches despierta frente a la computadora.

A la música que me acompañó durante todo el trabajo de Tesis, haciendo más ameno cada momento.

ÍNDICE	
INTRODUCCIÓN	11
I. MEMORIA	13
I.1 Desde un punto de vista temporal:	13
Memoria de corta duración	13
Memoria de larga duración	13
I.2. Una segunda clasificación:	14
i. Memoria de procedimiento	14
ii. Memoria declarativa	14
I.2 APRENDIZAJE	15
Definiciones de aprendizaje	15
I.2.1. Tipos de aprendizaje	16
No asociativo (habituaación y sensibilización a un estímulo)	16
i. Habituaación	16
ii. Sensibilización	16
Habituaación a un Campo Abierto	17
Aprendizaje asociativo	17
i. Condicionamiento clásico	17
ii. Condicionamiento instrumental	18
-Condicionamiento por recompensa	18
-Condicionamiento aversivo	18
-Condicionamiento de evitaaón	18
Condicionamiento clásico vs. instrumental	18
Evitaaón Inhibitoria	18
I.3. Niveles de análisis de la memoria	19
I.4. Fases de la memoria	19
I. 5 Hipocampo. Aferencias y eferencias	21
I.6 Papel de la formaaón hipocámpica	24
1.7 Amnesia	25
1.8. Glutamato	26
1.8.1 Receptores NMDA. Composición, fisiología y localización	26
Subunidad NR1	26
Subunidades NR2	27
Subunidades NR3	27
1.8.2 Ligandos del RNMDA	27
1.8.3 RNMDA y plasticidad sináptica	28
1.8.4 RNMDA en aprendizaje y memoria	29
I.9 Mecanismos moleculares del aprendizaje. Potenciación de larga duración (LTP)	31
1.10 Hipocampo, Novedad y LTP	35
1.10.1 Efecto de la Novedad en el Comportamiento	35
1.10.2 Hipótesis de “Etiquetado sináptico y captura de proteínas”	36
1.10. Acetilcolina	37
1.11.1 Receptores acetilcolina muscarínicos	37
1.11.2 Sistema colinérgico, RAChM, excitabilidad de las neuronas del hipocampo, aprendizaje y memoria	38
1.12 Interacción entre el sistema colinérgico y el sistema glutamatérgico	41
1.13 Diferencias entre machos y hembras en aprendizaje y memoria	41
1.13.1 Dimorfismo sexual en memoria espacial	42
1.13.2 Dimorfismo en habituaación a un campo abierto	43

1.13.3 Dimorfismo en memorias con componentes aversivos	43
1.13.4 Evitación inhibitoria	44
Dimorfismo con escopolamina	44
1.14 Efecto de la manipulación sistemática de los animales	44
1.15 Influencia del ritmo circadiano	45
1.15.1 Efecto del cambio de fase del ciclo luz/oscuridad (L/O)	45
1.15.2 Sueño y consolidación	46
1.15.3 Efecto del “momento del día”	46
OBJETIVOS	48
MATERIALES Y MÉTODOS	53
-Animales experimentales	53
Experimentos con animales con ciclo derecho:	53
-Manipulación sistemática (<i>handling</i>)	54
-Cirugías	54
-Infusión de drogas	55
-Inyecciones via intraperitoneal	56
-Equipamiento y procedimientos para las tareas comportamentales	56
Caja para el campo abierto:	56
Caja para evitación inhibitoria	56
-Tareas comportamentales: bases conceptuales, fundamentos, descripción detallada	58
Evitación inhibitoria de descenso, en un paso (<i>Step Down, SD</i>)	58
Evitación inhibitoria de pasaje de compartimiento, en un paso (<i>Step Through, ST</i>)	58
-Exploración en Campo Abierto	59
-Diseño experimental: experimentos de evaluación del efecto de la exposición al campo abierto sobre el desempeño en evitación inhibitoria	60
Grupos 1 OF	60
Grupos 2 OF	60
Grupos No-OF	60
-Análisis de datos	60
RESULTADOS	62
CAPÍTULO III: PARTE I	63
III.1 RELEVANCIA DE CIERTAS CONDICIONES BIOLÓGICAS Y EXPERIMENTALES EN LA PRUEBA DE EVITACIÓN INHIBITORIA.	65
-Efecto de la intensidad del estímulo sobre la memoria de la prueba de SD-IA	65
-Efecto de la manipulación de los animales sobre el desempeño en la prueba de SD-IA	71
III. 2 INTERACCION ENTRE TAREAS DIFERENTES	74
-Efecto de la exposición al campo abierto sobre la memoria de SD-IA	74
-Efecto de una exposición al OF sobre el desempeño en SD-IA en animales con entrenamiento “suave” (0,5 mA)	74
-Efecto de dos exposiciones al OF sobre el desempeño en SD-IA en animales entrenados con distinta intensidad de choque	78
-Efecto de dos exposiciones al OF sobre el desempeño en SD-IA en animales con entrenamiento “suave” (0,5 mA)	83
-Evaluación de las memorias de corta corta y de larga duración	87
-Efecto de dos exposiciones al OF sobre el desempeño en SD-IA en animales con entrenamiento “fuerte” (0,75 mA)	89
III. 3. INFLUENCIA DEL CICLO LUZ/OSCURIDAD SOBRE LA MEMORIA EN LA RATA	92
-Efecto del OF sobre el desempeño en la prueba de SD-IA en animales con entrenamiento “suave” (0,5 mA) durante su período de sueño (mantenidos en	92

ciclo luz/ oscuridad derecho)

-Efecto del OF sobre el desempeño en SD-IA en animales con entrenamiento “fuerte” (de 0,75 mA) durante su periodo de sueño (en ratas mantenidas en ciclo luz/ oscuridad derecho)	96
-Desempeño en el OF de las ratas criadas con ciclo de luz/oscuridad derecho (CD) vs. aquellas criadas con ciclo invertido (CI)	100
III. 4. EVITACIÓN INHIBITORIA: PASAJE DE COMPARTIMIENTO EN UN PASO (STEP THROUGH)	102
-Efecto de la intensidad del estímulo sobre la memoria de la prueba de ST-IA	103
-Efecto de la manipulación de los animales sobre el desempeño en la prueba de ST-IA	106
-Efecto de dos exposiciones al OF sobre el desempeño en ST-IA en animales con entrenamiento “suave” (0,5 mA)	109
CAPÍTULO IV: PARTE II	111
ENSAYOS FARMACOLÓGICOS	111
IV.1 MODULACIÓN DE LA MEMORIA DE EVITACIÓN INHIBITORIA POR EXPOSICIÓN A UN CAMPO ABIERTO: PARTICIPACIÓN DE LA TRANSMISIÓN MUSCARÍNICA	111
-Efectos del antagonista muscarínico escopolamina	111
-Efecto del campo abierto sobre la amnesia de la SD-IA causada por administración de escopolamina i.p. antes del entrenamiento	112
-Efecto de la previa exposición al OF sobre la memoria de corta duración (STM) y sobre la de larga duración (LTM) de la de SD-IA. Efecto sobre la amnesia por administración de escopolamina intraperitoneal	117
-Efecto de campo abierto sobre la amnesia por escopolamina administrada intrahipocampo en la consolidación de la memoria de SD-IA	121
-Efecto de la previa exposición al OF sobre la memoria de corta duración (STM) y sobre la de larga duración (LTM) de la de SD-IA. Efecto sobre la amnesia por administración de escopolamina intrahipocampo	129
IV.2 EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS PROTEICA SOBRE LA MODULACIÓN DE LA MEMORIA DE SD-IA	133
-Efecto sobre la reversión de la amnesia de SD-IA por la doble exposición al OF	133
IV.3 TAREA DE EVITACION INHIBITORIA POR PASAJE DE COMPARTIMIENTO (ST-IA)	146
-Efecto de campo abierto sobre la amnesia por escopolamina administrada intrahipocampo en la consolidación de la memoria de ST-IA (en ratas macho)	146
IV.4 RATAS CON CICLO LUZ/OSCURIDAD DERECHO	150
-Efecto del campo abierto sobre la amnesia de SD-IA por escopolamina intrahipocampo, en ratas mantenidas en ciclo luz/oscuridad derecho entrenadas durante su periodo de sueño	150
-Comparación del desempeño en SD-IA, de ratas mantenidas en CI vs. CD. Efecto de la previa exposición al OF sobre la amnesia de SD-IA producida por escopolamina	154
-Comparación del desempeño en el OF de ratas criadas con ciclo luz/oscuridad derecho (CD) vs. aquellas con ciclo invertido (CI). (Ratas que se encontraban en su fase de sueño vs. aquellas que se encontraban despiertas, respectivamente)	154
IV. 5 MODULACIÓN DE LA MEMORIA DE SD-IA POR EXPOSICIÓN AL OF. PARTICIPACIÓN DEL RECEPTOR GLUTAMATÉRGICO NMDA DEL HIPOCAMPO	157
-Efecto de antagonistas NMDA administrados en hipocampo dorsal durante la consolidación de la memoria de SD-IA	157
-Efecto de MK-801 administrado intrahipocampo sobre la consolidación de la memoria de SD-IA	157

-Efecto de MK-801 administrado intrahipocampo sobre la consolidación de la memoria de SD-IA: Modulación por el campo abierto	160
IV.6 PARTICIPACION DE SUBTIPOS DEL RECEPTOR NMDA DE HIPOCAMPO EN LA CONSOLIDACIÓN DE SD-IA	164
-Efecto del antagonista ifenprodil selectivo para receptores NMDA conteniendo NR2B sobre la consolidación de la memoria de SD-IA con entrenamiento suave.	166
-Efecto de MK-801 administrado intrahipocampo sobre la consolidación de la memoria de ST-IA	168
-Efecto de la administración del antagonista selectivo por NR2B ifenprodil en hipocampo dorsal sobre la consolidación de la memoria de ST-IA	172
DISCUSIÓN	177
CAPÍTULO V: PARTE I	
RELEVANCIA DE CIERTAS CONDICIONES BIOLÓGICAS Y EXPERIMENTALES SOBRE LA MEMORIA DE EVITACIÓN INHIBITORIA	179
-Efecto de la intensidad del estímulo y del sexo sobre la memoria de la prueba de SD-IA	179
-Efecto de la manipulación de los animales sobre la memoria en la prueba de SD-IA.	182
INTERACCION ENTRE TAREAS DIFERENTES	184
-Efecto de la exposición al campo abierto sobre la memoria de SD-IA	184
-Efecto de una o dos sesiones en el campo abierto sobre el desempeño en SD-IA en animales entrenados con estímulo suave (0,5 mA)	186
-Efecto del OF en animales entrenados en la prueba de SD-IA con choque fuerte.	188
INFLUENCIA DEL CICLO LUZ/OSCURIDAD SOBRE LA MEMORIA EN LA RATA	192
-Efecto del OF sobre el desempeño en la prueba de SD-IA en animales en CD entrenados con choque suave (0,5 mA) durante su período de sueño (mantenidos en ciclo luz/ oscuridad derecho)	193
-Efecto del OF sobre el desempeño en SD-IA en animales en CD entrenados con choque fuerte (de 0,75 mA) durante su periodo de sueño (en ratas mantenidas en ciclo luz/ oscuridad derecho)	195
-Evitación inhibitoria por pasaje de compartimiento en un paso (step through)	197
-Efecto de la intensidad del estímulo sobre el la memoria de la prueba de ST-IA	197
-ST-IA: Desempeño según intensidad de choque y género	197
-Efecto de la manipulación de los animales sobre el desempeño en la prueba de ST-IA.	198
-Efecto de dos sesiones de campo abierto sobre el desempeño en ST-IA en animales entrenados con choque suave (0,5 mA)	199
-Manipulación vs. OF	200
PARTE II: FARMACOLOGÍA DE LA MEMORIA	201
PARTICIPACION DE LA TRANSMISIÓN MUSCARÍNICA EN LA MEMORIA DE EVITACIÓN INHIBITORIA.	201
-Efectos del antagonista muscarínico escopolamina.	201
-Efecto del campo abierto sobre la consolidación de la memoria de SD-IA.	202
-Efecto sobre la amnesia por escopolamina administrada pre entrenamiento via i.p.	202
-Efecto del campo abierto sobre la amnesia producida por escopolamina intrahipocampo durante la consolidación de la memoria de la SD-IA.	204
-Efecto de la exposición al campo abierto sobre la amnesia instigada por escopolamina intrahipocampo durante la consolidación de esta tarea.	205
-¿Qué ocurre cuando se afecta la consolidación?	205
-Es suficiente una exposición breve al OF?	205

-Efecto de la exposición al campo abierto antes del entrenamiento en SD-IA, sobre la amnesia instigada por escopolamina intrahipocampo: evaluación de STM y LTM	207
-Qué ocurrió con la STM?	206
-Efecto de escopolamina intrahipocampo sobre la consolidación de memoria de ST-IA	210
-Efecto del campo abierto sobre la consolidación de la memoria de ST-IA	210
-Efecto sobre la amnesia por escopolamina administrada intrahipocampo luego del entrenamiento	210
-Neuronas colinérgicas que inervan hipocampo y corteza detectan estímulos comportamentales relevantes	210
-Hipocampo de roedores, LTP y novedad	212
-Efecto de la inhibición de la síntesis proteica sobre el desempeño en SD-IA	214
-Animales con ciclo luz/oscuridad derecho	220
-Efecto del campo abierto sobre la consolidación de la memoria en la prueba de SD-IA y sobre la amnesia instigada por escopolamina, en ratas entrenadas durante su periodo de sueño (mantenidas en ciclo luz/ oscuridad derecho: CD)	220
PARTICIPACIÓN DEL RECEPTOR GLUTAMATÉRGICO NMDA DEL HIPOCAMPO EN LA CONSOLIDACIÓN DE LA MEMORIA DE SD-IA	221
-Efecto de MK-801 intrahipocampo sobre la consolidación de la memoria en la prueba de SD-IA.	221
-Efecto de la exposición al campo abierto sobre la amnesia instigada por MK-801 intrahipocampo luego de entrenamiento en SD-IA.	222
-Desempeño en el campo abierto y relación con la evitación inhibitoria:	224
PARTICIPACIÓN DE SUBTIPOS DE RECEPTORES NMDA EN LA CONSOLIDACIÓN DE LA MEMORIA DE EVITACIÓN INHIBITORIA	225
-Efecto de la administración del antagonista selectivo NR2B Ifenprodil administrado en hipocampo dorsal sobre la consolidación de la memoria en la prueba de SD-IA.	226
-Efecto de MK-801 sobre evitación inhibitoria por pasaje de compartimiento en un paso (ST-IA)	228
-Efecto de la administración del antagonista selectivo NR2B ifenprodil en hipocampo dorsal sobre la consolidación de la memoria en la prueba de ST-IA.	229
Resumen de nuestros resultados	230
Hipótesis de etiquetado sináptico y captura de proteínas de plasticidad	230
PARTE I	
RESUMEN DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO III.	233
PARTE II	
RESUMEN DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO IV	236
CONCLUSIONES FINALES	240
BIBLIOGRAFÍA	241
Abreviaturas	269

Introducción

I. MEMORIA

La memoria es considerada una representación interna de una experiencia comportamental, codificada espacio-temporalmente en circuitos neuronales, mediante cambios en las propiedades reactivas de las neuronas, y que puede guiar el comportamiento [1]. Esa información codificada puede asociarse con otras memorias codificadas en otros circuitos, a través de áreas de asociación. Así se van estableciendo memorias más complejas, algunas veces completamente nuevas, constituyendo el cuerpo de conocimientos.

Se pueden mencionar dos grandes clasificaciones de las memorias:

I.1 Desde un punto de vista temporal:

Memoria de corta duración (STM, del inglés “short-term memory”), que dura minutos a horas y es más vulnerable a ser interferida o interrumpida; y,

Memoria de larga duración (LTM, del inglés “long-term memory”), que tiene un curso temporal de días, semanas, meses o años.

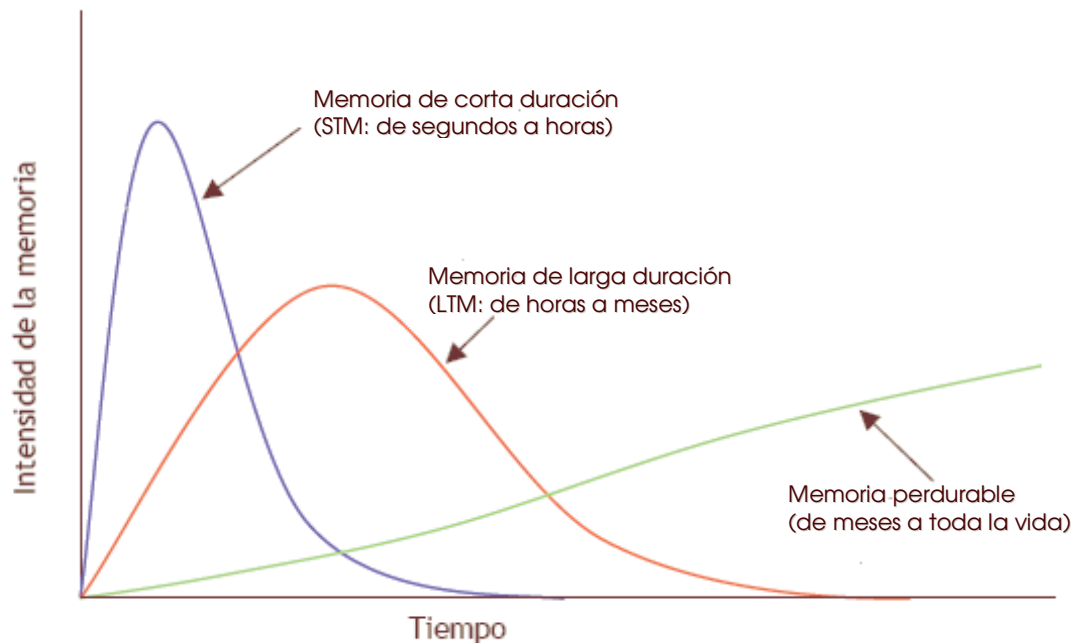


Fig 1.1: Fases de la consolidación de la memoria.

La memoria se puede clasificar según su duración en memoria de corta duración (STM; segundos a horas), memoria de larga duración (LTM; horas a meses) y memoria perdurable (meses a toda la vida). (Modificado de McGaugh, 2000).

Las memorias llamadas inmediatas y también **de trabajo, son de duración muy breve**. Se las puede imaginar como un conjunto de capacidades de memoria temporaria que dependen principalmente de la actividad eléctrica de las células de la corteza prefrontal [2; 3] .asociadas a otras regiones del cerebro [4]. Este tipo de memoria persiste mientras la actividad eléctrica perdure. (muchas veces no requieren llegar al nivel consciente en humanos). Proporcionan la capacidad de mantener, de algún modo, la información para su utilización transitoria, por lo que es de suponer que su estudio difícilmente

arrojaría luz sobre mecanismos de almacenamiento, especialmente de memorias de duración prolongada. La corteza frontal parece estar activa durante muchas de las tareas que requieren de información transitoria. La función de mantenimiento de la información por los lóbulos frontales involucra la memoria de trabajo [5]. Algunos estudios sugieren que el estriado podría ser otra de las estructuras involucradas [6].

Las memorias de duración prolongada, de tipo declarativas, dependen de la integridad del lóbulo temporal; en particular, el éxito de la fase inicial de almacenamiento para el establecimiento de una traza duradera parece depender del hipocampo.

I.2. Una segunda clasificación distingue entre aquellas memorias que corresponden a procesos o procedimientos sensoriales, motores o sensoriales y motores y las que involucran hechos o conceptos. Si bien esta división se aplica directamente a los sistemas de memoria en humanos, una clasificación similar sería aplicable a la memoria en los animales, aunque pueden carecer de algunas características típicas de las memorias en seres humanos.

i. Memoria de procedimiento: también llamada **memoria no declarativa o implícita**, incluye memorias que se relacionan con la información relativa a cómo hacer las cosas, Está involucrada en aprendizajes motores o perceptuales, de procedimiento (manejar un automóvil) y de reglas (como las gramaticales). Estas memorias no dependerían de la integridad estructural del lóbulo temporal.

ii. Memoria declarativa: o explícita, es la memoria de lugares, eventos, hechos y personas (en humanos) y depende del lóbulo temporal. En la especie humana, la evocación de la misma requiere principalmente de procesos conscientes. A su vez, la memoria declarativa se suele dividir, en humanos en **memoria episódica** y **memoria semántica**. Esta última, también llamada conocimiento conceptual, da cuenta de un conjunto de conocimientos acerca de los significados de las palabras y de las relaciones entre estos significados sin una conexión particular con un tiempo y un lugar, y constituye una especie de “diccionario mental”. La *memoria episódica* representa eventos o sucesos que reflejan detalles de una situación vivida y no solamente su significado. Algunos autores estudian la memoria episódica en animales como una memoria de cuándo, cómo y qué evento ha ocurrido [7], en cambio otros la estudian como la memoria de la propia conducta del animal [8].

Clásicamente, las memorias implícitas tienen una calidad automática y reflexiva, y su formación y evocación no dependen de un proceso consciente. Este tipo de memorias se acumulan, en general, lentamente. Se expresa mediante un mejor desempeño y no pueden ser expresadas en palabras. Durante mucho tiempo se ha considerado que una memoria implícita para una determinada tarea está ligada a la actividad de los sistemas sensorial y motor involucrados en la tarea de aprendizaje y se encontraría restringida por mecanismos de almacenamiento inherentes a cada uno de estos sistemas.

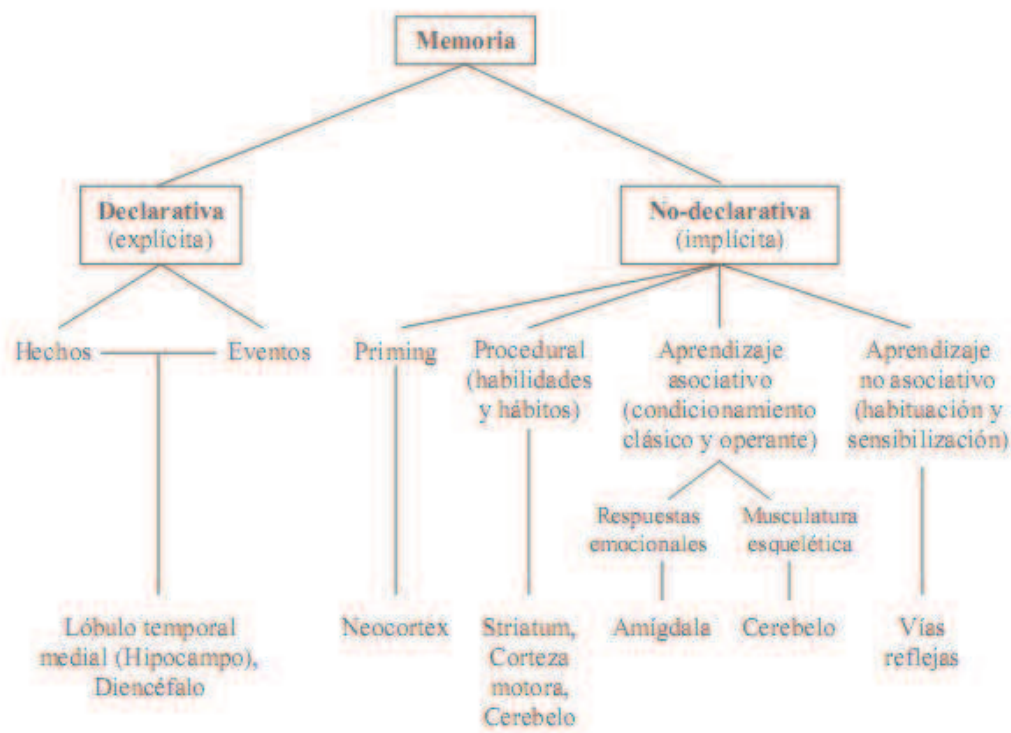


Figura 1.2: Distintos sistemas de memorias y sus estructuras cerebrales asociadas.

Las memorias pueden ser clasificadas como declarativa (explícita) y no-declarativa (implícita o procedural). Cada sistema es mantenido por distintas regiones anatómicas del cerebro. (Modificado de Squire y Knowlton, 1994).

1.2 APRENDIZAJE

El comportamiento de los organismos vivos tiene sus bases en la historia evolutiva de cada especie. Sin embargo, el repertorio comportamental de cada organismo puede ser modificado por la experiencia individual, dependiendo de su capacidad de aprendizaje.

Definiciones de aprendizaje

En líneas generales, todas las definiciones de aprendizaje se refieren a la siguiente noción fundamental: aprendizaje implica un cambio en el comportamiento basado en la experiencia individual. Thorpe en 1956 lo definió como “un proceso que se manifiesta por cambios adaptativos en el comportamiento de un individuo como consecuencia de una experiencia” [9]. Maier y Schneirla (1964) lo definieron como “desarrollo de respuestas a aspectos limitados del ambiente” [10]. Tarpay, en 1965, lo definió como “cambio relativamente permanente en el comportamiento, que ocurre a causa de una experiencia”[11]. Algunos autores establecen que la experiencia debe ser repetitiva [12], pero esta restricción no se ajusta a todos los casos de aprendizaje, ya que puede haber aprendizaje luego de una única y breve experiencia [13]. Lorenz (1981) adoptó una posición teleonómica a la hora de definir aprendizaje: “El aprendizaje selecciona entre varias opciones contenidas en un programa abierto, aquella que tienda a ajustarse mejor a la circunstancia”[14].

Algunas definiciones señalan que el aprendizaje implica un proceso, no un cambio instantáneo; mientras que otras señalan que se trata de un cambio duradero en el comportamiento (distinguiéndolo de reacciones transitorias a estímulos sensoriales) [13].

No todos los aprendizajes se materializan directamente en un comportamiento, por ello es apropiado considerar al aprendizaje también como alteraciones en la potencialidad de reaccionar [12]. Una definición apropiada para discriminarlo del establecimiento de una memoria, es que el aprendizaje consiste en la adquisición de nueva información, mientras que la memoria consistiría en la retención de la información adquirida [13]. Dicho de otra manera, para que las experiencias se transformen en memorias es necesario que tenga lugar un aprendizaje.

1.2.1. Tipos de aprendizaje

El aprendizaje, puede clasificarse en asociativo y no asociativo.

No asociativo (habituación y sensibilización a un estímulo)

i. Habitación: Es el tipo de aprendizaje más elemental. La experiencia comportamental consiste, en general, en la presentación de un solo estímulo. El proceso de aprendizaje en la habituación se expresa comportamentalmente por la disminución de la probabilidad o de la intensidad de la respuesta ante un estímulo moderado, repetitivo. La disminución de la respuesta se produce por la presentación reiterada del mismo estímulo o de uno similar y no se debe a una adaptación del receptor sensorial, a la fatiga, o a una lesión del mismo. Este proceso se relaciona con la disminución de una respuesta establecida o expresada previamente.

La habituación es un mecanismo fundamental en la adaptación de un organismo a su ambiente, ya que todo organismo se encuentra expuesto a multitud de estímulos. Desde un punto de vista adaptativo, la habituación contribuiría a organizar y dirigir el comportamiento para que resulte más eficaz frente a tantos estímulos; sobre todo, ante aquellos estímulos irrelevantes.

ii. Sensibilización: Es un aumento en la respuesta a un estímulo, debido a la presentación del mismo o de otro estímulo. El estímulo sensibilizante es, en general, fuerte o nocivo. Se considera un aprendizaje no asociativo porque no resulta de la asociación específica entre dos estímulos particulares, ya que un estímulo sensibilizante modifica la respuesta a una amplia variedad de estímulos.

La sensibilización, a diferencia de la habituación, es inespecífica. Es decir que el animal no queda sensibilizado solamente al estímulo que lo sensibilizó, sino a muchos otros estímulos diferentes, como debería esperarse de un fenómeno que implica una disminución inespecífica del umbral de respuesta.

La sensibilización es un mecanismo que aumenta los niveles de atención y disminuye el umbral para las respuestas defensivas.

Habitación a un Campo Abierto

Esta prueba se utiliza para evaluar varios aspectos de los animales expuestos a un ambiente novedoso. Permite determinar modificaciones en la actividad locomotora o sensorial, como lo son los “congelamiento por temor” (*freezing*), hiperexcitabilidad o hipermotricidad. Fundamentalmente, el paradigma de esta prueba se basa en la observación del cambio en la actividad exploratoria del animal, a medida que este se vuelve familiar, es decir que se habitúa al nuevo ambiente. En general, los parámetros más sensibles son la elevaciones y luego la actividad locomotora, mientras que el comportamiento de acicalamiento puede no variar o aumentar [15]. Si bien es metodológicamente simple, la habitación de la exploración es un paradigma complejo que involucra varios procesos: respuestas ante la novedad, incluyendo alerta, emocionalidad y factores relacionados con el estrés; disminución de la respuesta debido a la familiarización con el ambiente, lo que requiere aprendizaje, reconocimiento y evocación. Si esta habitación perdura será indicadora de una determinada capacidad para la adquisición y la posibilidad de su evocación por el animal. La exploración de un campo abierto y su habitación dependen del hipocampo y de su aferencia colinérgica [15; 16] desde el *septum* medial. Se sabe que dicho comportamiento exploratorio está asociado a la actividad *theta* del hipocampo, que depende de la aferencia colinérgica [17]

Aprendizaje asociativo

Es el aprendizaje que involucra aprender una relación entre estímulos, o predecir las consecuencias del propio comportamiento.

i. Condicionamiento clásico: también conocido como condicionamiento Pavloviano. Consiste en la presentación de un estímulo que desencadena *per se* una respuesta comportamental. A este estímulo, elegido y controlado por el experimentador, se lo llama incondicionado y la respuesta se llama incondicionada. A continuación se presenta un estímulo neutro respecto de la respuesta incondicionada, temporalmente asociado al estímulo incondicionado. A este estímulo se lo llama condicionado y también es elegido y controlado por el experimentador. La presentación del estímulo condicionado próxima a la del estímulo incondicionado constituye la contingencia clásica entre los estímulos. Si esta se repite con cierta frecuencia, se formará una asociación entre ambos estímulos, alterando la respuesta al estímulo condicionado, resultando en una respuesta condicionada muy similar a la respuesta incondicionada. Cuanto más fuerte sea la contingencia entre los estímulos condicionado e incondicionado, mayor será el poder predictivo del estímulo condicionado y la fuerza del vínculo entre éste y la respuesta. El ejemplo fundacional de este tipo de condicionamiento es el experimento clásico de Pavlov [18], utilizando el reflejo de salivación del perro, que ocurre por la presencia de alguna sustancia comestible dentro de su boca. La sustancia comestible constituyó el estímulo incondicionado, y la respuesta incondicionada fue la salivación. Eligió como estímulo neutro (estímulo condicionado) el sonido de una campana que inicialmente no tenía ningún significado para el animal. Se presentó el sonido de la campana seguido pocos segundos después por liberación de comida dentro de la boca del perro, produciéndose la salivación. La repetición de esta secuencia llevó a que el perro

“anticipara” la presentación de la comida, produciéndose salivación ante la presentación del sonido de la campana. De esta manera se constituyó la contingencia clásica entre los estímulos

ii. Condicionamiento instrumental: llamado también condicionamiento operante. En este tipo de condicionamiento el estímulo incondicionado (denominado refuerzo) se produce después de la respuesta. No hay contingencia independiente de la voluntad del animal, si no que esta es producto de la actividad del animal que “aprende la consecuencia de sus actos” [1].

Un ejemplo muy famoso de este tipo de condicionamiento es la caja de Skinner [19], en la que el animal aprende a obtener una recompensa presionando una tecla. Skinner llamó a este aprendizaje condicionamiento instrumental..

El condicionamiento instrumental se subdivide en tres categorías:

-Condicionamiento por recompensa: un refuerzo apetitivo aumenta la probabilidad o intensidad de los comportamientos con los cuales es contingente.

-Condicionamiento aversivo: un refuerzo aversivo (un estímulo doloroso, por ejemplo) disminuye la probabilidad o intensidad del comportamiento con el que es contingente.

-Condicionamiento de evitación: un refuerzo negativo de carácter aversivo es administrado en ausencia de una respuesta determinada, pero es omitido o demorado cuando se manifiesta esa respuesta. Por ejemplo: aprender a presionar una palanca para evitar un choque eléctrico.

El paradigma de aprendizaje que estudiamos en el desarrollo de este trabajo comprende condicionamiento aversivo y de evitación.

Condicionamiento clásico vs. instrumental

En el condicionamiento clásico el organismo aprende que los eventos del entorno predicen la ocurrencia de un estímulo, en el condicionamiento instrumental el organismo aprende cuál de sus acciones produce o evita la ocurrencia del refuerzo. El condicionamiento clásico debe ser considerado una consecuencia automática, primitiva, de ciertas asociaciones, mientras que el condicionamiento operante es más complejo porque el organismo debe sacar conclusiones basándose en asociaciones [20]. Aún así, el condicionamiento instrumental más complejo está basado en mecanismos y eventos que comparte con el condicionamiento clásico.

Evitación Inhibitoria

El aprendizaje aversivo constituye uno de los paradigmas más utilizados en ensayos de memoria y comportamiento. En la prueba de evitación inhibitoria se esgrime la idea de que al llevar a una rata a un ambiente novedoso, el animal experimenta una fuerte motivación exploratoria. Debido a esto, el animal depositado sobre una plataforma ubicada en la caja de evitación, sólo permanece unos pocos segundos sobre ella. Al descender al piso-grilla, recibe una descarga eléctrica que actúa como un estímulo aversivo. Una re-exposición del animal al mismo entorno provocará un recuerdo (evocación), en el cual se relacionará el estímulo desagradable con la caja de entrenamiento (contexto) y con el descenso desde la plataforma. Aquí se asocia la memoria espacial con la aversiva. El hecho de no explorar y permanecer sobre la plataforma le permitirá evitar la descarga eléctrica aversiva. Por lo

tanto, un aumento del tiempo de permanencia sobre la plataforma constituye un indicador del aprendizaje y la retención. Como todo aprendizaje aversivo, esta prueba involucra y requiere integridad de ciertas estructuras, como el hipocampo y la amígdala, y las cortezas entorrinal y parietal, además de las vías sensitivas, nociceptivas y motoras (por ejemplo [21; 22; 23]).

I.3. Niveles de análisis de la memoria

La memoria y el aprendizaje pueden ser estudiados en distintos niveles de organización. En el nivel mayor de organización se estudia el comportamiento de un organismo, es decir la expresión comportamental del proceso mnésico. Este nivel involucra el estudio de las grandes fases que estructuran y constituyen un proceso de memoria: adquisición, consolidación, evocación, extinción o reconsolidación. A nivel de “órgano”, o de sistemas de integración neuronal lo relevante es el funcionamiento integral del cerebro (o su equivalente) durante el aprendizaje. A nivel de “subórgano” o de circuitos neuronales, se ubican determinadas regiones del cerebro, vías neurales y circuitos neuronales. Al nivel celular se trata de la función de cada neurona y de sus conexiones. Finalmente, el nivel molecular consiste en los eventos bioquímicos y biofísicos intracelulares o sinápticos, asociados al aprendizaje y la memoria.

En el desarrollo de esta tesis se abordan los niveles de comportamiento integral del organismo expresando un aprendizaje asociativo, así como el nivel de vías neurales o subsistemas y circuitos, llegando indirectamente, a través de un abordaje farmacológico, al nivel molecular.

I.4. Fases de la memoria

Para el estudio de la memoria es importante hacer una división de la misma de manera pragmática. Clásicamente se han distinguido tres etapas: **adquisición, consolidación y evocación**.

La **adquisición** y subsecuente codificación se refiere a los procesos por los cuales la información nueva es procesada en un primer encuentro con determinada circunstancia o experiencia. Es crítica porque establece cuán adecuadamente lo aprendido podrá luego ser recordado. La extensión de este proceso está en relación directa con el tiempo y número de sesiones necesarias para aprender una determinada tarea.

La **consolidación** involucra aquellos procesos por los que se almacena la información recientemente adquirida, transformándose en más estable y, de alguna manera, resistente a la influencia de cualquier factor de interferencia, persistiendo así por un cierto tiempo. La consolidación de LTM involucra la expresión de genes y la síntesis de nuevas proteínas, dando lugar a cambios estructurales que permiten el “almacenamiento” de esa memoria de una manera relativamente estable a través del tiempo. La duración de esta etapa se establece convencionalmente desde el momento que termina el entrenamiento, pudiendo alcanzar una duración de 6 o más horas, aunque una información puede comenzar a ser consolidada mientras se sigue adquiriendo la información. En los últimos años la opinión predominante sostiene que hay dos tipos de consolidación de las memorias: (i) una rápida, llamada consolidación sináptica o celular, que involucra eventos que ocurren tempranamente luego del

entrenamiento, y que dura varias horas e inclusive algunos días [24], y (ii) una lenta llamada consolidación sistémica, que implica la participación de varias regiones neocorticales y su interacción con el hipocampo [24; 25; 26; 27] y que dura varios días, semanas o meses en la mayoría de los paradigmas de aprendizaje.

La **evocación** es el proceso por el cual se expresa y usa la información o conocimiento adquiridos, consolidados y, posiblemente, asociados. Involucra la manifestación prácticamente simultánea de diferentes tipos de información, que pueden estar guardados en diferentes sitios y por diferentes mecanismos. En otras palabras, la evocación es el proceso por el que se puede manifestar lo aprendido.



Fig 1.3: Representación esquemática sobre línea temporal de las distintas etapas de la memoria (adquisición, consolidación, evocación, reconsolidación y extinción).

Una memoria puede ser medida por el desempeño en el momento de la evocación. En animales no humanos, la evocación de un aprendizaje se evidencia a través de cambios en el comportamiento (ver [13; 28; 29]).

La consolidación está caracterizada por ser un período de susceptibilidad a la acción de factores de interferencia. Cumplido ese período, se suponía que sigue una fase de memoria fija, incorruptible, inmodificable. Para muchos autores, esta idea de una memoria que queda adormecida mientras no sea evocada, y que aun siendo evocada permanece sin cambios por toda su vida, resulta incompatible con el hecho de que el sistema al que pertenece la memoria, el cerebro, es inestable y esencialmente dinámico. Por ello, aunque la idea de consolidación fue como un dogma durante más de cien años, estuvieron siempre en discusión estos aspectos “rígidos” de la hipótesis, propios de una interpretación simplista que contradecía el principio más dinámico de la propia hipótesis, aquel que propone un período abierto a la incorporación de nueva información en la memoria mientras ésta no está consolidada [1].

Actualmente se acepta que la memoria puede ser alterada o transformada cuando es evocada; puede ser extinguida o también ser reconsolidada. El concepto de reconsolidación lo propuso Sara [30]. En base a publicaciones de varios laboratorios [31; 32; 33; 34; 35; 36; 37; 38], observó que se podía generar una amnesia retrógrada cuando se reactivaba o bien se evocaba una memoria previamente al tratamiento amnésico. Si una rata que ha sido bien entrenada en una determinada tarea, y en consecuencia formó una memoria bien consolidada, es expuesta al entorno donde ocurrió el aprendizaje –generalmente a un refuerzo o a una clave recordatoria contextual- y luego se le aplica un tratamiento amnésico, luego el animal mostrará amnesia en la siguiente prueba de retención. Las memorias ya consolidadas, una vez reactivadas; son susceptibles de ser moduladas negativamente –vulnerables a agentes amnésicos- o positivamente –susceptibles a tratamientos que facilitan la consolidación de la memoria-. Cada evocación debería desencadenar un proceso de **reconsolidación**

[39; 40; 41; 42]. Más aun, la decodificación o la evocación cambiarán el contenido de información de la traza de forma tal que esa memoria pueda ser considerada desde un punto de vista neurobiológico como una propiedad emergente, dinámica y adaptativa del sistema nervioso [30].

Por otra parte, la re-exposición al entorno donde ocurrió el aprendizaje si no esta acompañada de estímulo incondicionado o refuerzo puede devenir en extinción. La **extinción** es la disminución paulatina de la respuesta a un estímulo condicionado o condicionable por la repetición de ese estímulo desvinculado de recompensa o castigos [43]. La extinción tiene un gran valor adaptativo, ya que gracias a ella dejamos de emitir respuestas inútiles una vez que éstas dejan de tener un propósito [44]

I. 5 Hipocampo. Aferencias y eferencias

El hipocampo es una estructura necesaria para la formación de memorias declarativas y ha sido ampliamente investigado su rol en la adquisición y formación de la memoria espacial en roedores [45]. Se le atribuye un rol preponderante en la formación de memorias de duración prolongada [46; 47; 48; 49; 50].

El lóbulo temporal medial es un sistema de memoria anatómicamente definido, el cual incluye la formación hipocámpica (hipocampo, *subiculum* y fimbria-fornix), la corteza entorrinal y las cortezas adyacentes (perirrinal y parahipocámpica) (fig 1.4 A) [51; 52]. La formación hipocámpica es uno de los componentes más importantes, dentro de las estructuras del lóbulo temporal medial, involucrada en la formación de memorias.

La corteza entorrinal (EC), que recibe información de varias regiones corticales, es la mayor entrada hacia el giro dentado (DG), y una de las entradas más importantes hacia el hipocampo y el *subiculum* (fig 1.4 B). En la principal vía excitatoria aferente la información fluye desde las células estrelladas de la capa II de la EC, a través de la vía perforante, hasta las células granulares del DG, de naturaleza glutamatérgica. Las células granulares hacen contacto sináptico, a través de las fibras musgosas, con las células piramidales de la región CA3. Las células piramidales de CA3 se conectan a través de las fibras colaterales de Schaffer con las células piramidales de la región CA1.

Finalmente, las células piramidales de CA1 envían proyecciones eferentes al *subiculum* a través del *alveus*, y a las células de las capas profundas de la EC, la cual se conecta directa o indirectamente a través de la corteza perirrinal y/o parahipocámpica a las cortezas cerebrales de asociación. Además, las células estrelladas de la capa II y las células piramidales de la capa III de la EC envían proyecciones

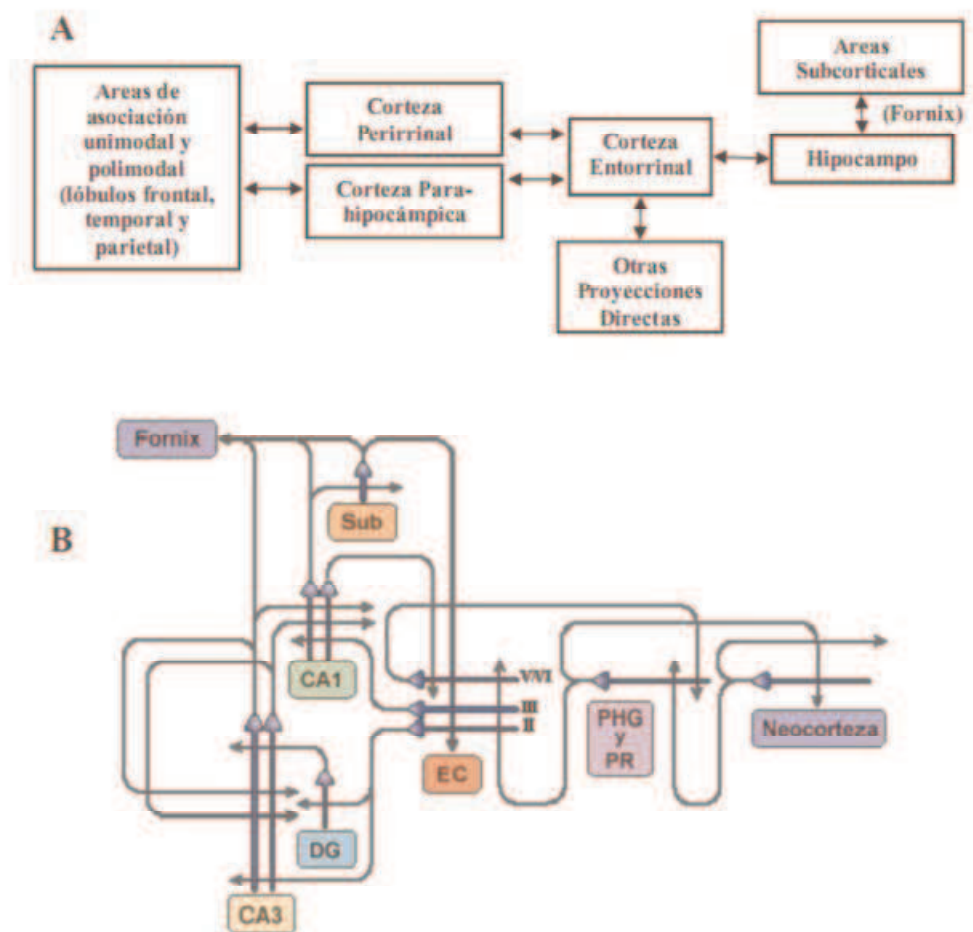


Fig 1.4: Sistema de memoria del lóbulo temporal medial.

A) Estructuras de la región del hipocampo que median la memoria declarativa (modificado de Zola Morgan *et al.*, 1994). B) Conexiones dentro la red córtico-hipocámpica. La información sensorial llega desde las áreas de asociación cerebral de la neocorteza (neocorteza) a las capas superficiales de la corteza entorrinal (EC) a través del giro parahipocámpico (PHG) y/o la corteza perirrinal (PR). La información es enviada desde la EC hacia el hipocampo. La región CA1 envía axones a áreas subcorticales y a las capas profundas de la EC, directamente o a través del *subiculum* (Sub). La red córtico-hipocámpica se completa con la información enviada desde CA1 hacia la corteza cerebral de asociación, a través de PHG y/o PR. Las líneas gruesas por debajo o a la derecha de los cuerpos celulares (triángulos) representan dendritas. En números romanos se indican las capas corticales. DG: giro dentado. (Modificado de Nakazawa *et al.*, 2004).

directas a la región CA3 a través de la vía perforante, y a la región CA1 a través de la vía temporoammoníaca, respectivamente. Asimismo, las células piramidales de CA3 están interconectadas por haces colaterales recurrentes, que corren tanto *ipsi-* como *contra-*lateralmente, lo cual hace que la conectividad entre estas células sea robusta. Tanto las células piramidales de CA1 como de CA3 envían eferencias al *septum* a través de la *fimbria-fornix*, y desde allí a otras estructuras subcorticales.

La formación hipocámpica recibe también distintas inervaciones aferentes subcorticales a través de la *fimbria-fornix* desde el área ventral (dopaminérgica), el *locus coeruleus* (noradrenérgica), los núcleos del rafe (serotoninérgica) y el septum medial (colinérgica). Toda la formación hipocámpica se encuentra altamente conectada, recibiendo información sensorial, propioceptiva y moduladora de distintas áreas del cerebro, y enviando información hacia diferentes regiones del cerebro. El hipocampo también está conectado con la amígdala y con otras áreas de la corteza, que también han sido implicadas en el procesamiento de la memoria.

El hipocampo de los roedores puede ser dividido en el giro dentado (DG), el área CA3 y el área CA1 (fig 1.5). Tiene una organización neuronal laminar. Existen distintos subtipos celulares, siendo las neuronas piramidales las mayoritarias y las que forman gran parte de la capa llamada *stratum pyramidale* [53]. Las neuronas piramidales cuentan con un árbol dendrítico apical y otro basal, que determinan dos regiones denominadas *stratum radiatum* y *stratum oriens*, respectivamente. Además existen en el hipocampo una variedad muy grande de neuronas no piramidales; la mayoría poseen el neurotransmisor inhibitorio GABA, y son consideradas como parte de circuitos neuronales locales [54].

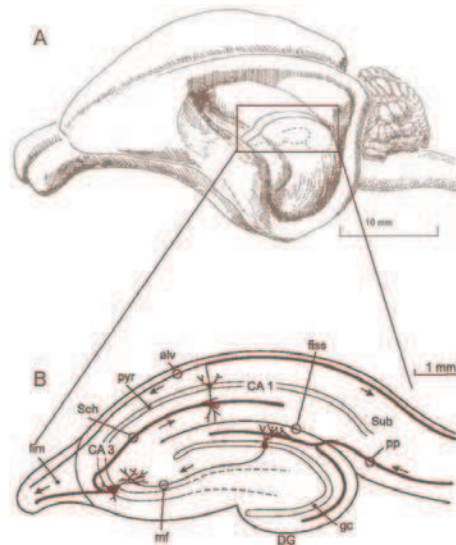


Figura 1.5: A. Esquema de un cerebro de rata, mostrando la ubicación del hipocampo. B. Principales vías del hipocampo en un corte sagital. *pp*: vía perforante; *cg*: células granulares; *mf*: fibras musgosas; *fim*: fimbria; *Sch*: vía colateral de Schaffer; *pyr*: células piramidales, *sub*: subiculum; *alv*: alveus. Las flechas indican el sentido de la transmisión sináptica. (Modificado de Siegel, G. *et al.*, 2006 [55]).

I.6 Papel de la formación hipocámpica

En 1953, con el propósito de aliviar una epilepsia refractaria al tratamiento médico, William Scoville realizó una remoción bilateral del lóbulo temporal medial (incluyendo el hipocampo) en el paciente conocido hasta su muerte, en 2008, como H.M. (iniciales de Henry Gustav Molaison). Como consecuencia de esta intervención, se manifestó en H.M. una pérdida selectiva de la memoria, la cual pareció afectar sólo su capacidad para formar nuevas memorias (amnesia anterógrada). Luego de la cirugía, H.M. conservaba memorias de lo anterior: recordaba su nombre, lenguaje, episodios de su niñez y, en general, de su vida hasta poco antes de la cirugía. Sin embargo, olvidaba los episodios de su vida diaria tan rápido como ocurrían. Esta amnesia anterógrada fue un indicador definitivo del importante rol que juega el lóbulo temporal, especialmente la formación hipocámpica, en los procesos de formación de memorias de larga duración.

Estudios posteriores, realizados por Milner y colaboradores con este paciente permitieron profundizar en la especificidad de los déficits de la memoria asociados a daño hipocámpal [56]. Por ejemplo, se evidenció que dicha amnesia anterógrada sólo afectaba las representaciones internas de los nuevos hechos y episodios que son accesibles a la evocación consciente (memoria declarativa o explícita), manteniendo intacta la memoria implícita. También hubo algún grado de amnesia retrógrada, es decir, incapacidad para recordar eventos ocurridos con anterioridad a la instauración de la amnesia. En general, el intervalo de tiempo comprometido en dicha amnesia retrógrada estaba poco extendido, lo que llevó a algunos autores a conjeturar que el rol del hipocampo en la memoria de largo plazo estaría limitado en el tiempo [57; 58]. Con los años, los recuerdos se irían reorganizando y consolidando, la participación del hipocampo iría disminuyendo y, gradualmente, la neocorteza se haría cargo de la memoria.

Casos como el de H.M. han permitido delinear el síndrome amnésico clásico [59]: definido como un deterioro selectivo y severo de ciertas formas de memoria, que se caracteriza por: a) amnesia anterógrada severa y permanente (de la memoria declarativa), b) amnesia retrógrada de extensión y duración variables, y c) memoria no declarativa, memoria de muy corta duración y otras capacidades intelectuales (percepción, lenguaje, pensamiento) intactas, dependiendo de lo extenso de la lesión. Entre las principales causas de este síndrome se encuentra la lesión bilateral del lóbulo temporal medial (hipocampo, amígdala y áreas corticales adyacentes).

A partir de esos estudios fue posible identificar las áreas anatómicas del lóbulo temporal relacionadas con la memoria. Las principales estructuras son: el hipocampo, el giro dentado, el complejo subicular, la corteza entorrinal y las cortezas adyacentes anatómicamente relacionadas (como la corteza parahipocámpica). La amígdala no parece ser un componente del sistema de memoria declarativa, pero puede ejercer un poderoso efecto modulador sobre ésta, potenciando la memoria de los aspectos emocionales de un evento.

1.7 Amnesia

El primer modelo animal para el estudio de la amnesia lo estableció Duncan en 1945. Aplicando un choque electroconvulsivo (ECS) luego de cada sesión diaria en un laberinto complejo, demostró una relación inversa entre la velocidad de aprendizaje y el incremento del intervalo temporal entre la sesión y la aplicación del tratamiento amnésico. Luego concluyó que sus resultados aportaban evidencia directa para sustentar la hipótesis de Müeller y Pilzecker, que establece la necesidad de preservar el sustrato neural luego del aprendizaje para que la memoria se consolide [60]. A partir de sus estudios se comenzó a utilizar el choque electroconvulsivo como agente amnésico, para estudiar la dinámica temporal de la consolidación de la memoria. Entonces, el estudio de la memoria se convirtió, principalmente, en el estudio de su funcionamiento a través de su disfuncionalidad.

La manipulación sobre las diferentes etapas y el estudio de las alteraciones del SNC, han permitido clasificar la alteración de la memoria en *amnesia anterógrada*, en la cual se ve afectada la capacidad de formar nuevas memorias, y *amnesia retrógrada*, en donde la falencia se observa al no poderse evocar una traza de memoria previamente fijada.

La amnesia retrógrada se estudia administrando tratamientos (choque electroconvulsivo, anestesia, hipotermia, etc.) que interfieran sobre la actividad cerebral que se inicia después de la adquisición de un aprendizaje. El estudio de este tipo de amnesia abrió camino para el estudio de la memoria desde un abordaje neurobiológico, en el que se puede evaluar la eficacia y la dinámica temporal de distintos tratamientos farmacológicos, sin interferir sobre la adquisición. Muchos estudios de la década del 60 evidenciaron que los antibióticos que inhiben la síntesis proteica, administrados antes, o inmediatamente después de un aprendizaje, tuvieron un efecto amnésico sobre la memoria evaluada luego de 24 h [61; 62; 63; 64]. Por otro lado, aquellos tratamientos que mejoran la función cerebral, como las drogas estimulantes [65], o la estimulación suave del sistema reticular ascendente, facilitaron la consolidación de la memoria. La característica común de los tratamientos amnésicos o promnésicos, es que van perdiendo la capacidad de deteriorar o mejorar la memoria respectivamente, a medida que se incrementa el intervalo de tiempo entre la adquisición y el momento en que se aplica el tratamiento, definiendo un gradiente de eficacia. Esta dependencia de tiempo sugiere que los efectos producidos en la retención inmediatamente después del entrenamiento, no se deben a efectos del tratamiento sobre la motivación, la atención, o sobre procesos motores o sensoriales que podrían alterar el propio entrenamiento y la adquisición en sí [65; 66; 67]. Con esta estrategia y teniendo en cuenta esta interpretación, los efectos serían directamente atribuibles a modificaciones en los mecanismos que llevan a la consolidación de las diferentes memorias, ya que la administración post-entrenamiento no afecta la adquisición.

En la década del '70, se planteó que la consolidación de la memoria no podía considerarse como algo independiente de la evocación [39; 68]. Weiskrantz (1966) sugirió que el síndrome de amnesia humana no se debería a una falla en la consolidación, sino que estaría relacionado con una disfunción en la evocación. Los pacientes pueden expresar una memoria normal bajo ciertas

condiciones durante un test, lo que sugiere que la traza de memoria se encontraría intacta, pero que no pudo ser evocada en otro momento o circunstancia. Además propuso que todos los síndromes amnésicos podrían deberse a una disfunción en la evocación [69]. Cuando se realiza un entrenamiento seguido de un tratamiento amnésico, se concluye que la consolidación de la memoria fue bloqueada a causa del tratamiento. Si la memoria puede expresarse luego de un recordatorio o debido a un tratamiento farmacológico, debe concluirse que la traza estaba presente y, por alguna razón, el animal no pudo expresarla a nivel comportamental [70].

En este trabajo se utilizaron diversos tratamientos amnésicos antes y después del entrenamiento. También se utilizó la exploración de un ambiente novedoso o familiar, para explorar los efectos sobre la memoria y sobre la amnesia inducida por los distintos tratamientos.

1.8. Glutamato

El glutamato es un aminoácido considerado como el neurotransmisor excitatorio por excelencia, ya que media la mayor parte de la neurotransmisión excitatoria rápida en el Sistema Nervioso Central (SNC). Es el principal mediador de la información sensorial, la coordinación motora, la emoción y el aprendizaje, incluyendo la formación de la memoria y la recuperación de la misma.

A los receptores de glutamato se los divide en dos categorías principales: los ionotrópicos, que son canales catiónicos, y los metabotrópicos, que activan enzimas intracelulares a través de proteínas G [71; 72; 73].

Receptores ionotrópicos: contienen el sitio de unión a agonistas y el canal iónico en el mismo complejo macromolecular. La unión del agonista produce cambios conformacionales en la molécula, lo que aumenta la probabilidad de apertura del canal. Según su capacidad de unir agonistas selectivos, se describieron tres clases de receptores ionotrópicos para glutamato: receptores NMDA (N-metil-D-aspartato), receptores AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasol propiónico) y receptores KA (Kainato). La afinidad por su ligando natural, el glutamato, es diferente para los diferentes subtipos de receptores. Los RNMDA requieren de un co-agonista, la glicina y pueden ser activados además por otros aminoácidos endógenos, como aspartato y homocisteína. Parecen ser tetrámeros, formados por el ensamblado de las subunidades individuales. Una característica importante es que la combinación de subunidades diferentes produce receptores funcionalmente diferentes [74].

1.8.1 Receptores NMDA. Composición, fisiología y localización

Son proteínas intrínsecas de membrana heterotetraméricas, compuestas por dos subunidades obligatorias NR1 y dos variables NR2 (NR2A-NR2D) y en algunos casos NR3 (NR3A-NR3B). [75; 76; 77].

Subunidad NR1: El gen NR1 es único, con ocho variantes de splicing expresadas ubicuamente en todo el cerebro, aumentando después del nacimiento progresivamente y manteniéndose una expresión importante a lo largo de toda la vida [76; 77; 78].

Subunidades NR2: Están codificadas por 4 genes distintos (NR2A-D). Determinan muchas de las propiedades farmacológicas y biofísicas del receptor. Son necesarias para el ensamblado sináptico del receptor [79; 80; 81]. NR2B estaría principalmente localizada en telencéfalo, NR2C en cerebelo, NR2D, en tálamo, mesencéfalo y tallo cerebral, mientras que NR2A parece distribuida en todo el cerebro [81].

Las distintas subunidades varían su expresión a través del desarrollo. NR2B y 2D se expresan prenatalmente, mientras que NR2A y 2C aumentan rápidamente luego del nacimiento. En adultos NR2A y 2B predominan en estructuras corticales, mientras 2C y 2D se encuentran en estructuras de cerebro medio y posterior [80; 82; 83].

La subunidad NR2 determina la afinidad por el Mg^{2+} extracelular, que bloquea normalmente el canal, y por el co-agonista glicina [79]. Existe un componente lento del desbloqueo de Mg^{2+} que está ausente en receptores NR1/NR2C y NR1/NR2D; este desbloqueo es más lento para NR1/NR2B que para NR1/NR2A [84]. Por eso, las despolarizaciones rápidas como los potenciales de acción, serían más eficaces para estimular el desbloqueo desde receptores con NR2A, que desde aquellos con NR2B [84].

Subunidades NR3: se conocen dos variantes, NR3A y NR3B. Si bien se expresan mucho menos que las NR2 en adultos, a lo largo del desarrollo NR3A y 3B difieren en su expresión: mientras que NR3A se encuentra aumentada en el desarrollo temprano hasta la pubertad y luego decae, NR3B exhibe su mayor expresión en adultos [75; 85; 86; 87].

1.8.2 Ligandos del RNMDA

Los ligandos endógenos y agonistas del RNMDA son aminoácidos ácidos, como el glutamato y el aspartato, así como el co-agonista glicina, con sus sitios de unión en la subunidad NR2. Los principales antagonistas competitivos tienen la base molecular de un agonista, a la que se le ha extendido la cadena hidrocarbonada con un anillo o se ha reemplazado el grupo carboxílico (ω) por ácido fosfórico; ejemplo de ellos son AP5 (ácido D-amino-5-fosfonopentanoico), AP7 para los sitios de unión a glutamato y 5,7-DCK (ácido 5,7-dicloro kinurénico), para el sitio de glicina. El RNMDA se diferencia de otros canales ligando-dependientes ya que cuando la membrana está hiperpolarizada, con un potencial inferior a -50 mV, la concentración de Mg^{2+} extracelular es suficiente para abolir el flujo de iones a través del receptor aun en presencia de glutamato y glicina [88]. A medida que la diferencia de potencial a través de la membrana disminuye, la afinidad entre el Mg^{2+} y su sitio de unión se debilita y el bloqueo se vuelve inefectivo. Una característica particular es que requiere de la unión simultánea de dos agonistas para su activación, ya que además del sitio de unión al glutamato en la subunidad NR2, es necesaria la unión de glicina [79; 89]. Cómo el Mg^{2+} extracelular bloquea la apertura del canal en forma dependiente de voltaje [88]; se utilizan como antagonistas moléculas que actúan de la misma forma, como el MK-801, la Ketamina y la Fenciclidina (PCP) (las dos últimas constituyen drogas de abuso) (ver fig.1.6).

Los RNMDA han sido involucrados en la etiología de diferentes enfermedades psiquiátricas y neurodegenerativas, como Parkinson [90], Alzheimer [91; 92; 93; 94; 95], así como también en infarto cerebral [96; 97], epilepsia [98] y en psicosis. Por otro lado, también se los involucra en circuitos de dolor y se reportaron efectos analgésicos de ciertos antagonistas [99; 100].

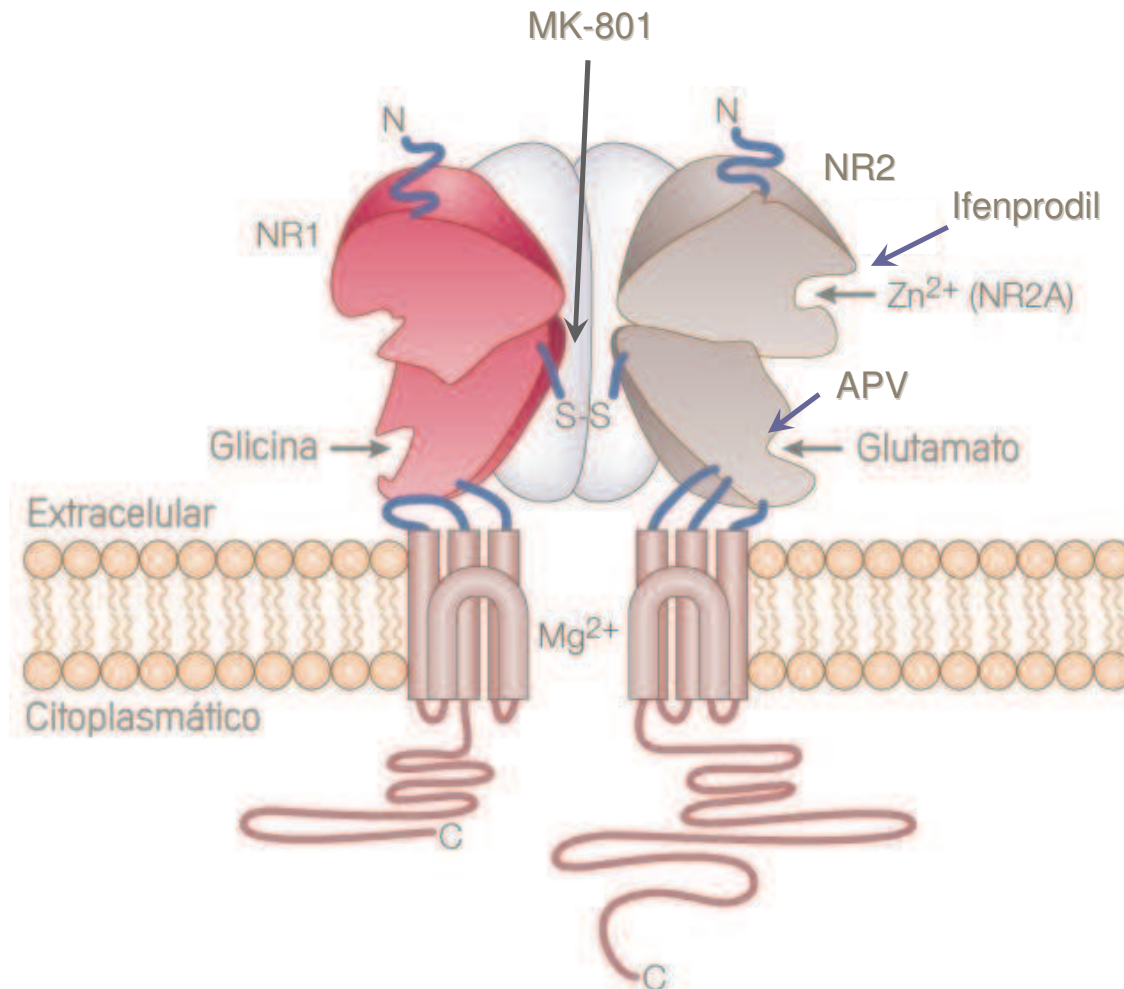


Figura 1.6: Vista esquemática del receptor glutamatergico ionotrópico NMDA. Se representan los sitios de unión a agonistas y antagonistas endógenos y exógenos.

1.8.3 RNMDA y plasticidad sináptica

A los RNMDA se les atribuye un rol clave en la plasticidad de las sinapsis de la región CA3-CA1 del hipocampo. Debido a sus propiedades biofísicas, estos receptores que, en condiciones basales se encuentran bloqueados por Mg²⁺ extracelular, se desbloquean cuando la membrana se despolariza; esto ocurre, por ejemplo, cuando se sostiene una alta frecuencia de estimulación del axón presináptico o del terminal sináptico. La activación de los RNMDA llevará a la apertura del

canal catiónico incorporado en la molécula, y al ingreso de Ca^{2+} al interior celular. Este ion actúa como mensajero intracelular activando varias proteína-quinasa; entre ellas, las más relevantes son CaMK II (proteína quinasa dependiente de Calcio-Calmodulina) y PKC (proteína quinasa dependiente de Ca^{2+}) [101; 102; 103]. Como consecuencia, se activan diferentes cascadas de señalización que culminan, entre otros efectos, con la incorporación de más receptores AMPA en la membrana de la espina dendrítica [104]. Al aumentar la concentración de dichos receptores en este compartimiento, la misma cantidad de neurotransmisor que antes provocaba la respuesta basal, ahora produciría una respuesta aumentada.

Muchos estudios indican que los distintos niveles de activación RNMDA y el y el nivel de ingreso de Ca^{2+} pueden dar lugar a distintos efectos en la sinapsis [105; 106]. Bajos niveles de activación del receptor conducen a depresión sináptica, mientras que niveles altos de activación producen potenciación sináptica [107; 108]. Incluso, niveles muy elevados de activación pueden conducir a la muerte celular [109].

1.8.4 RNMDA en aprendizaje y memoria

En 1986 Morris y col demostró que el bloqueo de los RNMDA del hipocampo de la rata por AP5 impedía la inducción de la potenciación de larga duración (del inglés *long term potentiation: LTP in vivo*, además de producir un deterioro específico de la memoria espacial de la versión espacial - con la plataforma sumergida del tanque de agua del laberinto acuático de Morris (del inglés *Morris water maze: MWM*) (la memoria de discriminación no se veía comprometida, y no observaron otros efectos comportamentales). De esta manera el autor planteó que los RNMDA estarían implicados en el aprendizaje espacial, y propuso una relación directa entre LTP del hipocampo y aprendizaje/memoria espacial. Entonces se ha postulado que el proceso de consolidación de (la) memoria involucra una serie de procesos muy similares a los que subyacen a la LTP en el hipocampo, particularmente en el área CA1 [110; 111]. Los receptores glutamatérgicos NMDA son considerados el disparador inicial para la plasticidad hipocampal y para la formación de memoria [16; 112; 113]. La administración de antagonistas en el hipocampo antes o después del entrenamiento en tareas dependientes de esta estructura, puede causar amnesia en la rata [16; 23; 113; 114; 115; 116]. En cambio, la activación de receptores NMDA en estructuras cerebrales relacionadas parece mejorar el aprendizaje y la memoria (ver [117]). Entonces, se requeriría de la activación de los RNMDA para el aprendizaje asociativo en adultos. Tales resultados fueron corroborados más tarde gracias a los experimentos genéticos en los cuales se sobreexpresaron o silenciaron genes específicos, en forma condicional, en el hipocampo de ratones. En 1996, Tsien y col. [118] desarrollaron un método para producir un *knockout* restringido (supuestamente) a las células piramidales de la región CA1 y utilizaron esta técnica para producir un ratón *knockout* para la subunidad NR1 del RNMDA restringido a las células piramidales de la región CA1 [119]. El ratón tenía una transmisión sináptica conservada, ya que los RNMDA tienen escasa o nula participación en la transmisión glutamatérgica ordinaria en el hipocampo. Sin embargo, la LTP en

la vía de colaterales de Schaffer estaba totalmente abolida y esos ratones no fueron capaces de formar memoria espacial. Por otra parte, En un trabajo previo de nuestro laboratorio, se modificó la expresión genética endógena de los receptores NMDA durante un período definido y en una región restringida del cerebro (mediante la utilización de vectores amplicón derivados del virus herpes simplex tipo 1). Cuando se inyectaron ratas en el hipocampo dorsal con estos vectores que expresaban ARN antisentido contra la subunidad esencial NR1 del receptor NMDA, el desempeño en SD-IA y la habituación al campo abierto se vieron seriamente deteriorados [120; 121; 122]. Esto indica que resulta necesaria la expresión y disponibilidad en las neuronas piramidales de CA1, de determinados niveles de receptores NMDA funcionales para la formación de una memoria de larga duración de la tarea de SD- IA y en la habituación a un campo abierto.

Se ha estudiado en ratas Wistar, el efecto del bloqueo de los RNMDA con AP5 (5µg) inyectado en el hipocampo, inmediatamente luego del entrenamiento en evitación inhibitoria de descenso, en un paso (SD-IA) o de la habituación exposición a un ambiente novedoso, en un modelo de rata. El AP5 antagonista tuvo un efecto amnésico sobre el desempeño en ambas tareas evaluadas. El efecto amnésico la memoria de SD-IA y la habituación al ambiente nuevo. AP5, también se evidenció fue amnésico cuando se lo inyectó en amígdala o en las cortezas entorrinal, parietal y singularcingulada [123]. En cambio, la inyección de glutamato en el hipocampo, inmediatamente luego del entrenamiento, en el hipocampo de glutamato dio lugar a una facilitación en la memoria de ambas tareas. [16].

La gran mayoría de los RNMDA de hipocampo, o de otras regiones involucradas, contienen subunidades NR2A y NR2B. El ratón **KO para NR2A** mostró **deterioro en aprendizaje y memoria, así como LTP reducida** en sinapsis de CA1 [124]. Un antagonista relativamente selectivo para NR1/NR2A (no disponible comercialmente, derivado de 5-fosfono metil-1,4-dihidroquinoxalin-2,3-diona [(1RS,10S)-PEAQX]; [125] cuyos efectos cognitivos no han sido descritos, inhibió la inducción de LTP en rodajas de hipocampo de ratas de 3 a 4 semanas [126], mientras que un antagonista selectivo para los RNMDA conteniendo la subunidad NR2B no la inhibió (pero abolió la inducción de la LTD), sugiriendo que las vías de señalización intracelular relacionadas con LTP estarían más ligadas a activación de NR1/NR2A [127].

El ratón **KO para NR2B** muere tempranamente luego del nacimiento por un comportamiento de succión anormal; se desconoce el impacto de la delección en la función cognitiva. Como los antagonistas NR2B (ifenprodil, Ro 25-6981, Ro 63-1908 y traxoprodil) no afectan el desempeño en tareas de evitación o la memoria espacial y/o de trabajo [128; 129], se podría especular que la traza de un aprendizaje dependiente de hipocampo estaría más relacionada a la actividad de receptores NR1/NR2A que NR1/NR2B. Aunque parecería que, bajo ciertas condiciones, aunque promovieron respuestas de tipo impulsivo en una tarea de tiempo de reacción frente a 5 opciones en serie (*five-choice serial reaction time*) “drogas NR2B” como traxoprodil mejoraron el rendimiento [129; 130]. El aparente mejoramiento en la memoria de trabajo por bloqueo de NR1/NR2B podría

reflejar bloqueo de esos canales en circuitos directamente involucrados en el procesamiento de esa información, o podría ser secundario a un cambio en la atención [131]. Por otro lado, la sobreexpresión de la subunidad NR2B del RNMDA en el prosencéfalo de ratones transgénicos, condujo a facilitación de la LTP inducida por un estímulo de 10 a 100 Hz. Estos ratones exhibieron habilidades superiores en el aprendizaje y la memoria de diferentes tareas de comportamiento: tanto para reconocimiento de objetos novedosos, como en el condicionamiento al miedo contextual y con claves y en el laberinto acuático con plataforma escondida [132]. Pero no hubo efecto evidente de la sobre-expresión de esta subunidad sobre la retención de una memoria de reconocimiento de olores. En cambio, cuando se utilizó un paradigma basado en la transmisión social de preferencia de alimentos, los ratones transgénicos manifestaron una ventaja notable en la memoria de este paradigma [133]. Por otra parte, ratas transgénicas Long Evans que sobre-expresaban expresan la subunidad NR2B en el hipocampo y en la corteza, no tuvieron cambios en la LTD de la región CA1, mientras que fue mayor la pendiente de la LTP. A nivel comportamental, estos animales evidenciaron un mejor desempeño de la tarea de reconocimiento de objetos novedosos, en el laberinto acuático espacial y en la prueba de memoria de trabajo “*delayed-to-nonmatch*” [134].

Un protocolo de estimulación que usualmente induce LTP, produce LTD en presencia de un antagonista NR2A [126]. Entonces, es posible que los protocolos que inducen depresión sináptica activen selectivamente NR1/NR2B [135]. Se piensa que alguna forma de debilitamiento sináptico prevendría la saturación de la LTP o la hiperexcitación [136] o serviría para “borrar” memorias.

Kim *et al.* [137] demostraron que los RNMDA median la inserción de GluR1 (RAMPA) en la membrana, a través de la activación/inhibición de Erk 1/2 (*extracellular signalling responsive kinase*). Se propone que este sería el principal mecanismo de la LTP dependiente de RNMDA, al menos en hipocampo [104]. Dicha inserción está dirigida por la CaM-KII (Ca-calmodulina quinasa II) y la vía de Ras-ERK. La hipótesis sugerida sería que NR2B inhibe, mientras que NR2A estimula, dicha expresión en superficie de los RAMPA regulando directamente el proceso de fusión [138; 139]. La regulación del tráfico de RAMPA ha surgido como el principal mecanismo de expresión de plasticidad sináptica, al menos en el hipocampo. Por otro lado, la LTD resultaría de la endocitosis de RAMPA. NR2B inhibiría Ras-ERK, produciendo remoción de los RAMPA sinápticos y debilitamiento sináptico [139].

I.9 Mecanismos moleculares del aprendizaje. Potenciación de larga duración (LTP)

Las primeras ideas acerca de cómo el cerebro podría formar y guardar memorias, parecen haber sido propuestas por Ramón y Cajal a fines del siglo XIX y, casi al mismo tiempo, por Sigmund Freud. El primero, teniendo en cuenta sus observaciones de una red de células en el cerebro, propuso que las neuronas estaban ligadas unas a otras en una unión especializada, la sinapsis, y que la modificación de tal unión podría ser la base anatómica responsable de la persistencia de la memoria. Entre tanto, Freud propuso que el pensamiento y el aprendizaje determinan cambios en la

conexión entre las células del sistema nervioso. De hecho, postuló el principio básico de la neuroplasticidad que establece una conexión eficaz entre aquellas neuronas que disparan juntas, mientras que aquellas que disparan por separado no establecen conexión. Freud llamó a este gran descubrimiento “ley de asociación por simultaneidad”. Esta ley implica que dos cosas o eventos que emergen juntos a nivel consciente, establecerán una asociación entre las conexiones neuronales involucradas del cerebro.

Donald Hebb publicó su famoso libro "*The Organization of Behavior, A Neuropsychological Theory*" en 1949. Este autor fue el primero en postular que la memoria podría comprender subsistemas de almacenamiento temporal de la información, dependientes de circuitos reverberantes y de cambios estructurales en las neuronas. Este concepto sigue actualmente en vigencia: la hipótesis postula que la memoria se establecería por coincidencia de actividad neuronal, es decir que, cuando dos células nerviosas que hacen sinapsis, están activas simultáneamente, puede ocurrir que la fuerza de la conexión sináptica aumente y permanezca así por largo tiempo, “conservando la memoria de aquella coincidencia”.

Los estudios de los últimos 50 años indican que hay cambios que ocurren en las sinapsis, en un proceso que se conoce como plasticidad sináptica. No hay consenso acerca de si los cambios ocurren a nivel presináptico o postsináptico, pero varios mecanismos moleculares que pueden ser importantes en el aprendizaje y la memoria, han sido encontrados en ambos sitios. Electrofisiológicamente se han encontrado dos tipos de fenómenos que podrían estar asociados a los mecanismos del aprendizaje y la memoria a nivel sináptico: la potenciación prolongada (LTP, del inglés “*long-term potentiation*”) y la depresión prolongada (LTD, del inglés “*long-term depression*”). En los años '70, dos hallazgos independientes ayudaron a dar forma a la idea de cómo el hipocampo participaría en la memoria espacial. Primero, en 1971 O'Keefe y Dostrovsky descubrieron que las células piramidales del hipocampo podían codificar información acerca del espacio (*place cells*). En segundo lugar, Bliss y Lomo (1973) descubrieron que las conexiones sinápticas dentro del hipocampo pueden producir LTP. Brevemente, cuando se aplica un tren de estímulos eléctricos de alta frecuencia en alguna de las tres mayores vías del hipocampo, se produce un aumento en “la fuerza” de la sinapsis en dicha vía, es decir, un aumento de la probabilidad de transmisión a través de dicha sinapsis. Este estado puede durar horas en animales anestesiados o días en animales en estado de alerta y con libertad de movimiento. La LTP resultaría adecuada como un mecanismo de almacenamiento ya que: 1. Se ha encontrado que ocurre en las tres vías principales en el hipocampo: la vía perforante, la vía de las fibras musgosas y la vía de las colaterales de Schaffer [48]; 2. Es rápidamente inducible, pues para provocarla es suficiente aplicar un solo tren de estímulos eléctricos (ver [140; 141]); 3. Una vez inducida, es estable por horas o días dependiendo del número de repeticiones del estímulo [140; 142].

La LTP difiere en las distintas vías del hipocampo: mientras que la LTP de las fibras musgosas puede ser no asociativa, es decir que no se requiere la coincidencia de actividad en la presinapsis y

en la postsinapsis [143], la LTP en la vía perforante y en las colaterales de Schaffer es asociativa, o sea que requiere de coincidencia en la actividad presináptica y postsináptica [144; 145].

Los axones que forman las colaterales de Schaffer usan glutamato como neurotransmisor y producen LTP principalmente por activación postsináptica a través de receptores de glutamato ionotrópicos y metabotrópicos. Para la activación del receptor RNMDA, se requiere de la unión de los agonistas (liberados desde la presinapsis), a la vez que del desbloqueo del canal que se encuentra unido a Mg^{2+} (por despolarización de la membrana postsináptica), por lo que ha sido considerado un detector de coincidencia (Fig 1.7). Una vez activado el receptor NMDA, el Ca^{2+} fluye a través del canal, y desencadena cambios subsecuentes y persistentes en la expresión a nivel de la sinapsis de receptores ionotrópicos AMPA (ácido alfa- amino-3-hidroxi-5 metilisoxazol-4-ácido propiónico) [104; 146; 147], aumentando entonces la transmisión debida a este receptor [148; 149]. Dicho flujo de Ca^{2+} puede inducir LTP, activando directa o indirectamente distintas cascadas de señales intracelulares [148; 150; 151; 152; 153; 154; 155].

Por lo tanto, resulta claro que la LTP tiene características que la hacen atractiva como uno de los mecanismos que el hipocampo usaría para formar y, posiblemente almacenar por cierto tiempo, diversas memorias, especialmente declarativas y espaciales [6; 156]. La LTP ha sido más estudiada en las vías del hipocampo que en ninguna otra estructura. Sin embargo, se sabe que existe en varias regiones del cerebro, incluidas la neocorteza, la amígdala y el estriado [157; 158; 159].

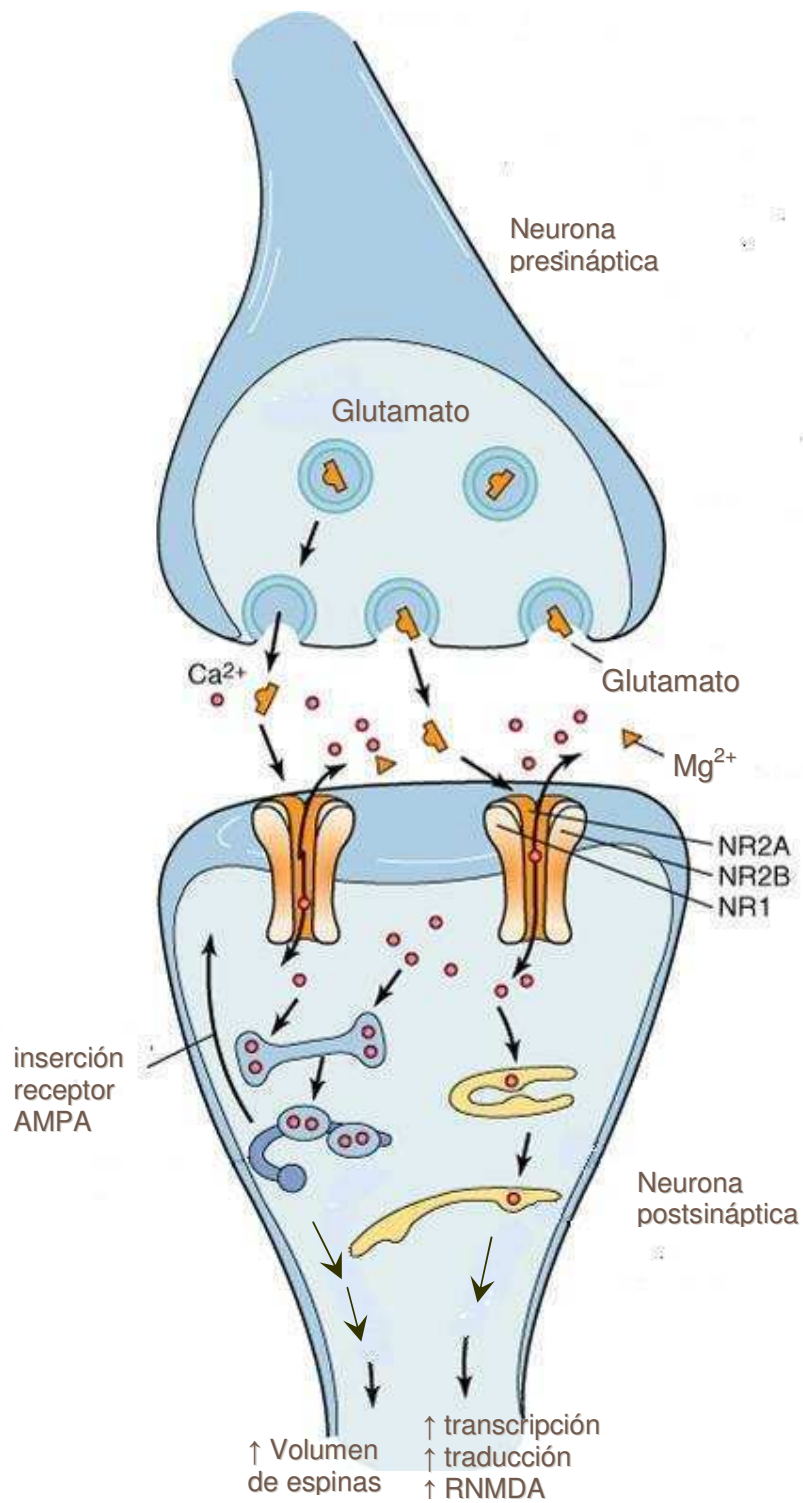


Figura 1.7: Esquema de una sinapsis glutamatérgica y algunos de los posibles efectos por la activación de cascadas implicadas en la LTP (Modificado de Siegel, G. *et al.*, 2006).

1.10 Hipocampo, Novedad y LTP

Recapitulando: Casos como el de H.M. han permitido delinear el síndrome amnésico clásico [59], que se caracterizó principalmente por una amnesia anterógrada severa y permanente, y una amnesia retrógrada que afectó un intervalo de tiempo poco extendido. Esta evidencia llevó a algunos autores a conjeturar que el rol del hipocampo en la memoria de largo plazo estaría limitado en el tiempo [57; 58]. Con los años, los recuerdos se irían reorganizando y consolidando, la participación del hipocampo iría disminuyendo y, gradualmente, la neocorteza se haría cargo de la memoria. El hipocampo intervendría durante la adquisición y consolidación de la memoria declarativa o explícita. También ha sido ampliamente investigado su rol en la adquisición y formación de la memoria espacial en roedores [45]. Las conexiones sinápticas dentro del hipocampo pueden producir LTP [141]. Además las células piramidales del hipocampo podrían codificar información acerca del espacio (*place cells*) [160]. A estas células también se les atribuye un rol preponderante en la formación de memorias de duración prolongada [46; 47; 48; 49; 50].

También el hipocampo puede actuar como detector de novedad [161; 162; 163; 164]. Li y col. (2003) se preguntaron si la atención sobre eventos novedosos puede promover aquellos mecanismos de plasticidad sináptica que se suponen necesarios para el almacenamiento de la memoria de esos eventos. Evidenciaron que la exposición a un **ambiente novedoso** promovía, disminuyendo el umbral para la inducción (dependiente de activación) de incrementos persistentes en la transmisión glutamatérgica (LTP) en las sinapsis de la región CA1 del hipocampo de rata [165].

Por otra parte, se había reportado que la novedad promueve la reversión de la LTP previamente establecida (depotenciación) [166; 167; 168]. Estos dos fenómenos (facilitación vs. reversión de la LTP) se complementan entre sí. Entre los factores individualizados que parecieran controlar la dominancia entre esos fenómenos, ya sea de facilitación de la inducción, o de reversión de la expresión de LTP, se encuentran: la secuencia exposición a la novedad/estimulación de condicionamiento; la fuerza de la estimulación del condicionamiento [166] y el tiempo de exposición a la novedad [165].

1.10.1 Efecto de la Novedad en el Comportamiento

La experiencia comportamental previa de un animal puede llegar a influir la dirección y probabilidad de una plasticidad de larga duración inducida en sinapsis activas. La exposición a un ambiente novedoso puede originar distintos efectos, como ya se mencionó: puede revertir retroactivamente una LTP recientemente adquirida [166] y puede afectar, interfiriendo [2; 169] o facilitando la formación [170] o la evocación [171] de una memoria de la evitación inhibitoria.

Motanis y Maroun (2010) estudiaron las alteraciones en la inducción de la LTP en la región CA1 del hipocampo de la rata, asociadas a la evocación de una memoria de miedo [172]. Cuando se realizó el test en el mismo contexto del condicionamiento una hora después del entrenamiento, se comprobó una inhibición en la inducción de la LTP. En cambio, luego de la exposición a un

ambiente novedoso una hora después del mismo condicionamiento del miedo, hubo un incremento en magnitud de la LTP, con respecto a animales que fueron entrenados en condicionamiento del miedo pero que permanecieron en sus jaulas hasta el momento del registro electrofisiológico. A su vez, cuando se expuso a los animales a un ambiente novedoso 24 h después del condicionamiento, la expresión de la LTP se vio inhibida [172].

La formación de una memoria de habituación a un ambiente novedoso requiere de los RNMDA luego del entrenamiento [16; 114; 173; 174] y de la actividad CaMKII del hipocampo [175; 176].

1.10.2 Hipótesis de “Etiquetado sináptico y captura de proteínas”

Clásicamente se dividió la LTP en dos fases; una temprana cuya inducción no es afectada por inhibidores de la síntesis proteica, y una fase tardía más persistente, cuya inducción se bloquea por estos inhibidores. Frey y Morris (1998) propusieron una nueva propiedad de la LTP: la persistencia variable [177]. Además, estos autores postularon la hipótesis de “etiquetado sináptico y captura” a partir de una serie de experimentos electrofisiológicos en rebanadas de hipocampo, estimulando dos vías independientes. Demostraron que un estímulo tetanizante débil puede inducir una LTP temprana (un estadio transitorio de LTP) y que esta puede convertirse en LTP más persistente en caso de que haya una proximidad temporal entre la aplicación de un estímulo fuerte y uno débil. Esto llevó a la idea de que la inducción de la LTP estaría asociada con la formación de una “etiqueta sináptica” en aquellas sinapsis que fueron activadas. Esta etiqueta tendría el rol de secuestrar proteínas vinculadas con plasticidad sináptica, que servirían para estabilizar aquellos cambios sinápticos transitorios y, de esa forma, extender la persistencia de estos cambios. Como la LTP es un proceso a nivel celular que se postula como mecanismo que subyace a los procesos de memoria y aprendizaje, esta posibilidad de modificar la persistencia de la LTP podría permitir extender la ventana temporal para la transformación de una STM en una LTM [177].

Moncada y Viola (2007) evaluaron esta hipótesis en experimentos de comportamiento en ratas. Utilizando el paradigma de evitación inhibitoria, que depende del hipocampo, reportaron que un entrenamiento débil en esta tarea, que no generaría una memoria de larga duración, pudo generarla cuando se lo realizó dentro de un periodo próximo a la exploración de un campo abierto, también dependiente del hipocampo. El efecto promotor del campo abierto sobre la memoria de SD-IA dependería de la activación de los receptores de dopamina D1/D5 y requeriría de la síntesis proteica del hipocampo dorsal. Entonces los autores propusieron haber evidenciado un proceso de “etiquetado comportamental”, en el que la exploración de un ambiente novedoso proveería de proteínas vinculadas con plasticidad sináptica, que estabilizarían la traza de memoria de la SD-IA [170].

1.11 Acetilcolina

La acetilcolina (ACh) consiste en colina (una sustancia presente en los alimentos, que es asimilada por las células colinérgicas mediante un sistema de *up-take* dependiente de sodio) y un grupo acetilo provisto por acetil-Coenzima A (producida intracelularmente por el metabolismo oxidativo en la mitocondria). La síntesis de la ACh ocurre en los terminales axónicos y es catalizada por la Colina-Acetiltransferasa (ChAT). El sistema colinérgico ha sido objeto de interés para el estudio del funcionamiento del SNC. Desde la década del '50 ya era conocido el efecto de los anticolinérgicos en aprendizaje y memoria [178; 179; 180; 181; 182; 183]. También se postuló tempranamente la disfunción colinérgica como un evento determinante en la enfermedad de Alzheimer [184].

1.11.1 Receptores acetilcolina muscarínicos

El descubrimiento de la muscarina y sus sitios de unión, los receptores muscarínicos (RACHM), tiene su origen en el estudio de los efectos fisiológicos del hongo, *Amanita muscaria* (el interés en este hongo se debía a sus efectos psicotrópicos (aunque no se deberían a muscarina, sino probablemente a otros alcaloides como el ácido iboténico). Schmiedeberg y Koppe (1869) describieron que extractos del hongo podían enlentecer y, a concentraciones más altas, incluso detener, el latido del corazón de rana. Purificaron el extracto y le dieron el nombre de muscarina.

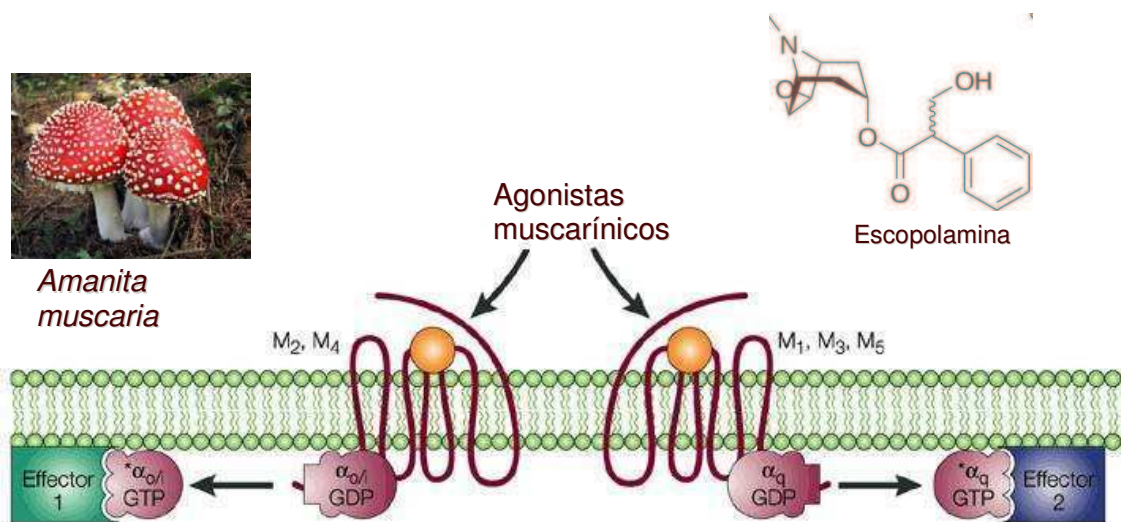


Fig 1.8: Vista esquemática del receptor de acetilcolina de tipo muscarínico. Se representa la estructura química de su antagonista, escopolamina (arriba a la derecha) y se muestra, una foto ilustrativa de *Amanita muscaria* (arriba a la izquierda). Modificado de Neubig & Siderovski, 2002. Nature Reviews Drug Discovery 1, 187-197 (March 2002)

En 1914, Henry Dale describió el efecto de la nicotina (derivada de la planta del tabaco *Nicotiniana tabacum*) y lo distinguió del efecto de la muscarina (la primera, antagonizada por curare y la segunda, por atropina). En 1921 la ACh fue confirmada como neurotransmisor por Otto Loëwi, al

demostrar que era liberada de terminales nerviosas del nervio vago al ser estimulado. Quedó así identificado el primer neurotransmisor. Dale y Loëwi recibieron el premio Nobel de Medicina en 1936.

Los **receptores nicotínicos de acetilcolina** (RACHN) son ionotrópicos. La unión de ACh a estos receptores ionotrópicos, la unión de la ACh provoca la apertura del canal y el ingreso de cationes monovalentes, principalmente Na⁺. Su activación está ligada a cambios rápidos y, en general, de corta duración (fásicos).

Por el contrario, los receptores muscarínicos de ACh (RACHM) son metabotrópicos. Su, su activación involucra una sucesión de interacciones entre proteínas y reacciones enzimáticas, lo que determina que las respuestas que desencadenen sean, en general, más lentas y prolongadas (tónicas).

Los RACHM son codificados por cinco genes diferentes que dan cinco proteínas receptoras (M1-M5) [185] y, que pertenecen a la superfamilia de receptores de siete segmentos de membrana, que se acoplan a proteínas G (proteínas de membrana que unen GTP) [185]. Por unión del neurotransmisor, los receptores M1, M3 y M5 preferentemente estimulan la degradación del fosfatidil-inositol: el complejo ligando-receptor activa la proteína Gq y ésta activa a la fosfolipasa C, que genera DAG (diacilglicerol) e IP3 (inositol tri-fosfato) a partir del fosfatidil-inositol [186]. La activación de los receptores M2 y M4 conduce preferentemente por vía de la proteína Gi, a la inhibición de la actividad de la enzima adenilato ciclasa, y por tanto, adenilato ciclasa, por vía de la proteína Gi, y a una disminución consecuente de la concentración citoplasmática del segundo mensajero AMPc [186; 187; 188].

1.11.2 Sistema colinérgico, RACHM, excitabilidad de las neuronas del hipocampo, aprendizaje y memoria

En líneas generales, el sistema colinérgico central está constituido por tres grandes subsistemas: el sistema septo-hipocámpico que proyecta del *septum* medial al hipocampo; las células colinérgicas del núcleo *basalis magnocellularis* que proyectan hacia amígdala y corteza; el tálamo límbico que recibe aferencias colinérgicas del núcleo tegmental latero-dorsal [189].

Parte del sistema colinérgico con origen en el *septum* medial y en la banda diagonal de Broca, que inerva por completo a la formación hipocampal, modularía la plasticidad sináptica [190; 191; 192] y pareciera ser esencial para la formación de memorias [193; 194]. Detrás de la modulación de la excitabilidad celular y la transmisión sináptica de los circuitos del hipocampo subyace la habilidad de ACh para influir sobre las propiedades dinámicas de la red hipocampal, desencadenando así un rango de estados oscilatorios estables, entre ellos el ritmo *theta* [195]. Hay correspondencia entre el ritmo *theta* del hipocampo y la adquisición de miedo contextualizado [196]. Se ha propuesto que aquellas alteraciones del aprendizaje causadas por antagonismo colinérgico podrían involucrar disrupciones en el ritmo *theta* [197].

El bloqueo de los RChM por administración de escopolamina intrahipocampo, inmediatamente luego del entrenamiento en SD-IA o de la habituación a un ambiente novedoso, en ratas Wistar, tuvo un efecto amnésico sobre el desempeño de ambas tareas. En cambio la inyección del agonista muscarínico oxotremorina en el hipocampo, inmediatamente luego del entrenamiento, dio lugar a una facilitación de ambas tareas [16].

En ratones, la administración del agonista muscarínico, oxotremorina, o del inhibidor de la acetilcolinesterasa, fisostigmina (ambos de acción central) 10 min después del entrenamiento (por vía i.p.) o inmediatamente luego del entrenamiento (tanto por vía i.p. como por vía subcutánea) en ST-IA, mejoró significativamente la LTM evaluada a las 48 h [198; 199]. De esta manera se puso en evidencia que acetilcolina y los RChM **juegan un rol de modulación positiva** en la consolidación de la memoria de la ST-IA.

La infusión del antagonista muscarínico, escopolamina, en el hipocampo dorsal de la rata inmediatamente luego de la primera sesión en un campo abierto novedoso, tuvo un efecto de amnesia retrógrada, impidiendo que se manifestara habituación. En cambio la infusión del agonista muscarínico oxotremorina dio lugar a una habituación más pronunciada en el campo abierto. Los **RChM del hipocampo dorsal modularían positivamente la consolidación de la memoria de habituación a un campo abierto** [200].

La inyección de oxotremorina, previa al test de una respuesta condicionada (con componentes emocionales) mejoró el desempeño de ratones durante dicha sesión. La escopolamina bloqueó este efecto facilitatorio [201]. Los RChM **tendrían un rol de modulación positiva** en la evocación de una memoria con componentes espaciales.

La activación de los RChM modula la excitabilidad neuronal de forma dual: a diferentes concentraciones de agonistas muscarínicos puede haber aumento o disminución de la actividad eléctrica. Esta variedad de efectos sugiere que en cada caso estarían interviniendo diferentes subtipos de RChM. Se han identificado cinco subtipos de RChM (M1-M5) y todos se expresan en el hipocampo. Están involucrados en fenómenos de plasticidad sináptica, como la LTP y en funciones cognitivas [202].

La administración del antagonista muscarínico, selectivo para los receptores **M2** AF-DX 116, luego del entrenamiento de ratones en ST-IA, facilitó el desempeño en esta tarea, evaluado a las 48 hs. El efecto facilitatorio de este antagonista pudo prevenirse por la administración del antagonista muscarínico, no selectivo, atropina luego del entrenamiento, previa al tratamiento con AF-DX 116. De esta manera se puso en evidencia que los RChM **M2 juegan un rol de modulación negativa** en la consolidación de la memoria de la ST-IA [203].

En nuestro laboratorio se han usado toxinas muscarínicas (identificadas como MT) aisladas a partir de la fracción proteica del veneno de la mamba verde oriental (*Dendroaspis angusticeps*) como herramienta farmacológica para poder dilucidar la participación de los distintos subtipos de RChM en procesos de plasticidad sináptica, y en fenómenos cognitivos. Estas toxinas presentan

selectividad de unión a determinados subtipos de receptores, permitiendo una identificación más clara de los mismos que la obtenida con los agentes disponibles más conocidos.

MT7 es un antagonista altamente selectivo por M1. MT7 al igual que escopolamina (antagonista muscarínico) y pirenzepina (antagonista selectivo para M1 y M4) bloquearon la inducción de la LTP (por estimulación de ráfagas *theta*) en la región CA1 de rebanadas de hipocampo [204].

MT1 y MT2 son agonistas M1 y antagonistas M4. Cuando se administró MT2 en el hipocampo de la rata, inmediatamente después del entrenamiento en SD-IA, tuvo un efecto facilitador sobre el desempeño de esta tarea evidenciando la **modulación positiva de los M1 en la consolidación de la memoria** de la SD-IA [205]. También MT2 aumentó el potencial de campo registrado en la región CA1 de rebanadas de hipocampo. Este aumento se pudo bloquear por pirenzepina y por atropina, evidenciando la intervención de M1 en este efecto. Por otra parte, MT1 aumentó el potencial de campo registrado en la región CA1 de rebanadas de hipocampo. MT7 pudo bloquear este aumento. Se pudo concluir que los receptores **M1 modulan positivamente la transmisión basal** en las sinapsis de la región CA1 [206].

MT3 es el antagonista disponible más selectivo para los subtipos de receptores M4. La administración de MT3 en la región CA1 del hipocampo de la rata, inmediatamente después del entrenamiento tuvo un efecto amnésico sobre la LTM de SD-IA evidenciando la **modulación positiva de los M4 en la consolidación de la memoria** de la SD-IA [205]. En las sinapsis de las vías colaterales de Schaffer de la región CA1 del hipocampo, la escopolamina y MT3 bloquearon la inducción de la LTP, sugiriendo que los receptores **M4 parecerían tener un rol de modulación positiva sobre la transmisión de las sinapsis excitatorias**. Además, la activación de M1 en concomitancia con el bloqueo de M4 por la toxina muscarínica MT1 sólo permitió la inducción de una breve STP. Entonces, con el bloqueo de los receptores **M4 por MT3** se obtuvo una fuerte evidencia del rol de **modulación positiva** de este subtipo de receptores muscarínicos, como también sugirió una importante **participación en la plasticidad de las sinapsis de las vías colaterales de Schaffer de la región CA1 del hipocampo** [207].

También se reportaron cambios en la proporción de RChM: en ratas macho con un entrenamiento suave en ST-IA, se observó aumento de los receptores muscarínicos M1 en estriado, hipocampo y corteza, y una disminución del subtipo M2 en el hipocampo. Asimismo, en la corteza también se reportó un aumento del receptor M2 [208].

Se ha demostrado ampliamente la participación de los RChM en la regulación de la transmisión glutamatérgica, incluyendo la supresión de la transmisión en las sinapsis de las colaterales de Schaffer en el hipocampo, por un mecanismo presináptico [209; 210; 211; 212]. Ha sido sugerido, en base a evidencia farmacológica, que en esta supresión estarían involucrados los receptores M1 y M2 [213; 214; 215]. Estos efectos presinápticos no serían incompatibles con efectos postsinápticos que causan aumento de la excitabilidad y de la eficacia sináptica de las células piramidales de CA1 [216; 217]; se ha sugerido que dicho aumento de excitabilidad estaría mediado por M1. En un estudio más reciente, se evaluó el rol de los RChM en la LTP *in vivo* y se sugirió que el receptor

M2 sería el responsable la potenciación de la transmisión glutamatérgica de CA1, actuando en la presinapsis [218].

1.12 Interacción entre el sistema colinérgico y el sistema glutamatérgico

Se ha propuesto un efecto sinérgico entre el sistema colinérgico y el glutamatérgico. La administración conjunta de bajas dosis de MK-801 y de escopolamina (que no tuvieron efecto por sí solas), deterioraron la memoria en ratas Wistar inyectadas antes del entrenamiento en ST-IA (con 0,5 mA). Los autores interpretaron que habría un mecanismo interactivo entre los RNMDA y los receptores muscarínicos en el procesamiento de la memoria [219]. Por otra parte, se ha reportado que el agonista parcial, D-cicloserina, que se une al sitio de glicina del RNMDA, atenúa el déficit de memoria ocasionado por escopolamina en el MWM y en un paradigma de alternancia en el laberinto en T [220]. Estos resultados sugieren una estrecha conexión en la neurotransmisión mediada por receptores muscarínicos y NMDA, que participa en el procesamiento de la memoria.

Registrando en rodajas de hipocampo, Markram y Segal (1990) observaron, que la acetilcolina que actúa sobre los receptores muscarínicos, amplificaba la respuesta mediada por RNMDA, produciendo facilitación de larga duración de los potenciales postsinápticos. Este y otros trabajos muestran que la actividad colinérgica modula la transmisión glutamatérgica postsináptica del hipocampo a través de RChM [221], en concordancia con lo reportado a nivel comportamental [220; 222]. Si bien la activación de los receptores glutamatérgicos es necesaria, parece no ser suficiente para la inducción de LTP. Por otro lado, la ACh es capaz de potenciar respuestas electrofisiológicas inducidas por la administración de NMDA o glutamato [222].

En síntesis, como ya se mencionó, la región CA1 del hipocampo de roedores recibe proyecciones colinérgicas del núcleo septal medial (Lewis and Shute, 1967; [223]. En las neuronas piramidales de la región CA1, la activación de RChM aumenta la respuesta mediada por RNMDA [224; 225; 226] e inducen liberación de Ca^{2+} de los depósitos del retículo endoplasmático. Ello generaría una LTP por inserción de más receptores AMPA en las espinas de las neuronas piramidales estimuladas [227].

1.13 Diferencias entre machos y hembras en aprendizaje y memoria

Los trabajos de comportamiento en ratas están hechos en su gran mayoría en machos, para evitar la variabilidad asociada al ciclo estral de las hembras. Este ciclo afecta otro tipo de comportamientos, más allá de aquellos vinculados con el comportamiento reproductivo y, por lo tanto, puede llegar a introducir una gran variabilidad en los resultados [228; 229; 230; 231; 232]. Hay abundante bibliografía reportando una relación entre el estado reproductivo de las hembras y la capacidad de formación de memorias. Esta relación con el estado reproductivo se atribuyó a cambios en la función del hipocampo [233].

Las fluctuaciones cíclicas en los niveles de estrógenos de las hembras dan origen a cambios de tipo morfológicos [234; 235; 236], neuroquímicos [237; 238; 239; 240] y electrofisiológicos [238; 241;

242; 243], en distintas áreas cerebrales muy involucradas en aprendizaje y memoria, como hipocampo, estriado, amígdala y corteza prefrontal [243; 244].

Se ha reportado que el estradiol mejora el desempeño en distintas tareas de aprendizaje y memoria, tanto en modelos animales como en humanos [245]. Algunas habilidades cognitivas serían entonces susceptibles a la modulación por estrógenos [246; 247; 248], a través de su acción directa o indirecta en el hipocampo [248; 249]. En especial, se ha demostrado que los cambios cíclicos en los niveles de estrógenos endógenos modulan la inducción de LTP y LTD de la región CA1 del hipocampo. [241]. Además, otros trabajos muestran que el estradiol mejora la memoria espacial en aquellas hembras que tienen bajos niveles de esta hormona [250; 251; 252; 253]. Sin embargo, aunque la administración crónica de estradiol sistémico puede mejorar aprendizaje y memoria [245; 254; 255]. En cambio, durante el proestro el nivel elevado de estrógenos lleva a un deterioro en el desempeño en el MWM, [251; 256] o en tareas de evitación [257; 258], todas ellas dependientes del hipocampo. Se ha propuesto que los estrógenos pueden influir sobre la excitabilidad neuronal en el hipocampo por medio de la modulación de corrientes a través de receptores NMDA, AMPA y GABA [259; 260]. En el proestro, se observó un aumento en los niveles de Ca^{2+} mediados por receptor NMDA y una facilitación en la inducción de la LTP; mientras que la LTD se vio considerablemente atenuada- respecto de otras fases del ciclo estral [241].

Algunos estudios con ratas mostraron que los machos tuvieron un mejor desempeño que las hembras en tareas espaciales [261; 262], mientras que en otros estudios, las hembras fueron equivalentes a los machos o mostraron un mejor desempeño [263; 264]. Pareciera que los machos y las hembras tienen distintos umbrales de reacción a las situaciones de estrés [263; 264; 265; 266] y frente a estas situaciones exhiben diferente actividad locomotora [267].

1.13.1 Dimorfismo sexual en memoria espacial

Las diferencias en el desempeño de los machos respecto de las hembras, en tareas de memoria espacial, podrían deberse a factores de dimorfismo sexual no cognitivos (sensibilidad al estrés, rendimiento locomotor). Se ha reportado que dichas diferencias pueden equipararse realizando pre-entrenamientos [253; 264]. Algunos estudios sugieren que las diferencias en el desempeño espacial se deberían al uso de distintas estrategias [268; 269; 270]. Si bien muchos trabajos demuestran un mejor desempeño espacial en los machos, los resultados variaron ampliamente dependiendo de la tarea utilizada para evaluar la memoria espacial [271; 272; 273]. Generalmente, estas diferencias son atribuidas a una lateralización diferencial del cerebro, a interacciones de hormonas gonadales o a interferencias de otros comportamientos que compiten por la respuesta [274].

Por otra parte, Roof (1993) observó en ratas Sprague Dawley adultas y pre-puber diferencias entre machos y hembras en el desempeño en el MWM que las atribuyó a diferencias en la capa granular del giro dentado [275]. Y en ratas adultas y en ratones de la pradera salvajes se han reportado otras

diferencias entre machos y hembras en el hipocampo [276], posiblemente vinculadas con diferencias en el desempeño espacial [277].

1.13.2 Dimorfismo en habituación a un campo abierto

Como ya hemos mencionado en la sección I.2.1 (pag 17) el campo abierto es un paradigma basado en la observación del cambio en la actividad exploratoria del animal, a medida que este se vuelve familiar. Esta tarea tiene un gran componente espacial y depende del hipocampo. En el campo abierto se pueden detectar diferencias en el desempeño de machos y hembras [278; 279]. Según Alstott y Timberlake las ratas macho en un campo abierto modificado (sin paredes periféricas, pero con paredes centrales) en condiciones de oscuridad pasaron más tiempo en el área central de la arena, donde encontraron “mas refugio”, respecto de las hembras que pasaron mas tiempo en la región periférica de la arena “más expuesta” [280]. Otros trabajos reportaron que las ratas macho evidenciaron un comportamiento mas temeroso y cauteloso en el campo abierto (mayor número de defecaciones y menor actividad exploratoria) comparados con las hembras [278; 279].

Se han reportado diferencias de género referidas a la sensibilidad al estrés [281; 282; 283; 284]. Grupos de machos Sprague–Dawley el primer día de exposición al estrés respondieron con una disminución en la actividad en el campo abierto respecto de controles no sometidos a estrés. Pero con las sucesivas sesiones de test en el campo abierto fueron recuperando el nivel de actividad hasta alcanzar los niveles de los controles no sometidos al estrés. Mientras que, las hembras de la misma cepa, frente la exposición al estrés no recuperaron el nivel de actividad en el campo abierto luego de sucesivas sesiones de test [283; 285]. En los machos la adaptación al estrés correlacionó con una sensibilidad aumentada al agonista serotorinérgico 5-metoxi-N,N-dimetiltriptamina. En cambio, las hembras, que no evidenciaron esta adaptación, no evidenciaron cambios en la sensibilidad a este agonista [283]. El estradiol parece tener un efecto de modulación sobre la actividad en el campo abierto. Ratas hembras ovariectomizadas, en ausencia de estradiol tuvieron una disminución en la exploración del area central comparada con aquellas que recibieron cápsulas de estradiol [286]. Entonces, es posible que los distintos perfiles comportamentales de las hembras sean un reflejo de los niveles de estradiol en sangre [285].

1.13.3 Dimorfismo en memorias con componentes aversivos

La respuesta comportamental y fisiológica a estímulos aversivos es muy diferente entre machos y hembras [287; 288; 289]. Esto se puede corroborar en las diferencias observadas frecuentemente en el desempeño en tareas que involucran un paradigma motivado desde la aversión.

Las hembras suelen mostrar un desempeño más pobre que aquel de los machos en aquellas tareas que involucran choque eléctrico en las patas, independientemente del tipo de paradigma elegido [290; 291; 292; 293]. Sin embargo, algunos autores reportaron que las hembras suelen superar a los machos en la adquisición de tareas de tipo aversivo [289; 294]. Asimismo, Warren y Juraska (1997) reportaron **un mejor desempeño de las hembras durante la fase de estro**, en

concordancia con los resultados reportados por Frye [251]. Se sabe que el **umbral al dolor cambia durante el ciclo estral**, y que durante proestro las hembras son más sensibles a un choque eléctrico [295] y muestran facilitación en la adquisición de una respuesta condicionada con respecto a los machos o hembras que se encuentran en otras etapas del ciclo estral [296].

1.13.4 Evitación inhibitoria

Se han reportado diferencias en el desempeño de evitación inhibitoria entre machos y hembras [297; 298; 299; 300] aunque la literatura al respecto es bastante contradictoria. Por ejemplo, Monleon et al. (2002) y Arenas et al (2006) observaron en ratones que el tratamiento farmacológico con antidepresivos tales como fluoxetina, amitriptilina y maprotilina en un paradigma de evitación inhibitoria produjo un mayor deterioro en el desempeño de los machos respecto a las hembras [298; 301]. En la rata se observó, [302] trabajando en un paradigma de evitación activa, que las hembras evidenciaron un mayor nivel de evitación que los machos. Sin embargo, Drago y col, (1980) y Van Oyen et al. (1979) reportaron también en ratas adultas, que las hembras mostraron un desempeño más pobre **en la evitación inhibitoria (ST-IA) [303; 304]**.

También se pueden observar diferencias entre hembras y machos en el aprendizaje de la evitación inhibitoria bajo el efecto de algunas drogas [298; 299; 301; 305].

- **Dimorfismo con escopolamina**

Ratas Wistar macho fueron menos precisas y respondieron menos frecuentemente que las hembras cuando se las trató con la misma dosis de escopolamina sistémica en la tarea de “*delayed nonmatching to position procedure*” [306]. Otros trabajos muestran diferencias de género en otras tareas en respuesta a la manipulación del sistema colinérgico [307; 308].

El hecho de reconocer que existen diferencias sustanciales entre distintos géneros en respuesta a drogas que afectan el sistema colinérgico tiene mucha relevancia. En particular, en aquellos estudios de efectos sutiles sobre el desempeño cognitivo de otras drogas colinérgicas mas selectivas y de efecto más débil que la escopolamina [309].

1.14 Efecto de la manipulación sistemática de los animales

La manipulación sistemática parecería ejercer efectos diferentes dependiendo de las condiciones ambientales en que son criados los animales, y de la cepa con la que se trabaja. Por ejemplo, se ha reportado que ratas de la misma cepa, pero CRIADAS DE MANERAS DIFERENTES, tienen una respuesta diferente al estrés [310], distinta tasa de actividad locomotora, y/o reacciones variables en el campo abierto [311] Podemos decir que ha habido abundante investigación sobre la manipulación neonatal que involucra la separación de la cría de su madre. Se han reportado efectos muy distintos de la manipulación neonatal sobre el desempeño de una tarea de aprendizaje. Kosten *et al* (2007) reportaron que la manipulación desde el día postnatal 1 al 21 (separando a las crías de la madre durante 15 min diarios), produjo un **deterioro** en el desempeño de la **ST-IA** (ratas

Sprague Dawley adultas entrenadas con 0,5 mA)[312]. Previamente Kosten *et al.* habían reportado que la manipulación en el período neonatal produjo **deterioro** del aprendizaje del **condicionamiento al miedo** en ratas adultas ([313; 314; 315]- estos dos últimos trabajos en ratas Wistar-). En cambio, la manipulación neonatal de ratas (Wistar y Sprague Dawley) habría **mejorado** el aprendizaje de **la evitación activa** [315; 316], mientras que en otro estudio en ratas se reportó que dicha manipulación produjo un **deterioro** sobre el mismo tipo de aprendizaje [317]. A su vez la manipulación neonatal **mejoró** el aprendizaje del **laberinto espacial** de Morris en ratas Sprague Dawley adultas y en ratas Wistar gerontes, que suelen evidenciar un desempeño pobre en esta tarea [318; 319].

Teniendo en cuenta los reportes variados y hasta contradictorios, en relación con la manipulación de las ratas por los humanos, y la escasa información cuando la manipulación sistemática se realizó a partir del destete, decidimos investigar su posible efecto en ratas adultas machos y hembras sobre el desempeño en evitación inhibitoria.

1.15 Influencia del ritmo circadiano

La capacidad de aprender y recordar tareas de comportamiento puede fluctuar según el momento del día [320; 321; 322]. En mamíferos se ha observado que el desempeño de distintas tareas de comportamiento se ve comprometido cuando se interrumpe el sueño [323; 324]. Se ha establecido que los genes responsables del manejo de las oscilaciones circadianas se expresan en muchas regiones cerebrales, incluyendo aquellas relacionadas con el aprendizaje y la memoria, como la amígdala [325], el hipocampo [134; 326; 327], y el área tegmental ventral [328; 329]. Las mutaciones que afectan genes del reloj circadiano alteran el desempeño en diversas tareas de aprendizaje [134; 330; 331; 332]. Inclusive, cuando se aísla el hipocampo, continua exhibiendo oscilaciones circadianas en cultivo, y por lo tanto, se puede considerar que posee un oscilador endógeno [134]. Pareciera que la regulación circadiana de las cascadas de señalización PKA/MAPK/AMPC del hipocampo, fuera necesaria para la formación de memorias [333].

1.15.1 Efecto del cambio de fase del ciclo luz/oscuridad (L/O)

En ratas la interferencia sobre los ritmos circadianos por corrimiento de fase “*phase-shifting*” deterioró distintas formas de memoria [334; 335; 336; 337]. En ratas, la exposición constante a la luz indujo amnesia retrógrada luego del condicionamiento en evitación inhibitoria [334], además de deteriorar el desempeño en una tarea de memoria espacial hipocampo dependiente como es el MWM [338].

En ratas macho, el cambio de fase del ritmo circadiano poco después del entrenamiento en ST-IA, deterioró el desempeño en el test. Hubo una drástica reducción en las latencias del test, evidenciando una retención muy pobre, comparada con grupos control que no sufrieron cambio de fase [334].

1.15.2 Sueño y consolidación

Durante el sueño se desarrollan etapas específicas que intervienen activamente en el desarrollo y el procesamiento de memorias [339; 340]. Ha habido reportes en rata, ratón, gatos y humanos acerca del efecto promotor del sueño sobre la consolidación de la memoria y la plasticidad sináptica [340; 341; 342]. La consolidación durante el sueño promueve cambios de las representaciones de memoria. Se ha propuesto que la fase de sueño SWS (del inglés *slow wave sleep*, sueño de ondas lentas) y la fase de sueño REM (del inglés *rapid eye movement*, movimiento rápido de ojos) favorecerían la consolidación sistémica y la consolidación sináptica, respectivamente [342]. Hace ya mucho tiempo que Jenkins y Dallenbach (1924) propusieron que el sueño nocturno mejora la capacidad de retener una memoria en humanos, con respecto a una noche de vigilia [343]. En distintos animales (rata, ratón, conejo, gato) se ha demostrado que la privación de sueño previa al entrenamiento, deterioró la codificación de la memoria de numerosas tareas [344; 345]. Por ejemplo, en la versión del MWM dependiente de hipocampo (con plataforma no visible), Guan et al. (2004) demostraron que 6 horas de privación de sueño previas al entrenamiento generaron un serio deterioro en la codificación la memoria (evaluada a las 24 h) [346]. La privación de sueño REM tuvo efecto perjudicial en la codificación de tareas dependientes de hipocampo (ver [344; 347]). Se ha reportado en ratas, que lapsos de 5 h de privación de sueño REM, previos al entrenamiento en el aprendizaje de evitación de dos vías, deterioró significativamente la codificación, produciendo déficits que no pudieron superarse con práctica adicional durante el entrenamiento [348].

1.15.3 Efecto del “momento del día”

En la literatura se ha reportado que distintos procesos de aprendizaje fueron afectados diferencialmente por el momento del día en que ocurren. Algunos trabajos han demostrado en ratas, que la adquisición de una tarea de evitación activa (*shuttle avoidance*) y del laberinto radial de 8 brazos, fue más eficiente durante el período de oscuridad [349; 350]. Por el contrario, otros trabajos han mostrado que la adquisición de la evitación activa por ratas, ocurrió más rápido durante momentos específicos en el día, comparados con otros momentos del día o de la noche [351; 352]. Hay un tercer grupo de trabajos en los cuales no se evidenciaron diferencias, durante el día o la noche, en la adquisición del *shuttle avoidance* por las ratas [353; 354; 355].

En un paradigma de condicionamiento del miedo (contextual y con claves) en ratones, se reportó que la adquisición fue más rápida si el condicionamiento ocurría durante el día, comparado con el grupo entrenado durante la noche [321]. Por otra parte, se observó que los animales entrenados durante la noche evidenciaron mayores niveles de extinción respecto de aquellos entrenados durante el día. Estos resultados sugieren que hubo un mejor aprendizaje de esta tarea durante el día, coincidiendo con el momento de menor actividad de los ratones. [321].

En el MWM las ratas tuvieron un mejor desempeño (con curvas de aprendizaje más pronunciadas) durante el test cuando este se realizó entre las 2 y 3 h luego del inicio de la fase de actividad de los

animales, respecto al desempeño cuando el test se realizó entre las 14 y 15 h luego del inicio de la fase de actividad. Los autores atribuyeron estos efectos sobre el desempeño, a variaciones en el patrón de búsqueda de la plataforma, mas que a una mejoría en la adquisición y conservación de la información espacial [356].

Se ha demostrado que la LTP sufre variaciones a lo largo del día. Barnes et al. (1977) demostraron que las respuestas sinápticas en las células granulares del hipocampo de ratas fluctúan con un período de 24 h, ante la estimulación de las fibras aferentes de la corteza entorrinal [357]. Además, reportaron que la mayor actividad sináptica se observó en la mitad de la fase oscura; mientras que la menor actividad se produjo en la mitad de la fase luminosa.

Harris y Teyler [358] registrando en rodajas de hipocampo obtenidas durante el día, observaron que la LTP postetánica en la región CA1, fue más robusta, que en las rodajas que se obtuvieron durante la noche, las que, por otra parte, evidenciaron una LTP postetánica más robusta en el giro dentado. Del mismo modo, se registró una mayor amplitud de la LTP en las neuronas piramidales de CA1 de las rodajas obtenidas durante el día, respecto a rodajas obtenidas durante la noche [359].

En la literatura la mayor parte de los estudios de comportamiento en roedores (principalmente rata/ratón) fueron realizados durante la fase luminosa del ciclo luz/oscuridad, siendo este momento del día el de menor actividad para animales de hábitos nocturnos (noche subjetiva). En función de lo reportado y de nuestra propia experiencia entrenando a los animales cuando están en su fase de vigilia, comenzamos a investigar las diferencias que podían aparecer en el comportamiento de animales criados con ciclo luz/oscuridad derecho (que se encuentran en su **fase de sueño** durante el entrenamiento) con respecto a aquellos criados con ciclo luz/oscuridad invertido (que se encuentran **en su fase de vigilia** durante el entrenamiento) en el desempeño en las tareas de evitación inhibitoria y campo abierto.

Objetivos PARTE I (Capítulo III de Resultados)

El trabajo que se presenta en esta Tesis tuvo como uno de sus objetivos generales analizar los efectos de diversos factores biológicos y condiciones experimentales sobre algunos aspectos de la biología de la memoria, utilizando como **modelo experimental la rata** y su **desempeño en la exploración de un campo abierto** y en **tareas de evitación inhibitoria**.

Nos propusimos estudiar los posibles efectos de la **intensidad del estímulo**, de la **previa manipulación sistemática**, la presencia o no de **dimorfismo sexual**, la influencia del **ciclo luz/oscuridad**, así como de una experiencia significativa previa diferente a la tarea a ser aprendida: la **exposición y habituación a otro ambiente**, sobre el desempeño en **evitación inhibitoria**.

En particular, nos propusimos:

- Evaluar el desempeño en **evitación inhibitoria**, tanto de ratas **macho** como de **hembras** que recibieron o no **previa manipulación (handling)** desde el destete, en función de **entrenamientos de diferente intensidad**.
- Evaluar el efecto de la **exposición a un ambiente diferente** sobre el desempeño de las ratas en **evitación inhibitoria**: analizar si la breve exposición a una sesión (experiencia novedosa) o a dos sesiones (habituaación) en un campo abierto, antes de entrenamiento (suave o fuerte) en evitación inhibitoria, tenía algún efecto observable sobre la memoria de corta (STM) y larga duración (LTM) de la evitación.

En nuestro laboratorio trabajamos con **ratas criadas con ciclo luz/oscuridad invertido**, que son **entrenadas en su fase de vigilia**, a diferencia de la mayoría de los trabajos reportados en la literatura en que se utilizan animales mantenidos en **ciclo luz/oscuridad derecho**, **entrenados en su fase de sueño**.

Entonces nos propusimos evaluar si esos animales se diferencian en el desempeño en el campo abierto, en la tarea de evitación inhibitoria y en su posible interacción.

Nuestros objetivos específicos fueron:

- **Comparar** el desempeño en un campo abierto –actividad locomotora y exploratoria, y habituación- y en evitación inhibitoria –adquisición y evocación de la memoria- de animales criados en **ciclo invertido** y en **ciclo derecho**, para investigar la posible influencia de las distintas fases de actividad sobre aprendizaje y memoria.
- Analizar el posible efecto de la **previa exposición al campo abierto –con o sin habituación-** sobre la memoria de **evitación inhibitoria**, tanto con entrenamiento suave como fuerte.

Con el objetivo de dilucidar si los hallazgos descriptos en evitación inhibitoria podían generalizarse para la evitación inhibitoria de un estímulo aversivo, se utilizó otra tarea similar, la **evitación inhibitoria por pasaje de compartimiento en un paso (step through)**.

Entonces, para comparar los efectos sobre ambas tareas, los objetivos específicos planteados fueron similares:

- Evaluar el desempeño en **evitación inhibitoria por pasaje de compartimiento en un paso de ratas macho y hembra con y sin manipulación sistemática** desde el destete, en función de **entrenamientos de distinta intensidad**.
- Evaluar el efecto de la **previa habituación al campo abierto** sobre **evitación inhibitoria por pasaje de compartimiento en un paso**, en ratas **macho y hembra**.

Objetivos PARTE II (Capítulo IV de Resultados)

Con el objetivo de comprender aspectos relevantes de la participación de la transmisión colinérgica y glutamatérgica centrales, en algunos procesos de aprendizaje y memoria, realizamos ensayos farmacológicos que nos permitieran analizar la **participación de receptores de glutamato NMDA**, y de **receptores de acetilcolina muscarínicos**, en los eventos que veníamos estudiando. Teniendo en cuenta los efectos que produjo la previa **exposición a un ambiente novedoso** o la **exploración de un ambiente familiar**, sobre un aprendizaje asociativo como la evitación inhibitoria (se reportan en el Capítulo III), nos propusimos investigar algunos aspectos de la posible participación de los sistemas de neurotransmisión mencionados.

Influencia o participación de receptores colinérgicos muscarínicos:

En nuestro laboratorio se exponía a las ratas a dos sesiones en un campo abierto, antes de los ensayos de farmacología de la memoria, y habíamos observado que el antagonista muscarínico escopolamina no producía amnesia de otras tareas en esos animales.

Entonces, para tratar de comprender la naturaleza de la **amnesia de la evitación inhibitoria** causada por **bloqueo -generalizado, o restringido al hipocampo dorsal- de la transmisión muscarínica**, en relación con la experiencia previa, nos propusimos como objetivos:

- Evaluar si la **previa exposición al campo abierto, con o sin habituación**, puede **prevenir** o contribuir a **superar el efecto amnésico** provocado por **bloqueo generalizado o restringido al hipocampo dorsal de receptores muscarínicos** (con el antagonista escopolamina), durante la adquisición y/o la consolidación.
- Evaluar si la amnesia por el bloqueo de receptores muscarínicos es similar en dos tareas de evitación inhibitoria con características diferentes.

Para ello nuestros objetivos específicos fueron:

- Discriminar entre el efecto de una exposición breve al campo abierto, involucrando el factor novedad y la doble exposición al campo abierto, que involucra habituación, teniendo en cuenta los resultados que se reportan en el Capítulo III de esta Tesis, y la propuesta participación del hipocampo en la detección de novedad.
- Investigar si la prevención/superación por exposición al campo abierto, de la amnesia de evitación inhibitoria por bloqueo de receptores muscarínicos, tiene un efecto diferencial sobre las memorias de corta (STM) y de larga duración (LTM).

- Comenzar a investigar si la **modulación del campo abierto sobre la amnesia por** bloqueo de receptores muscarínicos del hipocampo dorsal (durante la consolidación), podría requerir de **síntesis proteica** en esta estructura.

Influencia o participación de RNMDA:

Desde hace más de 20 años, el receptor NMDA (RNMDA) se considera involucrado en la consolidación memorias de larga duración de distintas tareas comportamentales, principalmente asociativas y con componentes espaciales, particularmente en la consolidación temprana de evitación inhibitoria.

Nos propusimos investigar si los receptores de glutamato NMDA participan en la modulación de la experiencia previa sobre la memoria de evitación.

Entonces nuestros objetivos específicos fueron:

- Estudiar el efecto del **bloqueo de los RNMDA del hipocampo dorsal** con distintas dosis del antagonista no competitivo MK-801, durante la **consolidación temprana de la memoria** de evitación inhibitoria, tanto en machos como en hembras.
- Evaluar si la **modulación por la experiencia previa** -exposición al campo abierto- permitía **superar la amnesia** de la evitación, causada por **bloqueo de los RNMDA del hipocampo dorsal** durante la consolidación.

En base a los resultados obtenidos, también nos propusimos comenzar a investigar si los receptores NMDA participan diferencialmente en la consolidación de la memoria de evitación inhibitoria.

Para ello, el objetivo específico fue:

- -Estudiar la **participación diferencial de subtipos de RNMDA del hipocampo dorsal** conteniendo la subunidad NR2B, en la **consolidación de la memoria**, en ambas versiones de la tarea de **evitación inhibitoria** en un paso (por descenso desde una plataforma elevada y por pasaje de compartimiento iluminado a oscuro)

Materiales y métodos

Materiales y Métodos

Animales experimentales

Se utilizaron ratas Wistar adultas, criadas en nuestro bioterio dentro de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires (Argentina).

Las camadas de animales se mantuvieron junto con su madre hasta el momento del destete (día postnatal 21). Desde entonces las crías se mantuvieron de a quince animales de igual sexo por jaula. Cuando las ratas llegaron a los dos meses de edad, se redujo a diez el total de animales por jaula. Los animales fueron criados con ciclo invertido de luz-oscuridad (las luces se encendieron a



Rata Wistar adulta

las 20 h, hasta las 08 h) a temperatura constante de $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$, con suministro de agua y alimento balanceado *ad libitum*. A los tres meses de edad, los animales, que en promedio pesan 200-250 g, fueron entrenados en las distintas tareas para los estudios de comportamiento.

Todos los protocolos experimentales utilizados se ajustan a las normas y cuidados indicados por *National Institutes of Health Guide of the Care and Use of Laboratory Animals* además de ser aprobados por el Comité de ética de la Universidad de Buenos Aires (CICUAL).

Experimentos con animales con ciclo luz/oscuridad derecho: se utilizaron ratas Wistar macho adultas (250-350 g), alojadas en jaulas en grupos de hasta cinco animales, de una colonia criada en el Departamento de Biofísica de la Universidad Federal de Rio Grande do Sul (UFRGS). Los animales fueron criados con ciclo derecho de luz-oscuridad (las luces se encendieron a las 07 h, hasta las 19 h) a temperatura constante de $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$ y se les suministró agua y alimento balanceado *ad libitum*. Las cirugías y los experimentos de comportamiento se realizaron en animales de 3 meses de edad. Todos los protocolos experimentales utilizados se ajustaron a las normas y cuidados indicados por *la International*



Rata Wistar adulta

Brain Research Organization (IBRO), y por el *National Institutes of Health Guide of the Care and Use of Laboratory Animals*.y cumplieron con el la *U.S. National Institutes of Health Guide of the Care and Use of Laboratory Animal* (publicación nro. 85-23, revisada en 1985) y la directiva del Comité de la comunidad europea (*European Communities Council*) del 24 de noviembre de 1986 (86/609/EEC).

Manipulación sistemática (*handling*)

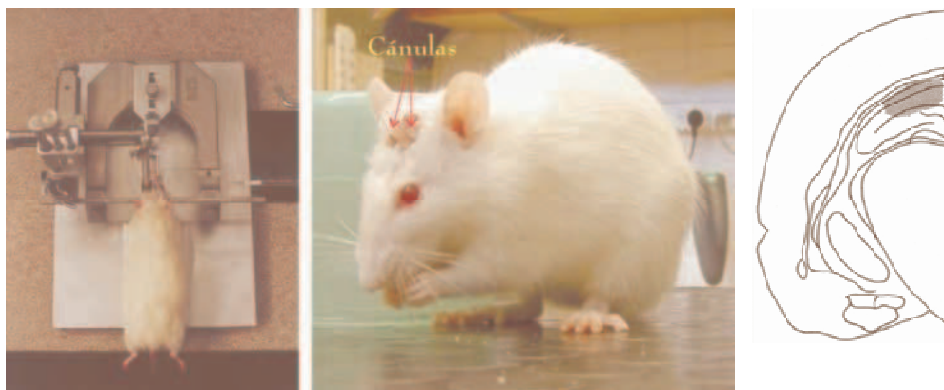


Ejemplo de manipulación sistemática (*handling*)

Luego del destete, las ratas fueron manipuladas 3 veces por semana, durante 1 minuto por vez, a excepción de los grupos no manipulados (“*No Handling*”), que no recibieron ese tipo de manipulación, pero sí la correspondiente a la limpieza y pesada de los animales. Se les cambió la “cama” de viruta tres veces por semana, se pesaron periódicamente cada dos semanas. La manipulación sistemática consistió en tomar a la rata, dejarla recorrer y explorar los brazos del /la investigador/a y sostenerla, simulando la manera en que se manipulará al realizarse el ensayo de comportamiento.

Cirugías.

Algunos grupos de animales destinados a ensayos de farmacología (que fueron luego inyectados en hipocampo dorsal) fueron sometidos a cirugía estereotáxica la semana previa al ensayo de



Estereotaxia. Rata implantada. Esquema de hemisección transversal: zona de inyección CA1 comportamiento. Las ratas fueron anestesiadas con 0,2 ml/kg i.m. de una solución 3:0,8 (75:10 mg/kg) Ketamina (50%, Ketonal®): Xilacina (2%, Rompun®). Se hizo una incisión longitudinal en la piel que recubre el dorso del cráneo, en la línea media interaural, se separó la piel y se divulcionó la fina musculatura, legrando levemente la superficie del cráneo. Luego se procedió a implantar bilateralmente, 2 mm por arriba del hipocampo dorsal, 2 cánulas guía (agujas calibre 21). La ubicación de las mismas se determinó según las coordenadas indicadas en el Atlas de Paxinos y Watson (1996) (AP: -4,3 mm; LL: ± 4 mm; DV: -1,2 mm) [54].

Las cánulas se obtuvieron a partir de agujas hipodérmicas calibre n° 21, de cono verde, de acero inoxidable que fueron cortadas y limadas de forma tal de alcanzar los 9 mm de longitud. Uno de los extremos presenta un bisel a 45°. Se utilizó cemento de odontología para fijar las cánulas y, a su vez, se fijó en el cráneo cerca de lambda un tornillo de 1 mm para una mejor sujeción del cemento al cráneo. Una vez implantadas las cánulas se les colocó un tapón de acero inoxidable, para evitar la obstrucción de las mismas hasta el momento de la inyección de los agentes farmacológicos. Al

finalizar la cirugía se suministró una dosis de 5 mg/kg de enrofloxacin intramuscular al 5%. Se esperó al menos 4 días luego de la cirugía, para la recuperación de los animales, antes de realizar los ensayos comportamentales.

Infusión de drogas.

Tanto el antagonista no selectivo del RNMDA MK-801 como el antagonista muscarínico escopolamina fueron disueltos en solución fisiológica estéril. El antagonista selectivo de la subunidad NR2B del RNMDA, ifenprodil se disolvió inicialmente con DMSO para lograr su disolución y luego se llevó a volumen con solución fisiológica estéril. La anisomicina se disolvió en HCl, diluida en salina, y llevada a pH 7,4 con NaOH [360]. Todas las drogas utilizadas se adquirieron en Sigma (St. Louis, MO).

MK-801, ifenprodil y escopolamina se infundieron a través de las cánulas en el hipocampo dorsal, inmediatamente después del entrenamiento en evitación inhibitoria. En cambio, la anisomicina o bien su vehículo fueron inyectados 1 h 25 min antes del entrenamiento en SD-IA (5 min luego de la segunda sesión de campo abierto).

MK-801, se infundió en dosis de 0.5, 2.0 y 6.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ en un volumen total de 1 μl por cánula. La escopolamina, se infundió en dosis de 8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ en un volumen total de 1 μl por cánula. Los animales control fueron sometidos a las mismas condiciones que



Inyección a través de las cánulas



Aguja carpule conectada mediante tubuladura a microjeringa *Hamilton*

los animales tratados, pero no se les inyectó droga, sino el mismo volumen de solución fisiológica.

Ifenprodil se infundió en dosis de 0.1; 1.0 y 6.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ en un volumen total de 1 μl por cánula. Los animales control fueron sometidos a las mismas condiciones que los animales tratados, pero no se les inyectó droga, sino una cantidad equivalente de DMSO en solución fisiológica.

La anisomicina se infundió en dosis de 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ en un volumen total de 0.8 μl por cánula. Los animales control fueron sometidos a las mismas condiciones que los animales tratados, pero no se les inyectó droga, sino el vehículo de HCl en solución fisiológica ajustado a pH 7. 4 con NaOH.

Las ratas tratadas fueron inyectadas a través de las cánulas. Se utilizó una aguja carpule de calibre 27, con tope en 11 mm, de forma tal que la punta de la aguja sobresaliera 2 mm por debajo de la cánula guía. La aguja se conectó, utilizando una tubuladura de silicona, a una microjeringa *Hamilton*. Antes de la infusión se retiró el tapón de acero inoxidable de las cánulas. Las infusiones

se realizaron lentamente, a una velocidad de 1 μ l/minuto; una vez finalizada la infusión, la aguja se dejó dentro de la cánula por 30 segundos adicionales para disminuir el posible reflujo. Antes de realizar una nueva infusión con la misma aguja, se corroboró que estuviera permeable, descartando 0.5 μ l de droga o vehículo.

Una vez finalizado el protocolo del ensayo de comportamiento correspondiente, los animales fueron sacrificados por decapitación, se les extrajeron los cerebros, se los fijó en una solución de formol al 5% en buffer fosfato, y se corroboró la correcta ubicación de las cánulas guía observando el sitio de la lesión. Se descartaron aquellos animales en donde la lesión no se correspondiera con el hipocampo dorsal. Solamente se incluyeron en el análisis estadístico aquellos animales que presentaron una correcta ubicación de las cánulas.

Inyecciones via intraperitoneal:

Los animales fueron inyectados vía intraperitoneal con escopolamina disuelta en solución fisiológica estéril (1 mg/kg), en un volumen total de 0.5 ml, 20 a 30 min antes del entrenamiento en evitación inhibitoria. Los controles fueron sometidos a las mismas condiciones que los animales tratados, pero se les inyectó la solución fisiológica estéril.

Equipamiento y procedimientos para las tareas comportamentales.



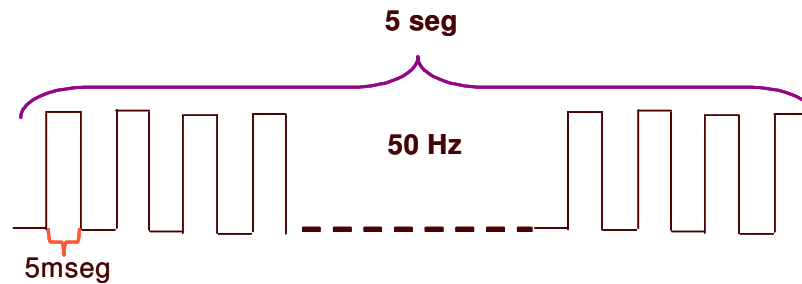
Campo abierto

Caja para el campo abierto: Se utilizó una caja de madera de 0,6 x 0,60 m, con 25 cuadrantes (de 0,12 x 0,12 m cada uno) trazados en el piso vinílico color gris. Las paredes de madera están pintadas de gris y su altura es de 50 cm.

Caja para evitación inhibitoria: Se realizaron dos tipos diferentes de pruebas: prueba de descenso en un paso (*Step-Down, IA-SD*) y prueba de pasaje de compartimiento en un paso (*Step-Through, IA-ST*).

Para IA-SD se utilizó una caja de acrílico transparente de 40 cm de altura x 30 cm de ancho x 60 cm de largo. En uno de los extremos se sitúa una plataforma de acrílico blanco (2.5 cm de alto x 8.0 cm de ancho x 30.0 cm de largo). El piso de la caja es una grilla electrificable, de barras de bronce de 5 mm de diámetro espaciadas entre sí 7 mm. La grilla constituye un circuito conectado a un estimulador (construido en la facultad de Ingeniería de la Universidad Tecnológica Nacional, Buenos Aires) que permite establecer la intensidad, frecuencia y duración del pulso y la duración

total del estímulo aplicado. Además, presenta un dispositivo con una luz como señal (*led*) que se enciende cuando el circuito se encuentra cerrado, lo que permite por un lado confirmar que el animal esté recibiendo el estímulo eléctrico en el momento indicado, y por otro también detectar si la grilla se encuentra interferida por algún bolo fecal u otro objeto que haya quedado retenido entre las barras de la grilla, impidiendo su correcto funcionamiento. Se aplicaron intensidades de estímulo de 0,40; 0,50; 0,60; 0,75 ó 1,00 mA. En todos los casos la frecuencia fue de 50 Hz, la duración de cada pulso individual de 5 mseg y una duración total del estímulo de 5 seg (ver esquema abajo).



Esquema de estímulo aplicado en evitación inhibitoria

Para IA-ST se utilizó la misma caja de acrílico que para SD, aunque dentro de la misma se retiró la plataforma y se colocó otra caja acrílica de paredes revestidas por acrílico blanco en la cara externa, y de acrílico negro en su cara interna. La misma tiene una dimensión de 0,29 m de ancho x 0,29 m de largo x 0,40 m de alto. Por arriba presenta una tapa de acrílico negro, sujeta por dos



Prueba de Evitación Inhibitoria: Descenso de una plataforma aislada (SD-IA)



Prueba de Evitación Inhibitoria: pasaje de compartimiento en un paso (ST-IA)

bisagras a la caja. De esta manera la caja acrílica transparente se subdivide en dos compartimientos: uno que será iluminado con luz blanca (por una lámpara de 75 W) y otro oscuro. Al compartimiento iluminado se le colocan 3 paredes de acrílico que achican el espacio que da acceso al compartimiento oscuro. La caja blanca y negra tiene una puerta guillotina (de acrílico blanco en la cara externa y negro en la cara interna), que conecta ambos compartimientos. El piso es la misma grilla electrificable descrita para el procedimiento IA-SD, pero en este caso se desconecta del estimulador la parte de la grilla que queda ubicada en el compartimiento iluminado.

Tareas comportamentales: bases conceptuales, fundamentos, descripción detallada.

Evitación inhibitoria de descenso, en un paso (*Step Down, SD*): Prueba espacial y aversiva. El



Rata sobre la plataforma

animal debe inhibir su tendencia espontánea a explorar, aprendiendo a permanecer sobre una plataforma aislada para evitar un choque eléctrico en las patas que recibiría al descender a la grilla. En la sesión de entrenamiento se coloca al animal sobre la plataforma y orientado hacia un rincón, y se registra el tiempo que



Rata sobre la plataforma

demora en descender de la misma (latencia). Cuando la rata coloca sus cuatro patas sobre la grilla, recibe un estímulo eléctrico. La sesión de test se realiza a las 24 hs y se repite el mismo procedimiento que en el entrenamiento, pero no se aplica estímulo eléctrico. Sólo en el experimento en el que se quiso evaluar memoria de corto plazo, la sesión de test se realizó 40 min después del entrenamiento. Aquellos animales que presentaron latencias de entrenamiento mayores a 20 seg no fueron considerados para el análisis estadístico. Se estableció un techo temporal de 120 seg para la sesión de test. La latencia del test representa la capacidad de evocación. Se consideró que los animales alcanzaron el criterio de aprendizaje cuando hubo diferencia estadísticamente significativa entre la sesión de entrenamiento y la de test. Para comparar distintos grupos entre sí, se calcularon las diferencias de latencias: latencia test - latencia entrenamiento, que fueron entonces los parámetros considerados. Sólo se compararon aquellos grupos que evidenciaron un desempeño en el entrenamiento similar, es decir, que no hubo diferencias significativas en las latencias de los distintos grupos en esta sesión.

Evitación inhibitoria de pasaje de compartimiento, en un paso (*Step Through, ST*): Prueba con componentes espaciales y aversivos. El animal debe inhibir su tendencia espontánea a explorar, aprendiendo a elegir permanecer en un compartimiento iluminado en vez de uno oscuro, de su preferencia, para evitar un choque eléctrico en las patas, que recibe al ingresar al compartimiento oscuro. Se coloca la rata en una esquina del compartimiento iluminado y se la deja durante 15 seg antes de abrir la puerta guillotina que da acceso al compartimiento oscuro. Una vez abierta la puerta se comienza a registrar el tiempo que demora el animal en ingresar con sus cuatro patas al compartimiento oscuro (latencia de entrenamiento). En ese momento se cierra la puerta y se aplica un estímulo eléctrico en las patas. Luego se retira a la rata de la caja y se la devuelve a su jaula. A las 24 h se realiza el test, repitiendo el mismo procedimiento que en el entrenamiento, pero en este caso la rata no recibe estímulo eléctrico; se registra la latencia del test, es decir el tiempo que

demoró en pasar al compartimiento oscuro. La latencia del test representa la capacidad de evocación. Aquellas ratas que obtuvieron latencias mayores a 40 seg durante el entrenamiento fueron descartadas para el análisis estadístico. Se estableció un techo temporal de 300 seg para la sesión de test. Se consideró que los animales alcanzaron el criterio de aprendizaje cuando hubo diferencias estadísticamente significativas entre la sesión de entrenamiento y la de test. Para comparar distintos grupos, también se calcularon las diferencias de latencias: latencia test - latencia entrenamiento.

Antes de comenzar cada entrenamiento en evitación inhibitoria se procede a pulir la grilla, con el objetivo de limpiar bien las varillas de posible sarro o suciedad remanente que pueda llegar a interferir en la calidad del estímulo eléctrico que reciben los animales. Entre cada entrenamiento se higieniza con un paño absorbente descartable humedecido con una solución de alcohol al 70%.

Para los ensayos farmacológicos relacionados con la consolidación, los animales fueron inyectados a través de las cánulas inmediatamente después del entrenamiento.

Exploración en Campo Abierto:

Prueba de actividad locomotora y exploratoria. Discriminación de un ambiente nuevo, habituación. Se trata de habituar al animal, intentando disminuir el efecto estresante del nuevo ambiente y la situación desconocida. Se coloca al animal en una de las esquinas y se lo deja explorar durante 3 min. Se registran: a) cruces: cuando atraviesa con las cuatro patas alguna de las líneas divisorias en el piso de la arena; b) elevaciones sobre los miembros posteriores (*rearings*): cuando la rata se levanta sobre los miembros posteriores; c) acicalamientos (*groomings*): se frota su cabeza con los miembros anteriores.

Mediante este paradigma puede evaluarse habituación a un ambiente novedoso si los animales son ubicados en la caja una segunda vez, comparando los registros con la primera sesión de exposición a la misma.



Elevaciones sobre los miembros posteriores



Acicalamientos



Cruces

Diseño experimental:

En todos los casos los animales se repartieron aleatoriamente para formar los distintos grupos analizados

Experimentos de evaluación del efecto de la exposición al campo abierto sobre el desempeño en evitación inhibitoria.

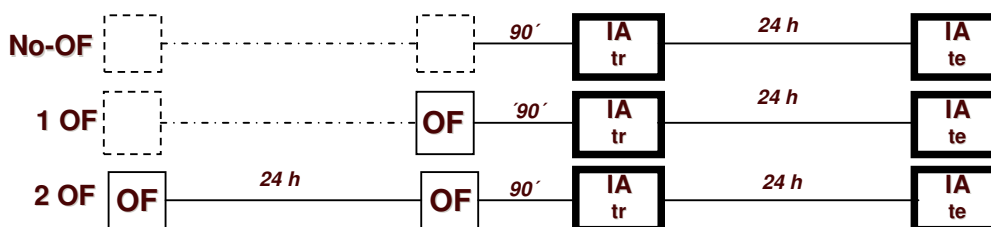
Se comparó el desempeño en evitación inhibitoria de distintos grupos de animales:

Grupos 1 OF: animales que pasaron por una sesión de campo abierto realizada 1 h 30 min antes del entrenamiento en evitación inhibitoria. La duración de esta sesión fue de 3 min, excepto en el caso de la fig 3.4 en que se compara con una sesión de 5 min con una de 3 min.

Grupos 2 OF: animales que pasaron por dos sesiones de campo abierto de 3 min cada una, realizadas 24 h y 1 h 30 min antes del entrenamiento en evitación inhibitoria (separadas entre sí por 24 h).

Grupos No-OF: animales que fueron entrenados en evitación inhibitoria sin haber sido expuestos al campo abierto.

El test de SD-IA se realizó a las 24 h luego del entrenamiento, a excepción de los experimentos en que se evalúa memoria de corto término en los que el test se realizó a los 40 min.



Representación esquemática de los distintos grupos del diseño experimental para evaluar el efecto de la previa exposición al campo abierto.

Análisis de datos.

Para la tarea de evitación inhibitoria durante las sesiones de prueba se establecieron máximos de 120 seg para las latencias de descenso de la plataforma (IA-SD), y de 300 seg para las latencias de pasaje de compartimiento (IA-ST). Debido a esto, en general los datos no presentan una distribución normal (según el test de *Wilk-Shapiro* modificado según Mahibbur y Govindarajulu, 1997 [361]), debido a esto se utilizaron pruebas de estadística no paramétrica (que utilizan mediana con intervalos intercuartiles). Para las comparaciones entre los grupos, se usó el análisis de varianza de Kruskal-Wallis para comparar varios grupos o la prueba de Mann-Whitney de dos colas, para comparaciones de muestras no apareadas. Además se utilizó el test de Wilcoxon para comparaciones de muestras apareadas. Se consideró que las diferencias eran estadísticamente significativas cuando la probabilidad $p < 0.05$. Para el ensayo de campo abierto se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) de una vía, cuando se trataba de analizar 3 o más grupos, o el test t de *Student* para muestras independientes, cuando la prueba contó con sólo 2 grupos.

Para evaluar si hubo correlación entre la intensidad de choque utilizada y el desempeño en la evitación inhibitoria, se realizó la prueba de correlación no paramétrica de Spearman.

A los fines de mostrar los datos de una manera mas “familiar” debajo a la derecha de cada representación con estadística no paramétrica se incluyó el gráfico de los datos expresado con estadística paramétrica; independientemente de que en muchos casos los datos se ajustaban a una distribución normal. También se mostraron los valores individuales de las latencias por medio de la representación de *scatter dot plot*.

En todos los casos se consideró que las diferencias eran estadísticamente significativas cuando la probabilidad $p < 0.05$. Para los análisis se utilizó el *software* GraphPad Prism 5.0 para Windows ® (GraphPad, CA, <http://www.graphpad.com/prism/prism.htm>).

Resultados

CAPÍTULO III

PARTE I

III. 1. RELEVANCIA DE CIERTAS CONDICIONES BIOLÓGICAS Y EXPERIMENTALES EN LA PRUEBA DE EVITACIÓN INHIBITORIA

La prueba de evitación inhibitoria en un paso (SD-IA) (evitando el descenso desde una plataforma aislada) es un aprendizaje asociativo con componentes espaciales y aversivos. En esta tarea el animal debe contrariar su tendencia espontánea a explorar, aprendiendo a permanecer sobre la plataforma para evitar un choque eléctrico en las patas que recibiría al descender a la grilla. La sesión de entrenamiento corresponde a la fase de adquisición. Durante la sesión se registra el tiempo que demora el animal en descender de la plataforma (latencia). En cuanto la rata coloca sus cuatro patas sobre la grilla, recibe un estímulo eléctrico. En el desarrollo de este trabajo de tesis, en la sesión de test se repite el mismo procedimiento que en el entrenamiento, pero no se aplica estímulo eléctrico. Durante esta sesión se evalúa la expresión de la memoria de lo aprendido, es decir, se evalúa la retención y la capacidad de evocación. Se considera que los animales recuerdan, es decir que alcanzaron el criterio de aprendizaje y formaron una memoria, cuando las latencias en la sesión de prueba resultan significativamente mayores que las latencias en la sesión de entrenamiento.

Se consideraron los posibles efectos de la intensidad del estímulo, de la previa manipulación sistemática y las posibles variaciones por sexo, así como de la exposición a otro ambiente, sobre el desempeño en SD-IA, teniendo en cuenta la trascendencia de las investigaciones sobre memoria y aprendizaje reportadas utilizando esta y otras tareas similares, y la variada información al respecto.

Efecto de la intensidad del estímulo sobre la memoria de la prueba de SD-IA

Se evaluó el desempeño en evitación inhibitoria, en la versión de descenso de la plataforma (*step down*) (SD-IA), tanto para ratas machos como para hembras, que recibieron previa manipulación (*handling*) tres veces por semana desde el destete, que fueron entrenadas con diferentes intensidades de choque. El test se realizó 24 h más tarde (sin aplicación de choque eléctrico) (figura 3.1 para las hembras y fig 3.2 para los machos).

Las figuras 3.1 y 3.2 corresponden a diagramas de barras, en los que se representan las medianas y los desvíos intercuartiles de las latencias de descenso de la plataforma durante el entrenamiento (a la izquierda) y durante el test (a la derecha). En la figura 3.1 A se muestran los resultados obtenidos para ratas hembra, para las distintas intensidades de choque ensayadas, desde 0,4 hasta 1 mA. La figura 3.2 también muestra los valores obtenidos para ratas macho, para las distintas intensidades de choque ensayadas, desde 0,4 hasta 1 mA. No hubo diferencias significativas en las latencias de

entrenamiento comparando todos los grupos de animales ($p > 0,05$; por prueba de Kruskal Wallis, ANOVA de una vía; N para grupos de hembras = 12, 19, 10 y 14 para los grupos que fueron entrenados con choques de 0,4, 0,5, 0,6 y 1 mA, respectivamente N para grupos de machos = 12, 12, 11, 12 y 15; respectivamente, para 0,4, 0,5, 0,6, 0,75 y 1 mA). Es decir que todos los grupos de machos y hembras tuvieron un desempeño similar durante la sesión de entrenamiento.

Las hembras (fig 3.1) evidenciaron haber alcanzado el criterio de aprendizaje para todas las intensidades de choque ensayadas; es decir que las latencias del test fueron significativamente mayores que las del entrenamiento ($p < 0,01$ para choques de 0,4; 0,5 y 0,6 mA; $p < 0,001$ para choque de 1 mA; por prueba para muestras apareadas de Wilcoxon). La comparación estadística de las diferencias de latencias (test-entrenamiento) (fig 3.1 B) entre todos los grupos arrojó diferencias significativas ($p < 0,01$; por prueba de Kruskal Wallis) evidenciándose posteriormente por prueba de Mann Whitney que los grupos entrenados con intensidad de choque de 0,4 y 0,5 mA tuvieron un desempeño similar. El grupo entrenado con 1 mA evidenció un mejor desempeño comparado con aquellos animales entrenados con intensidades de choque de 0,4 y 0,5 mA ($p < 0,01$ para 0,4 mA vs. 1 mA y para 0,5 mA vs. 1 mA; por prueba para muestras no apareadas de Mann Whitney). También el grupo entrenado con 0,6 mA se desempeñó significativamente mejor respecto a los grupos entrenados con 0,4 mA y 0,5 mA ($p < 0,05$; por prueba para muestras no apareadas de Mann Whitney).

El gráfico de scatter (en fig. 3.1) muestra que, a partir de intensidades de choque de 0,6 mA, algunos animales alcanzaron la latencia máxima de 120 seg durante el test. Las hembras evidenciaron coherencia entre el aumento de las latencias en el test y el aumento de la intensidad de choque, sin embargo no hubo correlación significativa, si bien el análisis estadístico arrojó un valor de p cercano al límite de significación ($p = 0,083$, y coeficiente de Spearman $r = 0,90$, correlación no paramétrica entre diferencias de latencia y la intensidad de choque). Las hembras alcanzaron el criterio de aprendizaje cuando se entrenaron con un choque de 0,4 mA.

Los machos (fig 3.2), entrenados con intensidades de choque mayores o iguales a 0,5 mA evidenciaron haber alcanzado el criterio de aprendizaje, habiendo formado una memoria de la tarea; es decir que hubo diferencias significativas entre las latencias del test y las del entrenamiento, siendo significativamente mayores las latencias del test ($p < 0,01$ para choques de 0,5, 0,6 y 0,75 mA; $p < 0,001$ para choque de 1 mA; por prueba para muestras apareadas de Wilcoxon). Por eso consideramos que, en nuestras condiciones experimentales, el choque de 0,5 mA constituye el umbral para el aprendizaje de la tarea y, posiblemente, para el registro de la traza, al menos para ratas macho adultas.

La comparación de las diferencias de latencias (test-entrenamiento) (fig 3.2 B) evidenció un desempeño más pobre del grupo entrenado con 0,4 mA con respecto a los animales entrenados con intensidad de choque de 0,75 y 1 mA, y un mejor desempeño del grupo entrenado con 1 mA respecto del grupo entrenado con 0,5 mA ($p < 0,001$ entre todos los grupos, por prueba de Kruskal

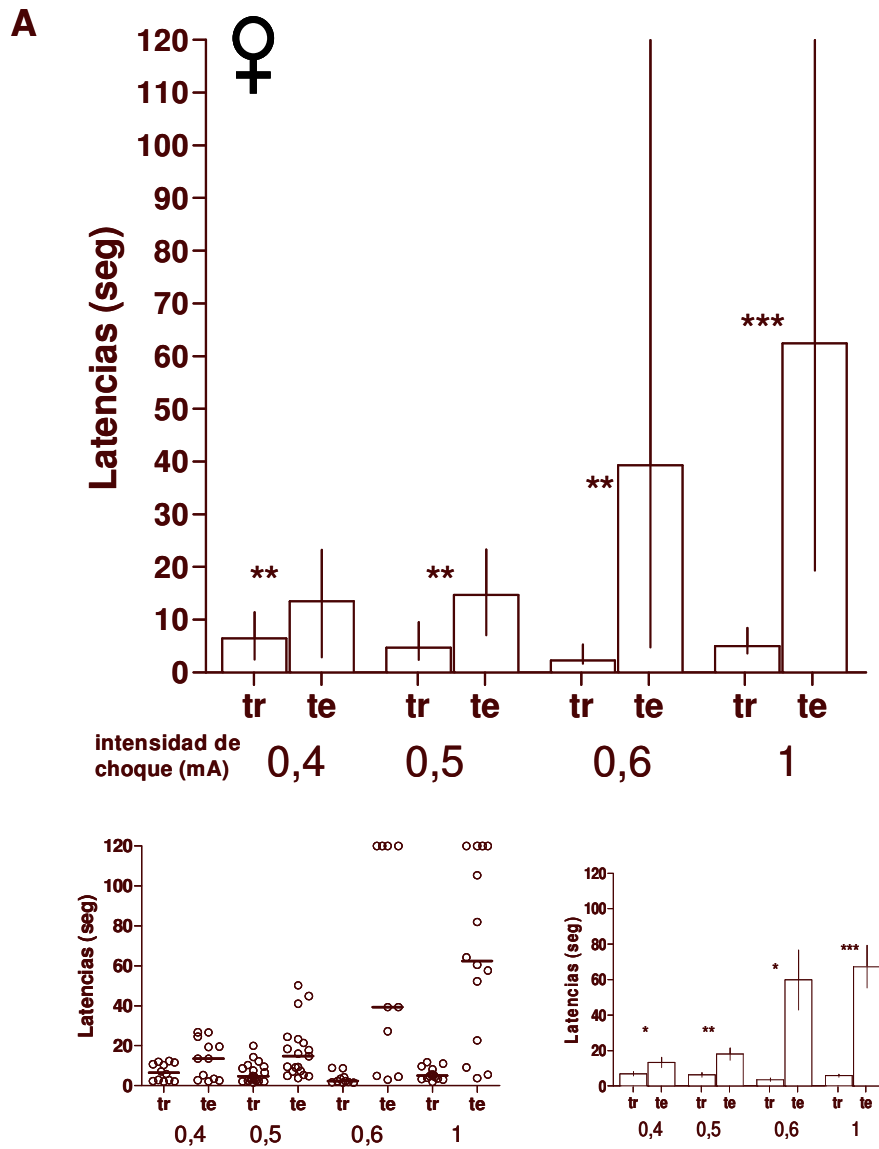


Fig 3.1: Efecto de la intensidad del estímulo sobre el aprendizaje y la memoria de la prueba de SD-IA: grupos de hembras.

A: Gráfico de barras que representa las medianas de las latencias de descenso de la plataforma, con sus rangos intercuartiles (25; 75), de ratas hembra entrenadas con distintas intensidades de choque (0,4; 0,5; 0,6; y 1 mA; N= 12, 19, 10 y 14 respectivamente).

tr: latencia de entrenamiento; **te:** latencia de test.

Paneles inferiores: gráfico de *scatter* (izquierda); y representación paramétrica de los datos (media y error estándar, derecha).

* Diferencias significativas entre entrenamiento y test; prueba para datos apareados de Wilcoxon (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

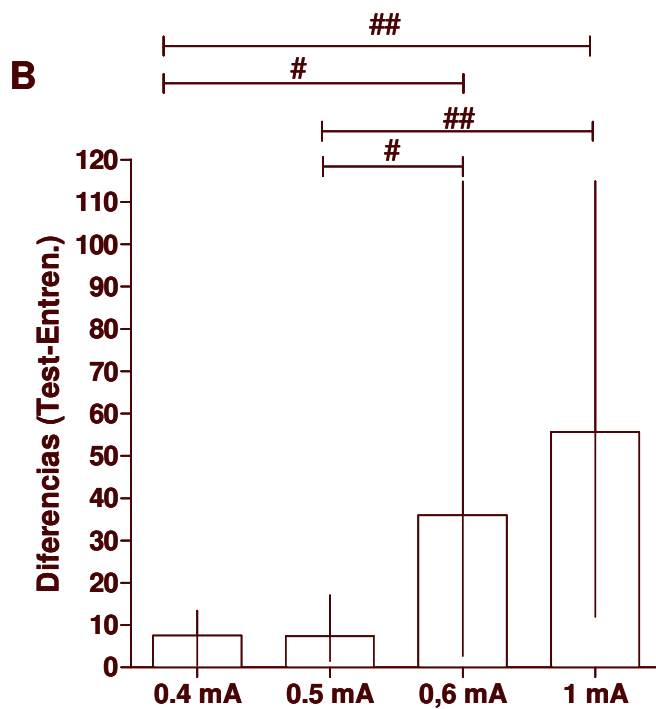


Fig 3.1: Efecto de la intensidad del estímulo sobre el aprendizaje y la memoria de la prueba de SD-IA: grupos de hembras.

B: Las barras representan las diferencias de latencias (test-entrenamiento) con sus rangos intercuartiles (25; 75) de los grupos de la parte A de esta figura.

Diferencias significativas de las diferencias de latencias entre distintas intensidades de choque por prueba para datos no apareados de Mann Whitney (# $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$)

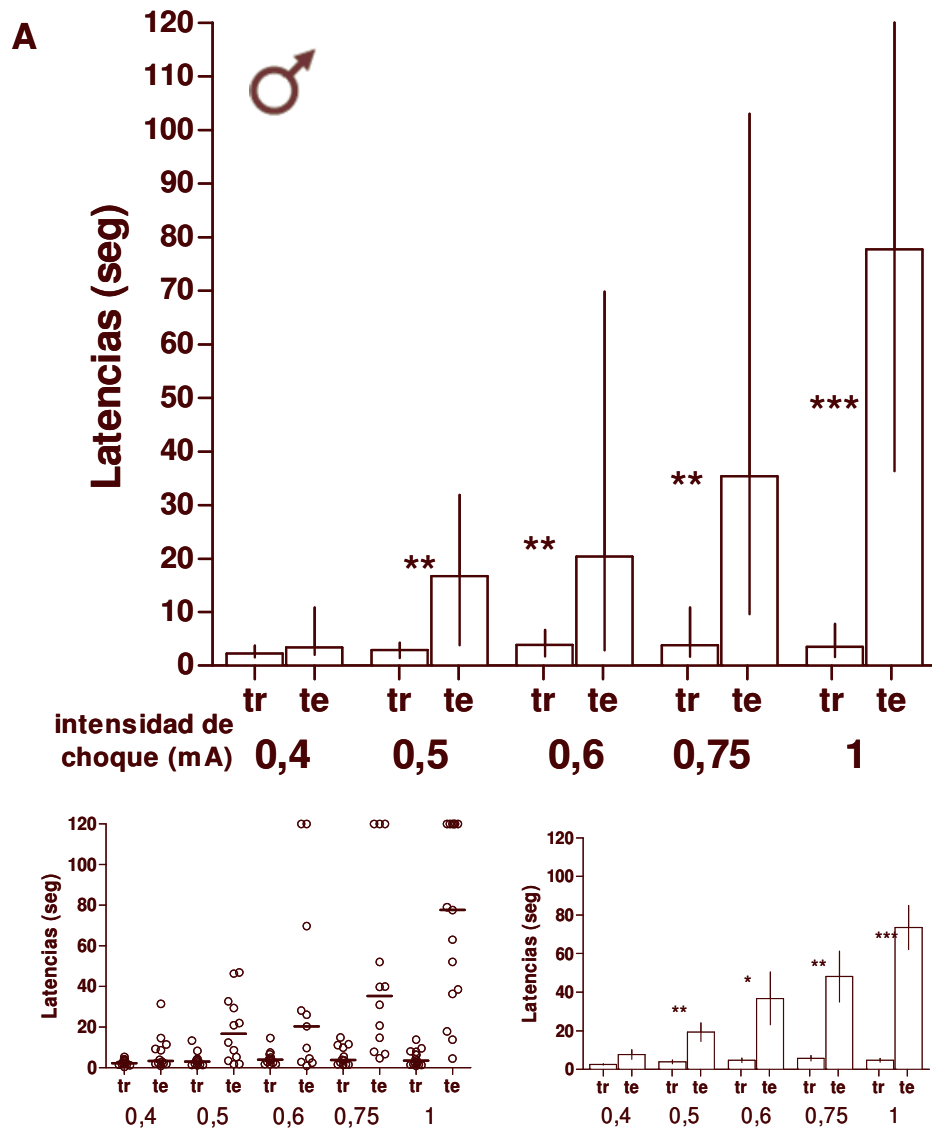


Fig 3.2: Efecto de la intensidad del estímulo sobre el aprendizaje y la memoria de la prueba de SD-IA: grupos de machos.

A: Gráfico de barras que representa las medianas de las latencias de descenso de la plataforma con sus rangos intercuartiles (25; 75), de ratas macho entrenadas con distintas intensidades de choque (0,4; 0,5; 0,6; 0,75 y 1 mA; N= 12, 12, 11, 12 y 15 respectivamente).

tr: latencia de entrenamiento; **te:** latencia de test.

Paneles inferiores: gráfico de *scatter* (izquierda); y representación paramétrica de los datos (media y error estándar, derecha).

•Diferencias significativas entre entrenamiento y test; prueba para datos apareados de Wilcoxon (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

B

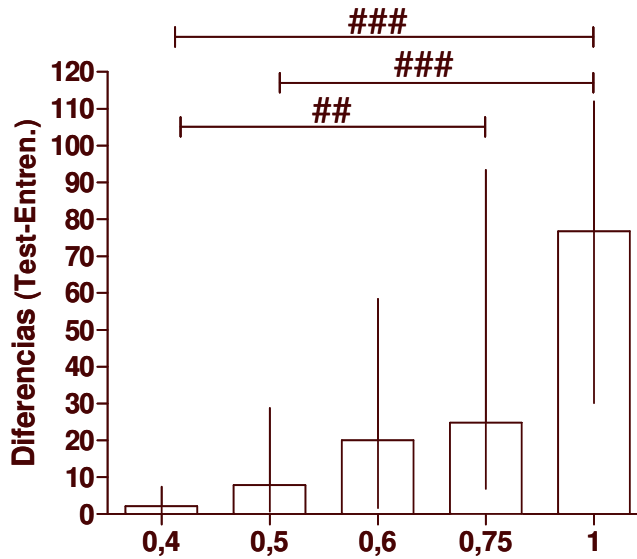


Fig 3.2: Efecto de la intensidad del estímulo sobre el aprendizaje y la memoria de la prueba de SD-IA: grupos de machos.

B: Las barras representan las diferencias de latencias (test-entrenamiento) con sus rangos intercuartiles (25; 75) de los grupos de la parte A de esta figura.

Diferencias significativas de las diferencias de latencias entre distintas intensidades de choque por prueba para datos no apareados de Mann Whitney (## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$).

Wallis seguido por prueba para muestras no apareadas de Mann Whitney, $p < 0,01$ para 0,75 mA respecto de 0,4 mA; $p < 0,001$ para 1,0 mA respecto de 0,4 mA, y para 1,0 mA respecto de 0,5 mA). Sin embargo, es evidente que dentro de cada grupo, no todos los animales evidenciaron haber aprendido para cada una de las intensidades de choque utilizadas. Por eso, una de las representaciones elegidas que permite poner en evidencia los datos individuales, es decir cuántos animales aprendieron y cómo –cuánto tiempo permanecieron sobre la plataforma–, es el gráfico de *scatter* (*scatter plot*).

El gráfico de *scatter* de los grupos de machos (fig. 3.2) evidencia que, recién con intensidades de choque de 0,6 mA o mayores, algunos animales alcanzan las latencias máximas de 120 seg durante la sesión de test.

De manera semejante a lo que se observó en las hembras, los machos evidenciaron coherencia entre el aumento de las latencias en el test y el aumento de la intensidad de choque, pero en este caso la correlación fue significativa ($p < 0,05$ y coeficiente de Spearman $r = 1$, correlación no paramétrica entre diferencias de latencia y la intensidad de choque). Por otro lado, los machos no alcanzaron el criterio de aprendizaje cuando se entrenaron con un choque de 0,4 mA, mientras que las hembras si lo hicieron.

Cuando se compararon las diferencias de latencias (test-entrenamiento) entre los grupos de machos y hembras entrenados con igual intensidad de choque, no se encontraron diferencias significativas para ninguno de los choques ($p > 0,05$, por prueba para muestras no apareadas de Mann Whitney). Por lo tanto, se puede concluir que los machos y las hembras manipulados tres veces por semana desde el destete, que fueron entrenados con igual intensidad de choque, mostraron un desempeño similar en esta tarea.

Efecto de la manipulación de los animales sobre el desempeño en la prueba de SD-IA

Evaluamos el desempeño de machos que no recibieron manipulación sistemática tres veces por semana (*handling*), excepto por una manipulación de rutina que se realiza también periódicamente al cambiar la viruta de la jaula, durante la limpieza, y cuando se los pesa (ver Cap. II Materiales y métodos, página 54). Los animales también fueron entrenados con distintas intensidades de choque. La sesión de test se realizó a las 24 h, sin aplicación de choque eléctrico, como se hace habitualmente. Cuatro grupos de machos, que no recibieron manipulación previa, fueron entrenados con distintas intensidades de choque (0,5, 0,6, 0,75 y 1 mA).

La figura 3.3 muestra un gráfico de barras cuya altura representa la mediana de las latencias de descenso de la plataforma, durante el entrenamiento a la izquierda y durante el test a la derecha. No hubo diferencias significativas en las latencias de entrenamiento entre los distintos grupos en que se repartieron arbitrariamente los animales ($p > 0,05$; por prueba de Kruskal Wallis, ANOVA de una vía). Las latencias de test fueron significativamente mayores que las del entrenamiento para todos los grupos de machos analizados ($p < 0,05$ para los grupos entrenados con 0,5 mA y 0,6 mA; [N=15 y 10 respectivamente]; $p < 0,001$ para el grupo entrenado con 0,75 mA; [N=12] y con 1 mA, [N=11]; por prueba para muestras apareadas de Wilcoxon). Es decir que todos los grupos de animales alcanzaron el criterio de aprendizaje de la tarea y formaron una LTM.

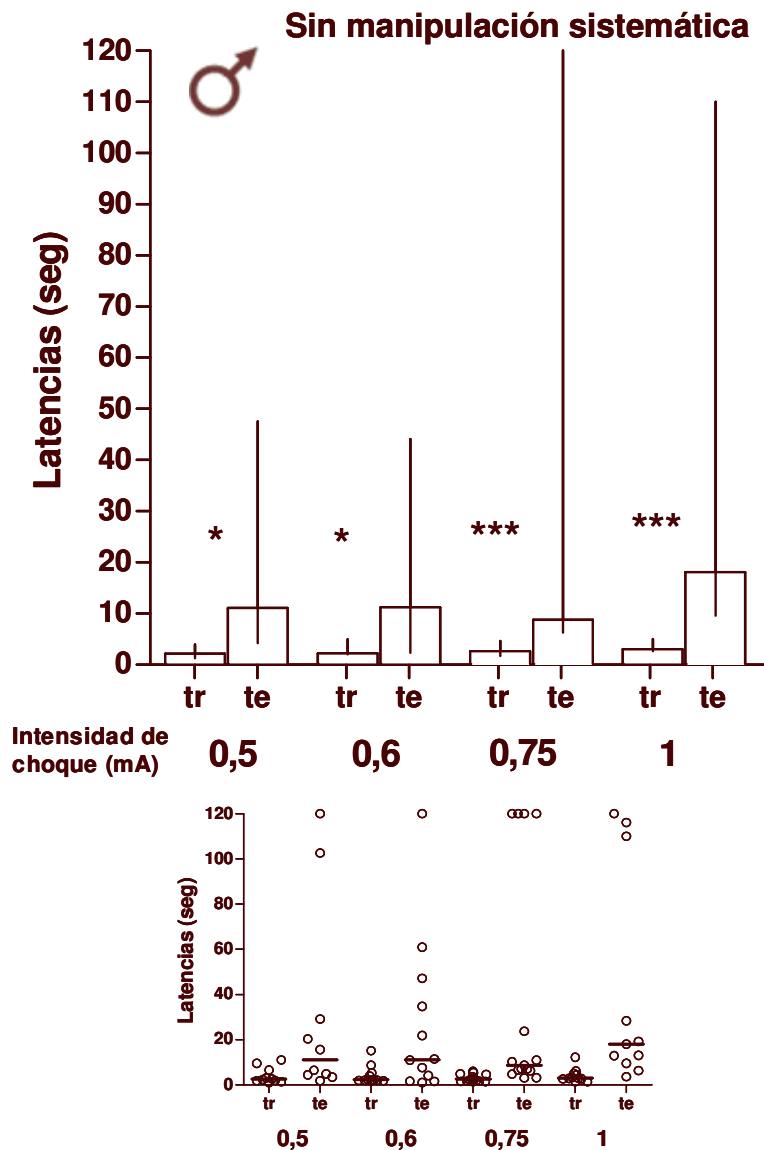


Fig 3.3: Efecto de la manipulación de los animales sobre el desempeño en la prueba de SD-IA.

El gráfico de barras representa las medianas de latencias de descenso de la plataforma con sus rangos intercuartiles (25; 75) de ratas macho (sin manipulación sistemática desde el destete), entrenadas con distintas intensidades de choque (0,5; 0,6 ;0,75 y 1 mA; N= 15, 10, 12 y 11 respectivamente).

tr: latencia de entrenamiento; **te:** latencia de test.

Panel inferior: gráfico de *scatter*.

* Diferencias significativas entre entrenamiento y test; prueba para datos apareados de Wilcoxon (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

No se observó coherencia en las respuestas con relación a la intensidad del choque, tampoco hubo correlación significativa entre la intensidad de estímulo del entrenamiento y el nivel de desempeño (diferencias de latencias) para los animales que no recibieron manipulación sistemática ($p=0,33$, y coeficiente de Spearman $r=0,80$, correlación no paramétrica entre diferencias de latencia y la intensidad de choque). Cuando se compararon las diferencias de latencias (test - entrenamiento) entre grupos, no fueron significativamente distintas ($p>0,05$; por prueba de ANOVA de una vía, no paramétrica, Kruskal-Wallis), de manera que todos los grupos parecen haber tenido un desempeño similar.

En la tabla 3.1 se muestran las medianas con sus rangos intercuartiles, de las diferencias de latencias (test –entrenamiento) de los grupos de ratas macho con y sin manipulación sistemática, cuando fueron entrenados con distintas intensidades de choque (corresponden a los animales de las fig. 3.2 y 3.3) para poder evaluar el efecto de la manipulación sobre esta tarea. Para el caso de los animales entrenados con una intensidad de choque de 1 mA, las latencias de test fueron significativamente mayores para el grupo con manipulación sistemática ($p<0,05$, por prueba para muestras no apareadas de Mann Whitney). Si bien no hubo diferencias significativas entre las diferencias de latencias para los grupos con y sin manipulación sistemática, para ninguna de las intensidades de choque ensayadas (0,5, 0,6, 0,75 y 1 mA) ($p>0,05$ por prueba de Mann Whitney para muestras no apareadas), hubo una clara tendencia a un mejor desempeño y rendimiento en el test, de los animales con previa manipulación sistemática. Los animales que recibieron esta manipulación tuvieron valores de medianas de diferencias de latencias mucho mayores respecto de las obtenidas por aquellos que no la recibieron, cuando fueron entrenados con intensidades de choque mayores a 0,5 mA (ver tabla 3.1)

Tabla 3.1: Efecto de la intensidad del estímulo y de la manipulación sistemática sobre el desempeño en la prueba de SD-IA de grupos de machos.

		0,5 mA	0,6 mA	0,75 mA	1mA
Con manipulación sistemática	<i>Mediana</i>	7,83 (0,64;28,85)	18.57 (1,21;65,84)	24.77 (6,86; 93,38)	76,70 (30,10; 112,0)
Sin manipulación sistemática	<i>Mediana</i>	7.37 (0,12;46,83)	6.83 (-0,92;41,90)	5,40 (3,54;114,6)	13,03 (6,61;108,7)

Se expresan las medianas con sus rangos intercuartiles 25 y 75 de las diferencias de latencias (test-entrenamiento) obtenidas para los grupos de las figuras 3.1 y 3.3. No se observan diferencias significativas de las diferencias entre aquellos que recibieron o no manipulación sistemática (entrenados con igual intensidad de choque), prueba no paramétrica para datos no apareados de Mann Whitney ($p>0,05$).

Si bien el único grupo que mostró una mejoría significativa en la retención cuando recibió manipulación sistemática desde el destete fue aquel entrenado con 1 mA esta manipulación tendió a mejorar la memoria de esta tarea para las intensidades de choque por debajo de 1 mA y en las condiciones de estos ensayos. Además, la experiencia de los entrenadores permitió concluir que dicha manipulación simplifica y facilita la necesaria manipulación de las ratas durante el

experimento de comportamiento. Al recibir la manipulación sistemática los animales estaban más relajados y eran más dóciles, notablemente menos agresivos respecto a los que no habían recibido esta manipulación, de manera que parecieron más habituados a la manipulación humana. Por esa razón, los ensayos que se describen a continuación fueron efectuados con animales que recibieron manipulación sistemática desde el destete.

Puede especularse que la sola manipulación necesaria para pasar a la rata desde una jaula a otra durante la limpieza y el pesaje, sería suficiente para disminuir o “enmascarar” una posible mayor incidencia de la manipulación sistemática que realizamos desde el destete, así como podría contribuir a disminuir o anular la incidencia de la manipulación durante el ensayo por el pasaje a la caja de evitación inhibitoria en el momento del entrenamiento.

III. 2. INTERACCION ENTRE TAREAS DIFERENTES

En nuestro laboratorio se solía colocar a los animales en el campo abierto antes de realizar cualquier otra tarea de comportamiento, con la doble finalidad de habituarlos a la manipulación por el experimentador y al cambio de ambiente. De este modo se trataba de reducir el efecto en general y el estrés en particular, causados por la novedad, tanto de ser manipulados, como de ser colocados en una arena desconocida, para luego ser entrenados en una tarea comportamental, en este caso con componentes claramente aversivos. Como el procesamiento de las memorias de ambas experiencias depende, al menos en parte, de las mismas estructuras cerebrales, nos preocupaba la posible interacción.

Efecto de la exposición al campo abierto sobre la memoria de SD-IA

Efecto de una exposición al OF sobre el desempeño en SD-IA en animales con entrenamiento “suave” (0,5 mA)

Siguiendo el protocolo esquematizado en la parte superior de la fig. 3.4, se evaluó si la exposición a una sesión de 3 o de 5 minutos en el campo abierto (OF), (ver discusión pág. 186; introducción pág. 35), realizada 1 h 30 min antes del entrenamiento en SD-IA, tenía algún efecto observable sobre el desempeño de las ratas en esta última tarea, cuando se las entrenaba con una intensidad de choque umbral, de 0,5 mA, capaz de generar, al menos en algunos animales, una memoria de largo plazo (LTM).

Se entrenaron tres grupos de machos. Las ratas de uno de esos grupos fueron expuestas durante **3 minutos** a una sesión de OF; mientras que en otro grupo fueron expuestas durante **5 minutos** al OF. Las ratas del tercer grupo, utilizado como control, fueron entrenadas en SD-IA con igual intensidad de choque, pero sin exposición al OF. A las 24 h se les realizó el test a todos los animales en ausencia de choque eléctrico, como se hace habitualmente.

La figura 3.4 A muestra un gráfico de barras representando las medianas de latencias de descenso durante el entrenamiento en SD-IA y durante el test, con sus respectivos desvíos intercuartiles. Las barras punteadas corresponden a los grupos que fueron expuestos a una sesión de OF (grupo 1 OF), mientras que las barras vacías corresponden a animales que no fueron expuestos al OF (grupo No-OF). No hubo diferencias significativas en las latencias de entrenamiento entre los distintos grupos ($p > 0,05$, por Kruskal Wallis, ANOVA de una vía). Las latencias de test fueron significativamente mayores que las del entrenamiento para los tres grupos ($p < 0,01$ tanto para los grupos expuestos a una sesión de OF de 3 o de 5 minutos [$N=12$], como para el grupo no expuesto al OF [$N=10$]; prueba para muestras apareadas de Wilcoxon). Es decir que los animales en todos los grupos alcanzaron el rendimiento adecuado para considerar que aprendieron la tarea y formaron una LTM. No hubo diferencias significativas entre las medianas de las latencias de descenso de la plataforma durante el test, entre los distintos grupos ($p > 0,05$; por prueba de Kruskal Wallis, ANOVA de una vía). El gráfico de *scatter* refleja un perfil muy similar de la distribución de los valores de latencias del test para todos los grupos estudiados. Tampoco hubo diferencias significativas en la comparación de las diferencias de latencias (test - entrenamiento) entre todos los grupos ($p > 0,05$; por prueba de Kruskal Wallis, ANOVA de una vía).

Por lo tanto podemos concluir que una sola exposición de 3 o de 5 minutos al OF, una hora y media antes del entrenamiento en SD-IA con intensidad de choque cercana al umbral, no produjo efecto evidente sobre el desempeño en esta tarea.

Teniendo en cuenta que una sesión de campo abierto, realizada 1 h 30 min antes de SD-IA no tuvo efecto evidente sobre el desempeño en esta última tarea, se acortó el intervalo entre ambas tareas. Se repitió el mismo protocolo que en la fig 3.4 A, pero se acortó a 50 min el intervalo entre la sesión en el OF y el entrenamiento (con 0,5 mA) en SD-IA (como se indica en el esquema temporal de la fig 3.4 B). Tanto el grupo de animales con intervalo de 50 min, como aquel con intervalo de 90 min, alcanzaron el criterio de aprendizaje y expresaron una LTM de SD-IA ($p < 0,05$ entre latencias de entrenamiento vs. test, grupo 90 min de intervalo, y $p < 0,01$ para el grupo de 50 min de intervalo, prueba para muestras apareadas de Mann Whitney). Ambos grupos evidenciaron un desempeño similar ($p > 0,05$ para las diferencias de latencias de los grupos expuestos al OF 50 min vs. 90 min antes de SD-IA, por prueba para muestras no apareadas de Mann Whitney) (fig 3.5 B). Es decir que la exposición previa a una sola sesión de OF no pareció ejercer efecto evidente sobre el desempeño en SD-IA con un entrenamiento débil, ya sea que el intervalo entre ambas tareas fuera de 50 min o 90 min.

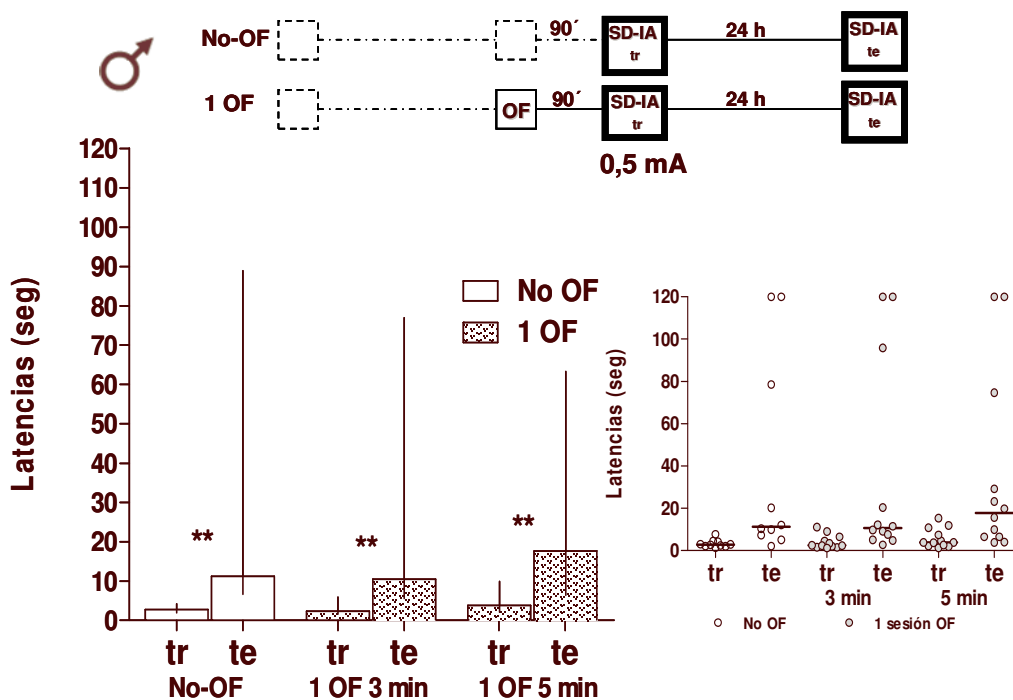


Fig 3.4 A: Efecto de una exposición al OF sobre el desempeño en SD-IA en animales con entrenamiento “suave” (0,5 mA): Influencia de la duración de la sesión de campo abierto sobre el desempeño en SD-IA.

Arriba: Esquema del diseño experimental para evaluar el efecto de la previa exposición al OF en el desempeño de la SD-IA.

Diagrama de barras: se representan las medianas con sus rangos intercuartiles (25; 75) de latencias de descenso de ratas macho entrenadas con choque de 0,5 mA. Los grupos 1 OF (barras sombreadas) fueron previamente entrenados en una sesión de 3 minutos o de 5 minutos en el campo abierto (N= 12, para ambos grupos). El grupo No OF (barras vacías) no fue expuesto al campo abierto (N= 10).

tr: latencia de entrenamiento; **te:** latencia de test.

Panel lateral: gráfico de *scatter*.

* Diferencia significativa entre entrenamiento y test; prueba para datos apareados de Wilcoxon (**p<0,01).

Tabla 3.2 : Se expresan las medianas y los rangos intercuartiles (25;75) de las diferencias de latencias (test-entrenamiento) obtenidas para los grupos de ratas macho entrenadas con choque de 0,5 mA, de la fig 3.4 A, que fueron previamente expuestas o no a una sesión de 3 o de 5 minutos en el OF.

	No-OF	1OF 3min	1OF 5min
Mediana	8,73 (4,87;85,03)	9,015 (3,06; 69,46)	10,46 (2,09; 56,85)

No hubo diferencias significativas de las diferencias entre los grupos, por prueba para datos no pareados de Mann Whitney (p>0,05).

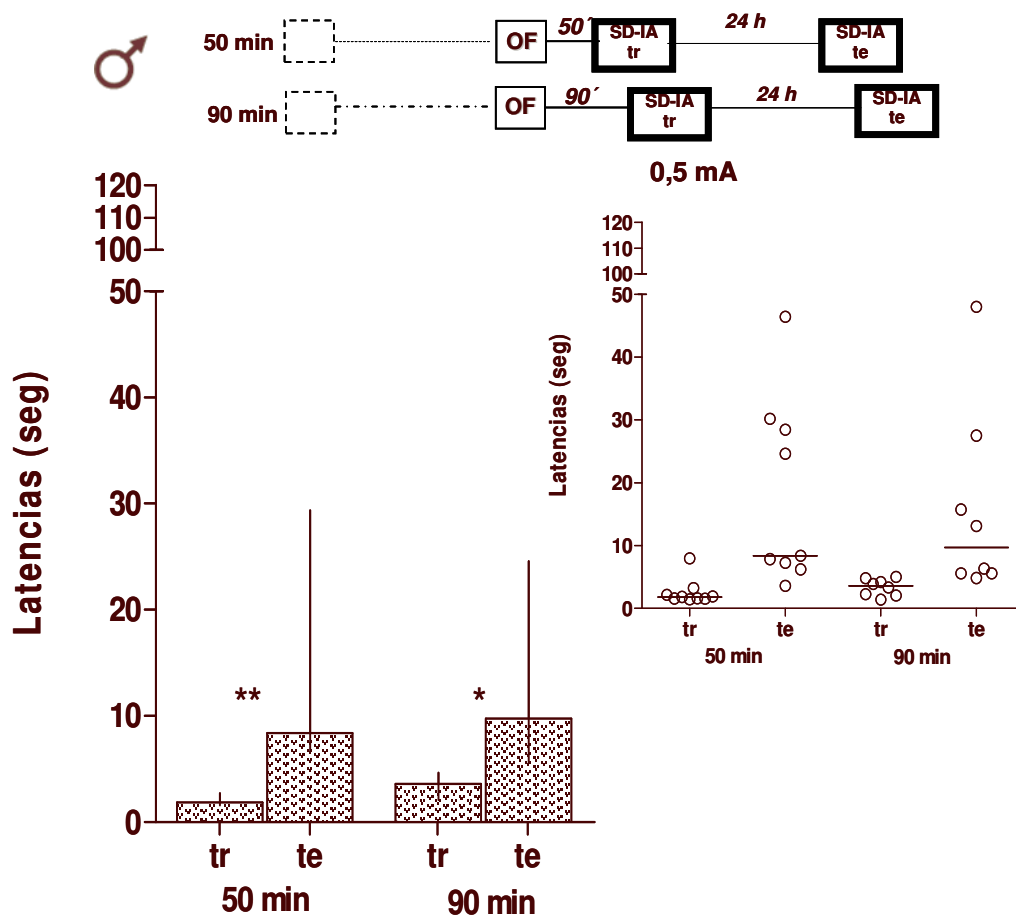


Fig 3.4 B: Efecto de una exposición al OF sobre el desempeño en SD-IA en animales con entrenamiento “suave” (0,5 mA): Influencia del intervalo entre una sesión de campo abierto y el entrenamiento de SD-IA sobre el desempeño en esta tarea.

Arriba: Esquema del diseño experimental para evaluar el efecto de la previa exposición (en distintos momentos) al OF sobre el desempeño de la SD-IA.

El gráfico de barras representa las medianas con sus rangos intercuartiles (25; 75) de latencias de descenso de ratas macho entrenadas con choque de 0,5 mA. Todos los grupos fueron previamente entrenados en una sesión de 3 minutos en el campo abierto. Se compara el desempeño en SD-IA cuando el intervalo entre el campo abierto y el entrenamiento en SD-IA fue de 50 min (N=9) o 90 min (N= 8).

tr: latencia de entrenamiento; **te:** latencia de test.

Panel lateral: gráfico de *scatter*.

* Diferencia significativa entre entrenamiento y test; prueba para datos apareados de Wilcoxon (*p<0,05; **p<0,01).

Efecto de dos exposiciones al OF sobre el desempeño en SD-IA en animales entrenados con distinta intensidad de choque

Nos propusimos evaluar si la exposición a dos sesiones en un campo abierto (*Open Field*: OF), de 3 minutos cada una, realizadas 24 h antes y una hora y media antes del entrenamiento en SD-IA - según el protocolo experimental corrientemente usado en nuestro y en otros laboratorios-, tenía algún efecto observable sobre el desempeño de las ratas en esta última tarea. Tres grupos de machos fueron entrenados en SD-IA con diferentes intensidades de choque (0,5 mA, 0,6 mA y 0,75 mA). El test se realizó 24 h más tarde (sin aplicación de choque eléctrico).

La figura 3.5 corresponde al desempeño en SD-IA de los tres grupos de ratas machos que fueron expuestas previamente al OF. La figura 3.5 A muestra un gráfico de barras cuya altura representa las medianas y los desvíos intercuartiles de las latencias de descenso de la plataforma durante el entrenamiento a la izquierda y las del test, a la derecha. No hubo diferencias significativas en las latencias de entrenamiento entre los distintos grupos ($p > 0,05$; por prueba de Kruskal Wallis, ANOVA de una vía). Las latencias del test fueron significativamente distintas y mayores a las del entrenamiento para todos los grupos de ratas macho ($p < 0,01$ para cada una de las intensidades de choque ensayadas: 0,5; 0,6 y 0,75 mA, siendo $N = 10, 14$ y 11 para cada choque, respectivamente; prueba para muestras apareadas de Wilcoxon). Es decir que todos los grupos de animales alcanzaron el criterio de aprendizaje de la tarea y formaron una LTM. Las diferencias de latencias (test-entrenamiento) fueron significativamente distintas para los grupos entrenados con distinta intensidad de choque ($p < 0,01$, Kruskal Wallis, ANOVA) (fig 3.5 B), ya que el grupo entrenado con 0,75 mA tuvo un mejor desempeño respecto a los grupos entrenados con 0,6 mA y con 0,5 mA ($p < 0,05$ para 0,6 mA vs. 0,75 mA; $p < 0,01$ para 0,5 mA vs. 0,75 mA; por prueba para muestras no apareadas de Mann Whitney). Se observó coherencia en las respuestas en relación con la intensidad del choque, pero no hubo correlación significativa entre la intensidad de estímulo del entrenamiento y el nivel de desempeño (diferencias de latencias) para los animales entrenados con distinta intensidad de choque ($p = 1$, y coeficiente de Spearman $r = 0,50$, correlación no paramétrica entre diferencias de latencia y la intensidad de choque).

Se comparó el desempeño en SD-IA de grupos de ratas macho con y sin exposición a dos sesiones previas de campo abierto, entrenadas con igual intensidad de choque, de manera de evaluar el efecto del OF sobre esta tarea (corresponden a los mismos animales del ensayo de la fig 3.2 comparados con los de la fig. 3.5). Aunque hubo una tendencia a un mejor desempeño y rendimiento en los animales con exposición al campo abierto, es decir que los valores de las medianas fueron superiores para los grupos con exposición al OF (especialmente cuando se entrenó a los grupos con 0,75 mA), las diferencias no fueron significativas entre los grupos con o sin exposición previa al OF para ninguna de las intensidades de choque ensayadas ($p > 0,05$ para la

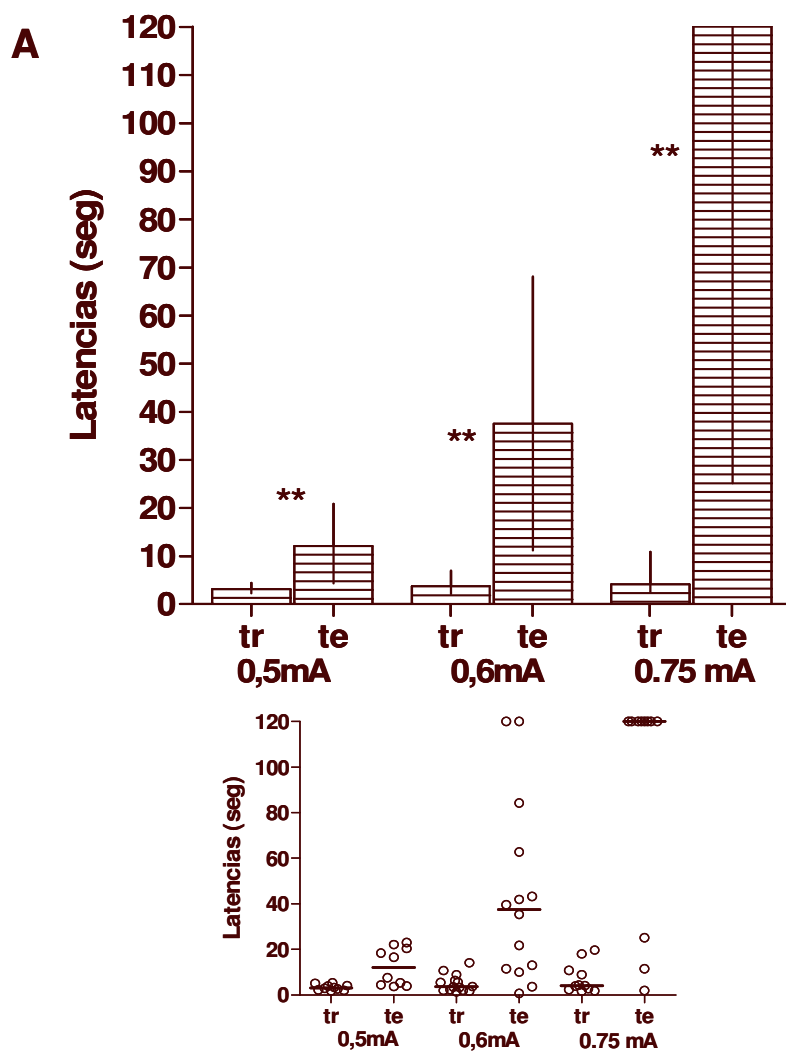
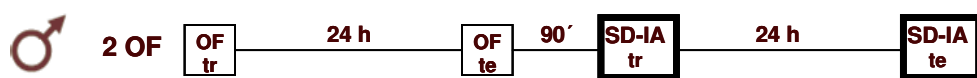


Fig 3.5: Efecto de dos exposiciones al OF sobre el desempeño en SD-IA en animales entrenados con distinta intensidad de choque.

Arriba: Esquema del diseño experimental para evaluar el efecto de la previa exposición al OF en el desempeño de la SD-IA.

A: Gráfico de barras que representa las medianas con sus rangos intercuartiles (25; 75) de latencias de descenso de la plataforma de ratas macho entrenadas con distintas intensidades de choque (0,5; 0,6 y 0,75 mA, según se indica en la abscisa; N= 10, 14 y 11 respectivamente). Todos los grupos fueron expuestos a dos sesiones de campo abierto 24 h y 1 h 30 min antes del entrenamiento de SD-IA.

tr: latencia de entrenamiento; **te:** latencia de test.

Panel inferior: gráfico de *scatter*.

*Entrenamiento significativamente diferente del test; prueba para datos apareados de Wilcoxon (**p<0,01).

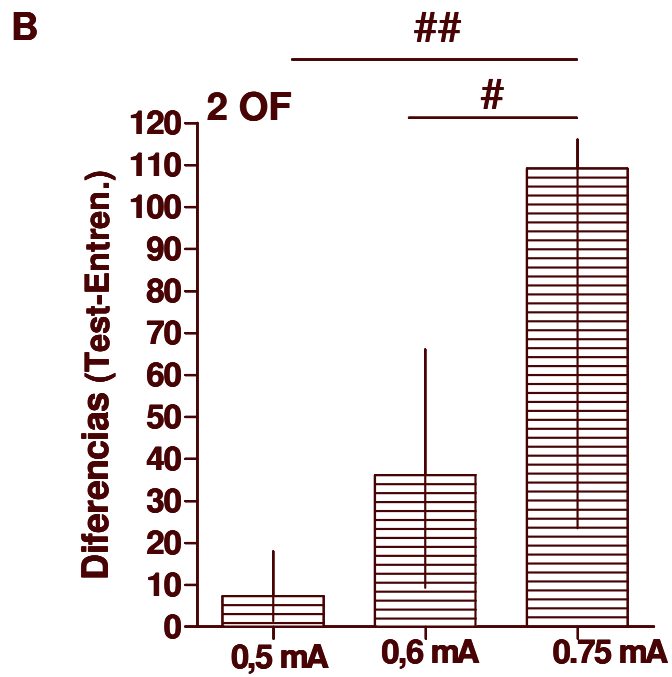


Fig 3.5: Efecto de dos exposiciones al OF sobre el desempeño en SD-IA en animales entrenados con distinta intensidad de choque.

B : Las barras representan las diferencias de latencias (test-entrenamiento) con sus rangos intercuartiles (25; 75) de los grupos de la parte A de esta figura .

Diferencias significativas de las diferencias entre distintas intensidades de choque por prueba para datos no apareados de Mann Whitney (# $p < 0,05$; ## $p < 0,01$).

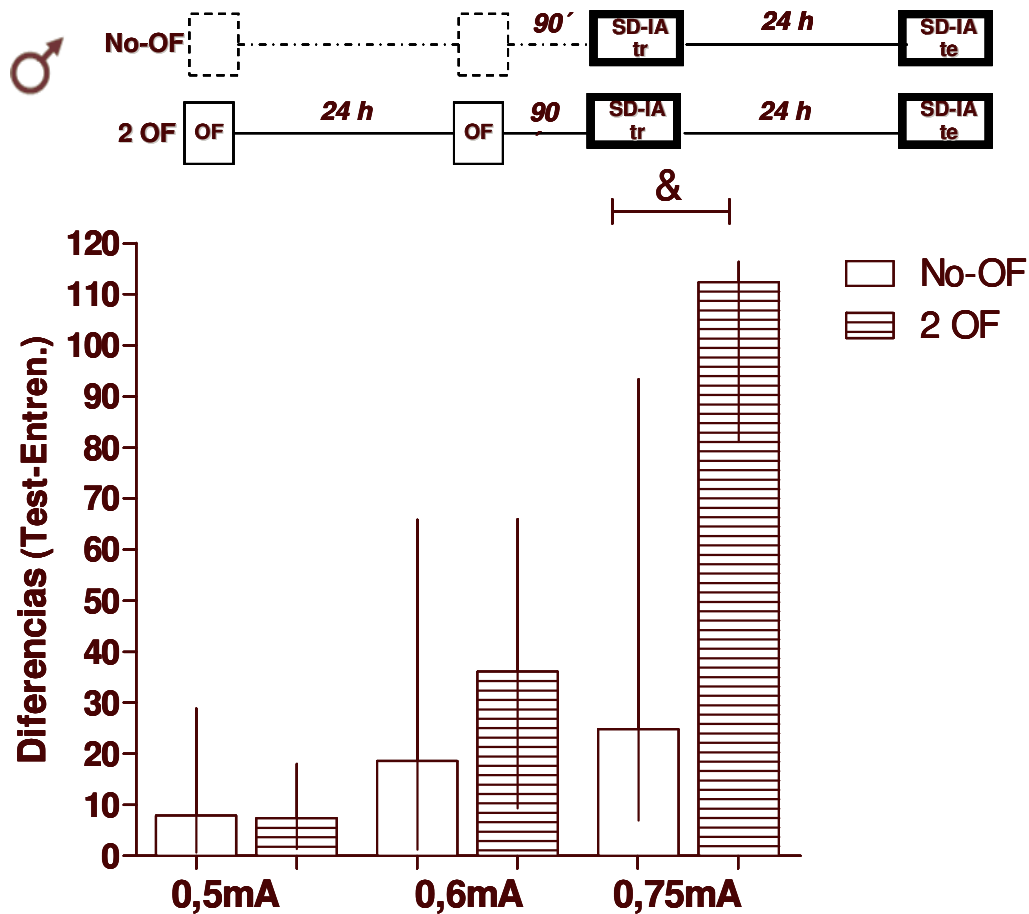


Fig 3.5 C: Efecto de dos exposiciones al OF sobre el desempeño en SD-IA en animales entrenados con distinta intensidad de choque: comparación de grupos OF vs No-OF.

Las barras representan las diferencias de latencias (test-entrenamiento) de los grupos de animales de las figuras 3.2. y 3.5.

& Diferencias significativas de los test entre grupo OF vs. No-OF (entrenados con igual intensidad de choque); prueba para datos no pareados de Mann Whitney (& $p < 0,05$).

		0,5 mA	0,6 mA	0,75 mA
No-OF	Mediana	7,83 (0,63; 28,85)	18,57 (1,21; 65,84)	24,77 (6,86; 93,38)
OF	Mediana	7,34 (1,36; 17,98)	36,07 (9,30; 65,99)	112,38 (81,08; 116,40)

Tabla 3.2: Se expresan las medianas con sus rangos intercuartiles 25 y 75 de las diferencias de latencias (test-entrenamiento) obtenidas para los grupos de las figuras 3.2 A y 3.5.

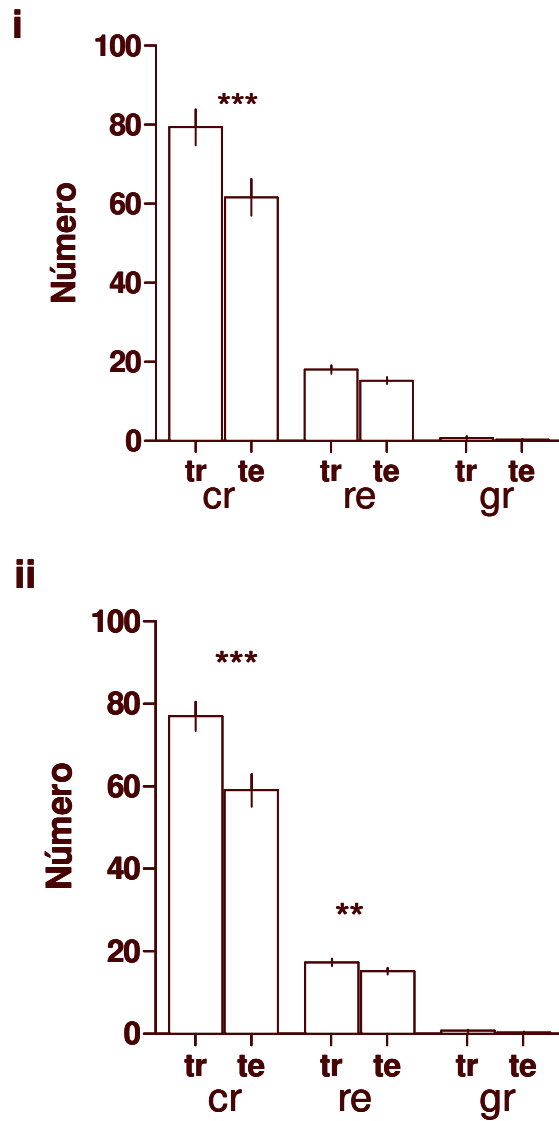


Fig 3.5 D: Desempeño en el campo abierto de dos grupos de ratas macho que fueron expuestas a 2 sesiones en el OF (de los mismos animales de la fig 3.5 A), que luego fueron entrenados en SD-IA con distinta intensidad de choque.

i: corresponden a las ratas que luego fueron entrenadas con 0,6 mA.

ii: idem con 0,75 mA. Las barras representan medias y error estándar del número de cruces (cr), elevaciones sobre las patas traseras, (*rearings*: re) y acicalamientos (*groomings*: gr), durante la primera sesión (tr) y la segunda sesión (te) de OF.

* Diferencias significativas del parámetro entre la primera y segunda sesión por prueba de t para datos apareados (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

comparación de las diferencias de latencias [test – entrenamiento], de los grupos entrenados con 0,5, 0,6, 0,75 mA, datos de fig 3.5 A vs. datos de fig 3.2, por prueba para muestras no apareadas de Mann Whitney). Hubo diferencias significativas en el desempeño durante el test entre aquellos grupos entrenados con una intensidad de choque de 0,75 mA, siendo mayores las medianas de las latencias para el grupo que fue expuesto previamente a dos sesiones de OF respecto del grupo que no tuvo esta exposición ($p < 0,05$, por prueba para muestras no apareadas de Mann Whitney) (fig 3.5 C).

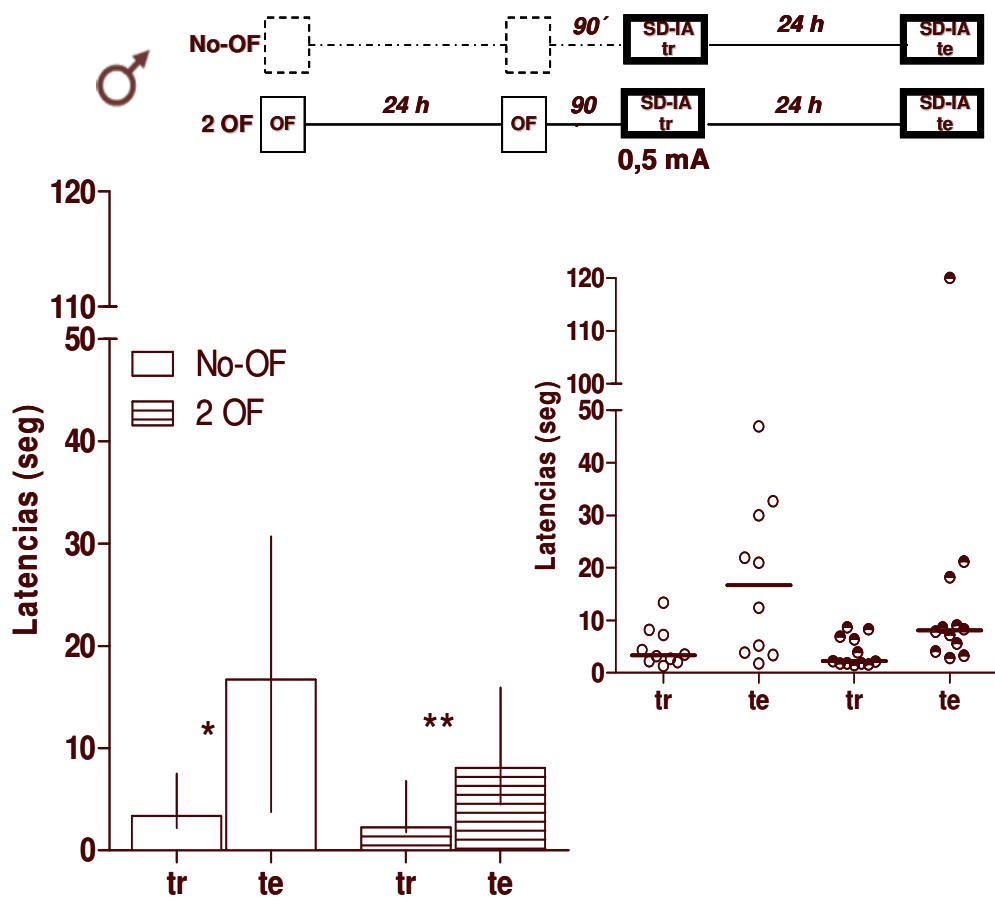
En la segunda sesión de campo abierto se observó disminución significativa de las elevaciones sobre los miembros posteriores (re: *rearings*) ($p < 0,01$, por prueba de t para datos apareados); y una disminución significativa de los cruces (cr) ($p < 0,001$, por prueba de t para datos apareados) (fig 3.5 C).

En este punto debe señalarse que, si bien la comparación de varios ensayos realizados en diversas épocas, incluyendo distintas estaciones, con distintas camadas de animales, arrojaron resultados muchas veces cercanos a la significación estadística, en general no la alcanzaron. Por ello, y por la enorme variación individual que conlleva una gran dispersión en las respuestas comportamentales, nosotros y otros investigadores consideramos que, en este tipo de experimentación, las comparaciones más válidas son las que se realizan intra-ensayo. Es por ello que luego se procedió a comparar el desempeño en SD-IA entre grupos de animales en ensayos realizados simultáneamente o, al menos, dentro de la misma semana.

Efecto de dos exposiciones al OF sobre el desempeño en SD-IA en animales con entrenamiento “suave” (0,5 mA)

Dos grupos de machos se entrenaron en la SD-IA con un choque de 0,5 mA, y se evaluó la influencia de la exposición previa a dos sesiones de OF de 3 min cada una, según el diseño experimental ya descrito, habiendo un intervalo de 1 h 30 minutos entre la segunda sesión de OF y el entrenamiento en la SD-IA (ver esquema del diseño experimental de la fig 3.6).

La figura 3.6 muestra gráficos de barras de las medianas y sus desvíos intercuartiles, de las latencias de descenso durante el entrenamiento y durante el test en SD-IA: las barras rayadas corresponden a los grupos que fueron previamente expuestos a dos sesiones de OF (grupo 2 OF), mientras que las barras vacías corresponden a animales que no fueron expuestos al OF (grupo No-OF). No hubo diferencias significativas en las latencias de entrenamiento entre los grupos ($p > 0,05$, por prueba para muestras no apareadas de Mann Whitney). Las latencias de test fueron significativamente diferentes y mayores respecto de las del entrenamiento para los dos grupos analizados ($p < 0,05$, para el grupo No-OF [N=10]; $p < 0,01$ para el grupo OF [N=12]; por prueba para muestras apareadas de Wilcoxon). Es decir que tanto el grupo de ratas expuestas previamente a las dos sesiones en el OF, como aquellas que no tuvieron esta exposición al OF (No-OF), alcanzaron el criterio de aprendizaje de la tarea, expresando una LTM de la SD-IA. A su vez, las



diferencias de latencias (test-entrenamiento) de los distintos grupos no fueron estadísticamente diferentes ($p > 0,05$, grupo OF vs. grupo No-OF por prueba para muestras no apareadas de Mann Whitney). Es decir que la exposición a dos sesiones en el OF, previamente al entrenamiento suave en SD-IA no produjo cambios significativos en la retención y LTM de esta tarea.

En la segunda sesión en el OF, se observó disminución significativa del número de elevaciones sobre los miembros posteriores ($p < 0,05$, por prueba de t para datos apareados).

Luego se compararon las diferencias de latencias de los grupos de machos entrenados con 0,5 mA, expuestos a una sola sesión de OF de 3 o 5 minutos (fig 3.4 A), con aquellos que fueron expuestos a dos sesiones de OF de 3 minutos cada una (fig 3.6), comprobándose que el desempeño en SD-IA no fue estadísticamente distinto para los tres grupos ($p > 0,05$; por prueba Kruskal Wallis, ANOVA). Es decir que no hubo diferencias significativas entre los grupos que fueron expuestos a una sesión de 3 min vs. aquellos expuestos a dos sesiones de 3 min. Tampoco hubo diferencias significativas entre los grupos expuestos a una sesión de 5 min vs. aquellos que fueron expuestos a dos sesiones de 3 min. Es decir que cuando se entrenó con una intensidad de choque umbral de 0,5 mA en SD-IA, la exposición previa al campo abierto no tuvo un efecto evidente sobre el desempeño en esta tarea.

Por otra parte, dos grupos de hembras se entrenaron en SD-IA con un choque de 0,5 mA, y se evaluó la influencia de la exposición previa a dos sesiones de OF, según el diseño experimental seguido para los machos (ver esquema del diseño experimental en la parte superior de la fig 3.7).

La figura 3.7 muestra gráficos de barras de las medianas y sus desvíos intercuartiles, de las latencias de descenso durante el entrenamiento y durante el test en SD-IA. Las barras rayadas corresponden a los grupos que fueron expuestos a dos sesiones de campo abierto (grupo 2 OF), mientras que las barras vacías corresponden a animales que no fueron expuestos al campo abierto (grupo No-OF). No hubo diferencias significativas en las latencias de entrenamiento entre los grupos ($p > 0,05$, grupo 2 OF vs grupo No-OF por prueba para muestras no apareadas de Mann Whitney). Las latencias del test fueron significativamente diferentes y mayores que las del entrenamiento para los dos grupos ($p < 0,001$ tanto para el grupo No-OF [N=18]; como para el grupo con 2 OF [N=16]; por prueba para muestras apareadas de Wilcoxon). Es decir que ambos grupos alcanzaron el criterio de aprendizaje, y formaron una LTM de la tarea. Y a su vez, no hubo diferencias significativas entre las diferencias de latencias (test - entrenamiento), cuando se compararon los grupos que fueron expuestos con los grupos que no fueron expuestos al OF ($p > 0,05$; por prueba para muestras no apareadas de Mann Whitney).

En conclusión, la exposición al OF (dos sesiones de 3 min cada una) previa al entrenamiento en SD-IA, con intensidad de choque suave, no dio lugar a una modificación significativa en el desempeño en esta última tarea, tanto para el caso de los machos, como para el caso de las hembras.

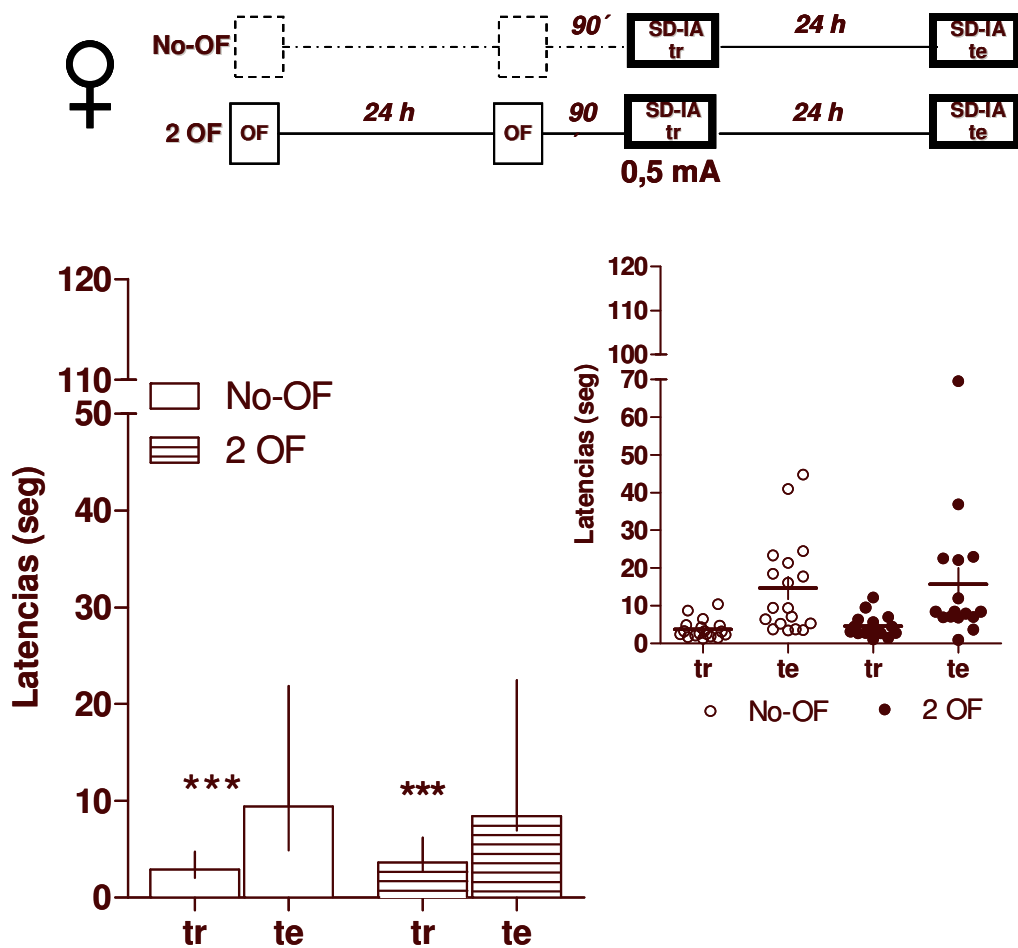


Fig 3.7 A: Efecto de dos exposiciones al OF sobre el desempeño en SD-IA en animales con entrenamiento “suave” (0,5 mA).

Arriba: Esquema del diseño experimental para evaluar el efecto de la previa exposición al OF en la SD-IA. **Izquierda:** Gráfico de barras que representa las medianas con sus rangos intercuartiles (25; 75) de las latencias de descenso de dos grupos de hembras: el grupo 2 OF que fue previamente entrenado en dos sesiones de campo abierto (barras rayadas) (N= 16), y el grupo No-OF (barras vacías) no fue expuesto al campo abierto (N= 18). Derecha: gráfico de *scatter dot*.

* Diferencias significativas entre entrenamiento y test; prueba para datos apareados de Wilcoxon (***) $p < 0,001$.

Efecto de dos exposiciones al OF sobre el desempeño en SD-IA en animales con entrenamiento “suave” (0,5 mA)

Evaluación de las memorias de corta corta y de larga duración

Luego se evaluó la influencia de la exposición previa a dos sesiones de OF sobre la memoria de corta duración (STM) en SD-IA (fig 3.7 B). Dos grupos de hembras se entrenaron en SD-IA con un choque de 0,5 mA, según el diseño experimental que se muestra en el esquema de la parte superior de la fig 3.7 B.

Se observaron disminuciones del número de cruces y de elevaciones sobre los miembros posteriores (*rearings*) en la segunda sesión en el OF, que fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$ para las elevaciones y $p < 0,01$ para los cruces, por prueba de t para datos apareados (tabla 3.3).

Tabla 3.3: Desempeño en el OF de las ratas hembra del ensayo de la figura 3.7 B (grupo 2 OF).

Campo abierto	Cruces		Elevaciones		Acicalamientos	
	1° sesión	2° sesión	1° sesión	2° sesión	1° sesión	2° sesión
Media \pm ES	91,33 \pm 6,26**	68,33 \pm 6,15**	27,00 \pm 3,51*	20,22 \pm 2,27*	3,78 \pm 1,01	1,78 \pm 0,43

Se muestran las medias y su error estándar para los distintos parámetros registrados para el grupo OF.

Diferencias significativas para el parámetro correspondiente, entre la primera y segunda sesión, prueba de t para datos apareados ($p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Luego de la segunda sesión en el OF, 1 h 30 min más tarde las ratas fueron entrenadas en SD-IA (fig 3.7 B).

Las latencias del test (realizado 40 min luego del entrenamiento) fueron significativamente distintas y mayores respecto a las latencias del entrenamiento, tanto para el grupo que fue expuesto a dos sesiones de OF, como para el que no fue expuesto al OF ($p < 0,01$ en la comparación del entrenamiento con el test, prueba para muestras apareadas de Mann Whitney; grupo No-OF: [N=11] y grupo 2 OF: [N=12]). La exposición previa al OF no tuvo un efecto significativo, con respecto al grupo no expuesto al OF, sobre la memoria de corta duración ($p > 0,05$ en la comparación de las diferencias de latencias de los grupos 2 OF vs. No-OF, prueba para muestras no apareadas de Mann Whitney).

Pasadas las 24 horas del entrenamiento en SD-IA, se realizó un nuevo test para estos dos grupos de animales, de manera de evaluar la memoria de larga duración (LTM). Se comprobó que ambos grupos, ya fuera que hubieran sido expuestos o no al OF, alcanzaron el criterio de aprendizaje, evidenciando la formación de LTM de esta tarea ($p < 0,05$ para el grupo OF y $p < 0,01$ para el grupo No-OF, en la comparación entrenamiento vs. test LTM, prueba para muestras apareadas de Wilcoxon). Las memorias de corta duración no fueron significativamente distintas entre los dos

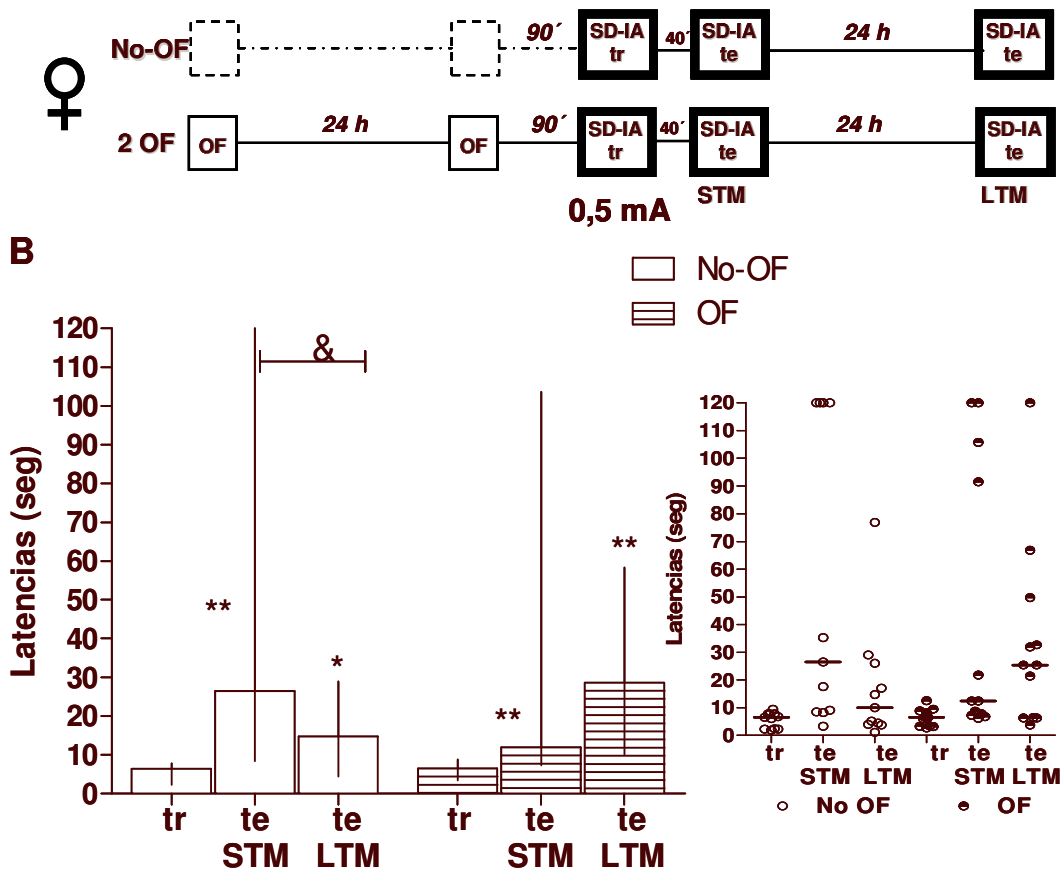


Fig 3.7 B: Efecto de dos exposiciones al OF sobre el desempeño en SD-IA en animales con entrenamiento “suave” (0,5 mA): Evaluación de las memorias de corta y larga duración.

Arriba: Esquema del diseño experimental para evaluar el efecto de la previa exposición al OF en el desempeño de la SD-IA en las distintas sesiones del test.

Izquierda: Gráfico de barras que representa las medianas con sus rangos intercuartiles (25; 75) de latencias de descenso de dos grupos de hembras: el grupo No-OF (barras vacías) que no fue expuesto al campo abierto (N=11) y el grupo 2 OF, que fue previamente entrenado en dos sesiones de campo abierto (barras rayadas) (N=12). Se representan las latencias obtenidas en el entrenamiento (tr), y en ambas sesiones de test: el test para evaluar la memoria de corta duración (STM) realizado 40 min después del entrenamiento (te STM); y en el test para evaluar la memoria de larga duración (LTM), realizado 24 h después del entrenamiento (te LTM).

Derecha: gráfico de *scatter*.

* Diferencias significativas entre entrenamiento y test; prueba para datos apareados de Wilcoxon (*p<0,05; **p<0,01).

& Diferencias significativas entre test STM y test LTM, prueba para datos apareados de Wilcoxon (&p<0,05)

grupos ($p > 0,05$ entre los test STM 2 OF vs. test STM No-OF; prueba de Mann Whitney). Tampoco fueron significativamente distintas las memorias de larga duración entre sí ($p > 0,05$ entre los test LTM 2 OF vs. test LTM No-OF; prueba de Mann Whitney). Pero la comparación del desempeño en el test realizado a los 40 min, respecto de aquel realizado a las 24 h, arrojó diferencias significativas para el caso los animales que no fueron previamente expuestos al OF, siendo mayores las medianas de latencias en el test de STM ($p < 0,05$; latencia de test STM vs. latencia de test LTM para grupos expuestos al OF, prueba de Mann Whitney).

Para el caso de los animales que fueron expuestos a 2 OF, el desempeño en el test realizado a los 40 min (STM), respecto al realizado a las 24 h (LTM), no fue significativamente distinto ($p > 0,05$, prueba de Mann Whitney). En el gráfico de *scatter* se pudo observar en el grupo de animales expuestos al OF, que en la distribución de los valores de latencias del test realizado a los 40 min hubo más animales con latencias cercanas al tope de 120 seg, respecto al test realizado a las 24 h.

La comparación de las diferencias de latencias (test - entrenamiento para STM) vs. (test - entrenamiento para LTM) no arrojó diferencias significativas, ni en el caso de los animales expuestos al OF, ni para el caso de los animales que no fueron expuestos al OF ($p > 0,05$ por prueba de Mann Whitney).

En otras palabras, la exposición de ratas hembras a dos sesiones de campo abierto previas al entrenamiento en SD-IA con intensidad de choque umbral, no produjo cambios evidentes en el desempeño en esta tarea evaluada por la retención a las 24 h, de manera similar a lo que sucedió con los machos. Pero en el momento de la evocación de la STM, las medianas de latencias fueron mayores que las de la LTM para las ratas previamente expuestas al OF. Mientras que no hubo diferencias significativas entre STM y LTM de los animales sin exposición previa al OF, al menos en las condiciones de estos ensayos.

Efecto de dos exposiciones al OF sobre el desempeño en SD-IA en animales con entrenamiento “fuerte” (0,75 mA)

Ratas machos se entrenaron en SD-IA con un choque de 0,75 mA, y se evaluó la influencia de la exposición previa dos sesiones de OF, de 3 min cada una, según el diseño experimental ya descripto. Nuevamente, el test de SD-IA se realizó a las 24 h luego del entrenamiento, en ausencia de choque eléctrico (ver esquema temporal en la parte superior de la fig 3.8 A).

La figura 3.8 corresponde al desempeño en SD-IA de los dos grupos de machos estudiados. La parte A de la figura muestra un gráfico de barras que representa las medianas y desvíos intercuartiles de las latencias de descenso de la plataforma, para las ratas macho entrenadas según el protocolo mencionado y descripto en el diagrama de la parte superior de la figura. Las barras

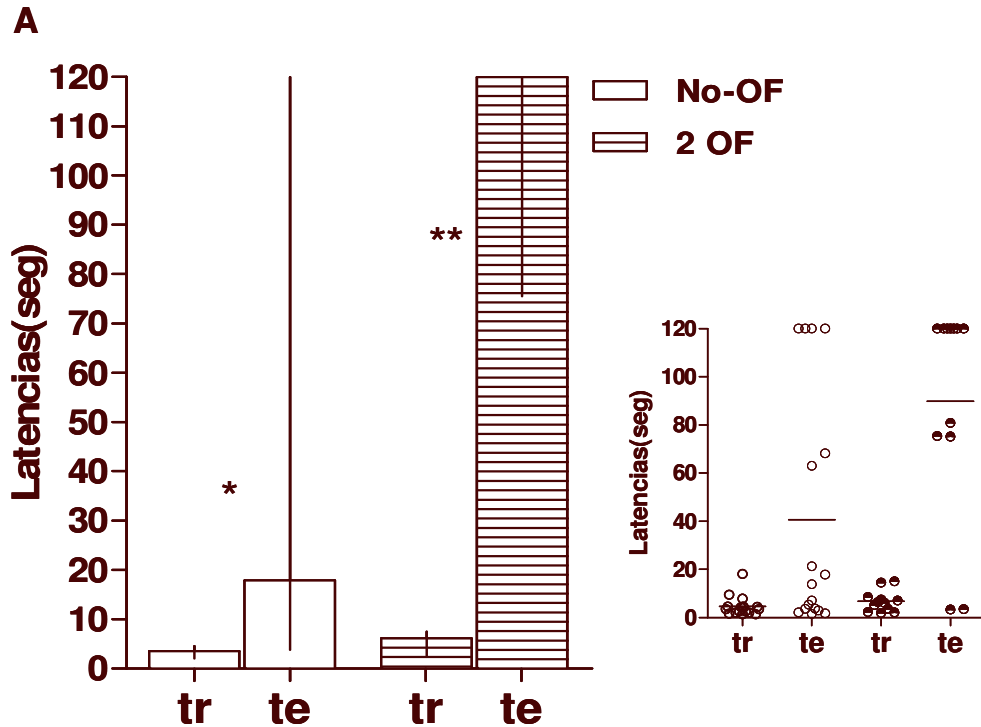
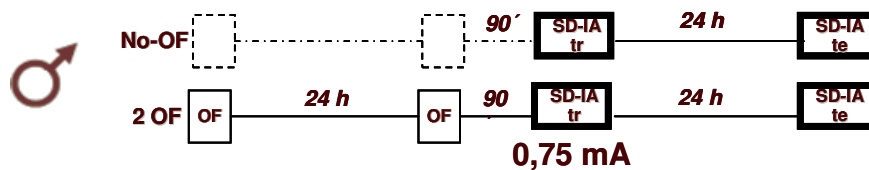


Fig 3.8: Efecto de dos exposiciones al OF sobre el desempeño en SD-IA en animales con entrenamiento “fuerte” (0,75 mA).

Arriba: Esquema del diseño experimental para evaluar el efecto de la previa exposición al OF en el desempeño de la SD-IA.

A: Izquierda: Gráfico de barras que representa las medianas con sus rangos intercuartiles (25; 75) de latencias de descenso de dos grupos de machos: el grupo 2 OF que fue previamente entrenado en dos sesiones de campo abierto (barras rayadas) (N= 11), y el grupo No-OF (barras vacías) no fue expuesto al campo abierto (N= 15).

tr: latencia de entrenamiento; **te:** latencia de test (25; 75).

Derecha: gráfico de *scatter dot*.

*Diferencias significativas entre entrenamiento y test; prueba para datos apareados de Wilcoxon (*p<0,05; **p<0,01).

vacías corresponden al grupo que no fue expuesto al campo abierto (No-OF) y las barras rayadas corresponden al grupo que fue expuesto a dos sesiones previas en el campo abierto (2 OF). No hubo diferencias significativas en las latencias de entrenamiento entre los grupos ($p > 0,05$, por prueba para muestras no apareadas de Mann Whitney). Las latencias del test fueron significativamente diferentes y mayores que las del entrenamiento para los dos grupos analizados ($p < 0,01$ para el grupo 2 OF [N=11]; $p < 0,05$ para el grupo No-OF [N=15]; por prueba para muestras apareadas de Wilcoxon); es decir que en ambos grupos se alcanzó el criterio de aprendizaje de la tarea, habiéndose formado una LTM.

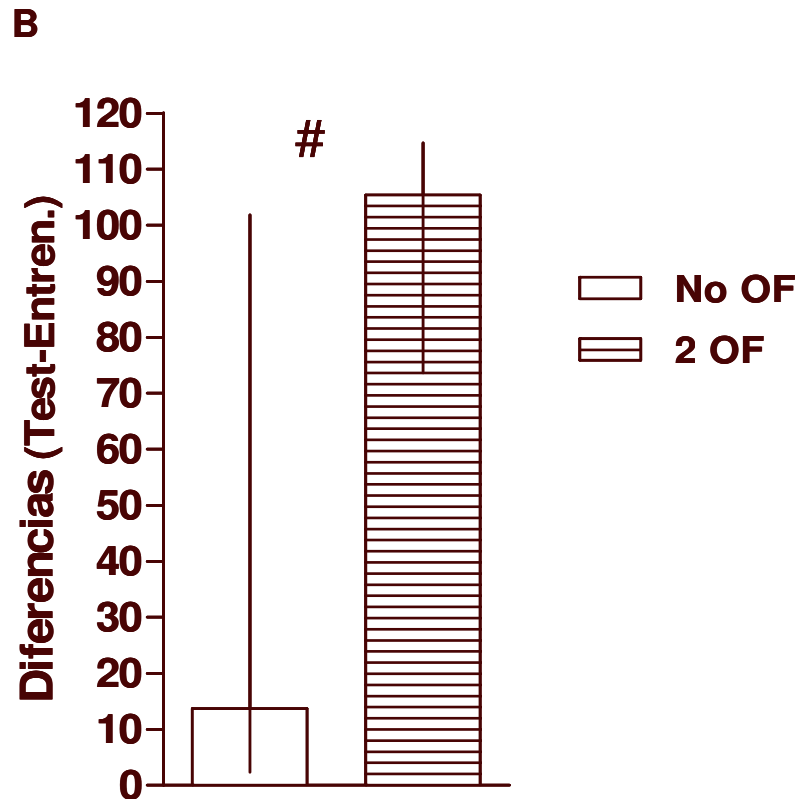


Fig 3.8: Efecto de dos exposiciones al OF sobre el desempeño en SD-IA en animales con entrenamiento “fuerte” (0,75 mA).

B: Diferencias de latencias (test-entrenamiento) con sus rangos intercuartiles (25; 75) de los grupos 2 OF y No-OF de la parte A de la figura.

Diferencias significativas entre las diferencias por prueba no pareada de Mann Whitney (# $p < 0,05$).

La figura 3.8 B muestra un gráfico de barras de las medianas de las diferencias de latencias (test-entrenamiento) de los dos grupos de animales (2 OF y No-OF). Al comparar las diferencias de latencias (test – entrenamiento) entre el grupo con dos sesiones en el OF y el grupo No-OF, se evidenció un desempeño significativamente mejor (mayores latencias durante el test y mayor diferencia) del grupo de animales expuestos previamente a dos sesiones en el OF, respecto al grupo

No-OF ($p < 0,05$, por prueba para muestras no apareadas de Mann Whitney). Es decir que las dos sesiones en el campo abierto habrían “facilitado” la formación de la LTM de la evitación inhibitoria.

III. 3. INFLUENCIA DEL CICLO LUZ/OSCURIDAD SOBRE LA MEMORIA EN LA RATA

En nuestro bioterio los animales son mantenidos permanentemente, tanto las ratas gestantes como sus crías, desde el nacimiento, en condiciones de ciclo luz/oscuridad invertido, respecto al día normal objetivo, de manera que los animales se encuentran en su fase de mayor actividad, cuando pasan más horas despiertos, en los momentos en que se realizan los ensayos.

Decidimos tratar de indagar si el hecho de entrenar a los animales durante su fase de mayor actividad (para las ratas criadas en CI) podía arrojar resultados diferentes en cuanto a la formación de una LTM y en cuanto al efecto observado del campo abierto sobre el desempeño en la SD-IA. Entonces, se decidió investigar la modulación de la memoria de esta tarea por el OF, en animales mantenidos en ciclo luz/oscuridad derecho (CD), entrenados durante su período de sueño (día objetivo).

Efecto del OF sobre el desempeño en la prueba de SD-IA en animales con entrenamiento “suave” (0,5 mA) durante su período de sueño (mantenidos en ciclo luz/ oscuridad derecho)

Tres grupos de machos se entrenaron en SD-IA con un choque de 0,5 mA, y se evaluó la influencia de la exposición previa al OF (ya sea dos sesiones realizadas 24 h y 1 h 30 min, o bien una única sesión 50 min -o 1 h 30 min, no mostrado aquí- antes del entrenamiento en SD-IA) durante su período de sueño. Nuevamente el test de SD-IA se realizó a las 24 h, en ausencia de choque eléctrico.

La figura 3.9 corresponde al desempeño en SD-IA. Se muestran gráficos de barras que representan las medianas y desvíos intercuartiles de las latencias de descenso de la plataforma para el grupo que no fue expuesto al campo abierto (grupo No-OF, barras vacías), para el grupo expuesto a una única sesión de OF (grupo 1 OF, barras punteadas) y para el grupo que fue expuesto a dos sesiones previas en el campo abierto (grupo 2 OF, barras rayadas). No hubo diferencias significativas en las latencias de entrenamiento en SD-IA entre los grupos ($p > 0,05$, por prueba para muestras no apareadas de Mann Whitney). Las latencias del test fueron significativamente diferentes y mayores que las del entrenamiento para los tres grupos ($p < 0,05$ para el grupo No-OF [N=13]; $p < 0,01$ para el grupo 1 OF [N=11] y para el grupo 2 OF [N=8]; por prueba para muestras apareadas de Wilcoxon); es decir que las ratas de todos los grupos aprendieron la tarea y formaron una LTM.

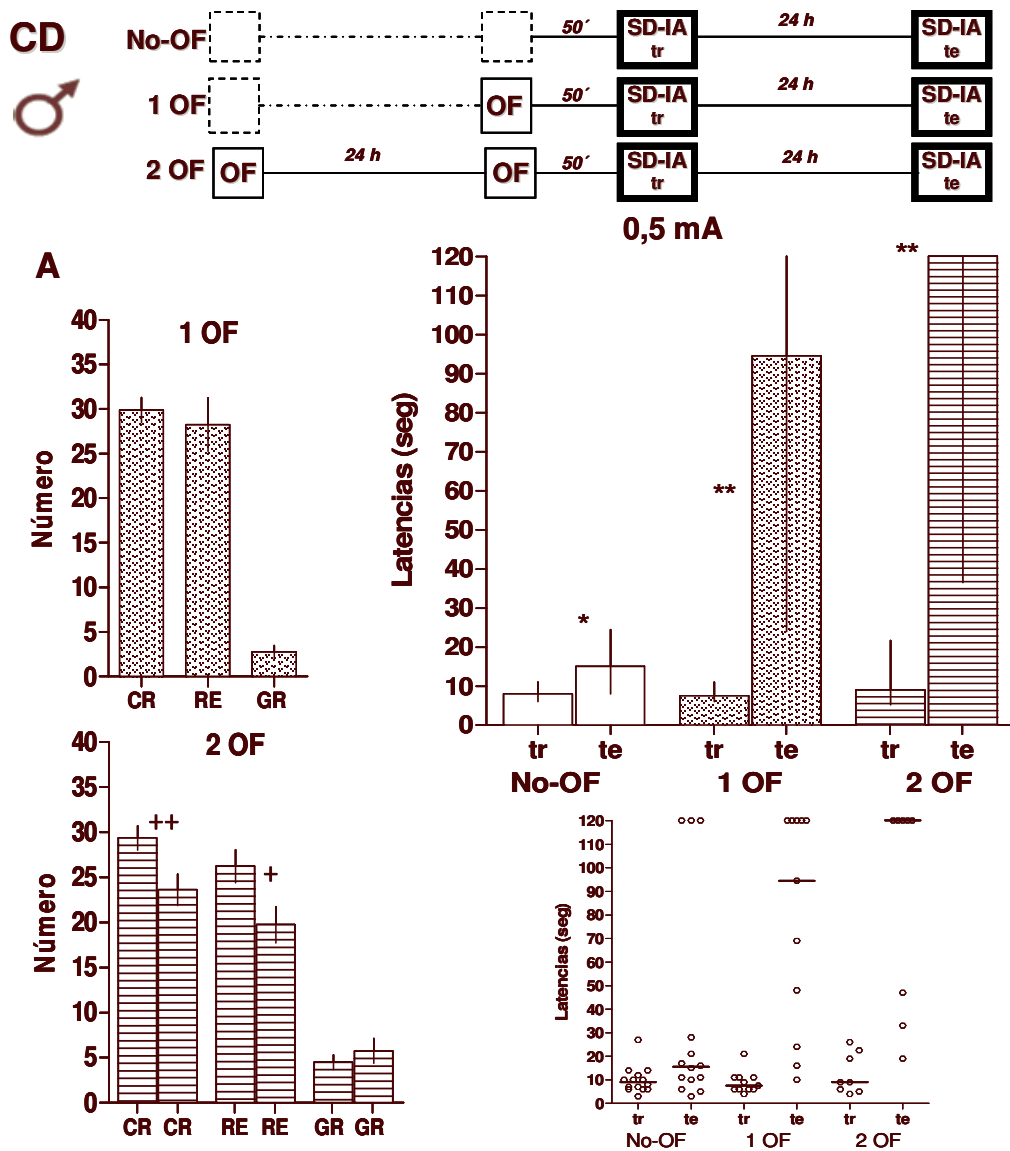


Fig 3.9: Efecto del OF sobre el desempeño en la prueba de SD-IA en animales con entrenamiento "suave" (0,5 mA) durante su periodo de sueño (mantenidos en ciclo luz/oscuridad derecho).

Arriba: Esquema del diseño experimental de los ensayos de comportamiento. Se entrenaron grupos de ratas macho, con el ciclo luz oscuridad derecho, durante su fase de sueño, con un choque de 0,5 mA.

A: Las barras corresponden al desempeño en SD-IA del grupo que no fue expuesto al OF (barras vacías, grupo No-OF, N=13), de otro grupo expuesto a una sesión de campo abierto (barras punteadas, grupo 1 OF, N=11) y de otro grupo expuesto a dos sesiones de campo abierto (barras rayadas, grupo 2 OF, N=8). Las barras representan medianas de latencias de descenso con sus rangos intercuartiles (25; 75).

tr: latencia de entrenamiento; **te:** latencia de test.

Panel inferior: gráfico de *scatter*.

Izquierda: Desempeño en el campo abierto del grupo de los dos grupos de machos que pasaron por esta tarea. Las barras representan medias y error estándar del número de cruces (cr), elevaciones sobre las patas traseras, (*rearings*: re) y acicalamientos (*groomings*: gr).

•Diferencias significativas entre entrenamiento y test; prueba para datos apareados de Wilcoxon (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

+ Diferencias significativas para parámetro correspondiente entre primera y segunda sesión de OF; prueba de t de Student para datos apareados (+ $p < 0,05$; ++ $p < 0,01$).

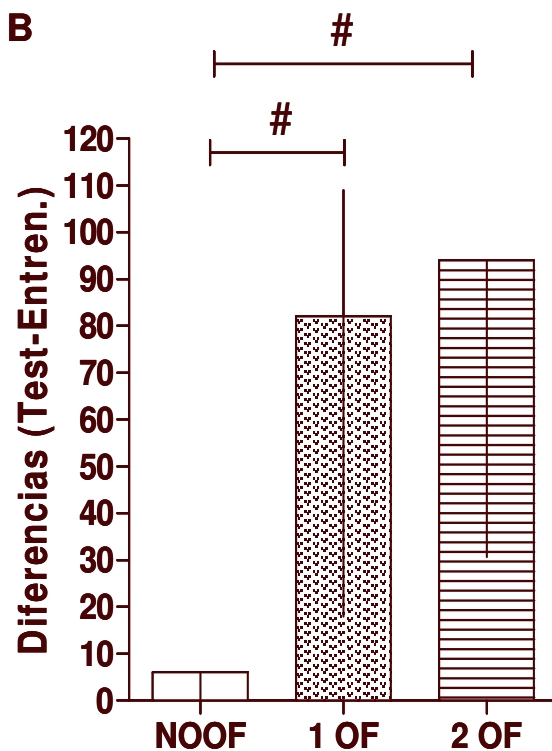


Fig 3.9: Efecto del OF sobre el desempeño en la prueba de SD-IA en animales con entrenamiento “suave” (0,5 mA) durante su período de sueño (mantenidos en ciclo luz/oscuridad derecho).

B: Diferencias de latencias (test-entrenamiento) con sus rangos intercuartiles (25; 75) de los grupos expuestos al OF y No-OF de la parte A de esta figura.

Diferencias significativas entre las diferencias por prueba no pareada de Mann Whitney (# $p < 0,05$).

En el grupo que fue expuesto a 2 OF se observó disminución significativa de las elevaciones sobre los miembros posteriores (*rearings*) ($p < 0,05$, por prueba de t para datos apareados); y una disminución significativa de los cruces ($p < 0,01$, por prueba de t para datos apareados) (fig. 3.9 A; ver gráfico a la izquierda).

La figura 3.9 B es un gráfico de barras de las medianas de las diferencias de latencias (test - entrenamiento) en SD-IA para los tres grupos (No-OF, 1 OF y 2 OF). El grupo que no fue expuesto al campo abierto tuvo un desempeño significativamente más pobre que los grupos que fueron expuestos, ya sea a una o a dos sesiones en el OF ($p < 0,05$ entre todos los grupos, por prueba de Kruskal Wallis, seguido por prueba para muestras no apareadas de Mann Whitney, $p < 0,05$, entre grupo No-OF vs. grupo 1 OF y entre grupo No-OF vs. grupo 2 OF). Es decir que la exposición previa a una o dos sesiones en el campo abierto tuvo un efecto de mejora significativa en el desempeño en SD-IA, en grupos de machos entrenados durante su período de sueño, con un protocolo suave.

Luego se comparó el desempeño en SD-IA, de los grupos de animales mantenidos en ciclo luz/oscuridad derecho e invertido. La fig 3.9 C corresponde a las diferencias de latencias (test - entrenamiento), de los grupos de animales entrenados en condiciones similares, ya sea que se encontraran en su fase de sueño (parte i de la figura, animales en CD), o bien aquellos que se encontraban “despiertos” (parte ii de la figura, animales en CI).

Se muestran aquellos grupos que tuvieron o no exposición previa al campo abierto. Se comparó el desempeño de los grupos No-OF (datos correspondientes a fig 3.6 vs. fig 3.9); el desempeño de los grupos con 1 sesión de OF (datos de fig 3.4 A vs. fig 3.9), así como el de los grupos con 2 OF (datos de fig 3.6 vs. fig 3.9).

La comparación de las latencias durante el entrenamiento evidenció que hubo diferencias significativas entre los animales de ciclo derecho (CD), respecto a los de ciclo invertido, siendo mayores los valores de latencias para los grupos de animales en CD ($p < 0,01$; por prueba de Kruskal Wallis, ANOVA de una vía). En cuanto a los test, en los grupos de animales expuestos a 1 sesión de OF se observó un mejor desempeño de aquellos en CD (en fase de sueño) ($p < 0,05$, por prueba para muestras no apareadas de Mann Whitney). La comparación de las diferencias de latencias entre los grupos que fueron expuestos a dos sesiones de OF, evidenció un mejor desempeño de aquellos animales mantenidos en CD, respecto de los mantenidos en CI ($p < 0,01$, por prueba para muestras no apareadas de Mann Whitney).

A diferencia de los grupos entrenados durante su fase de mayor actividad, los grupos que se encontraban en su fase de sueño (CD) evidenciaron una mejora significativa en SD-IA cuando fueron entrenados con un choque suave, debido a la previa exposición al campo abierto. Los grupos

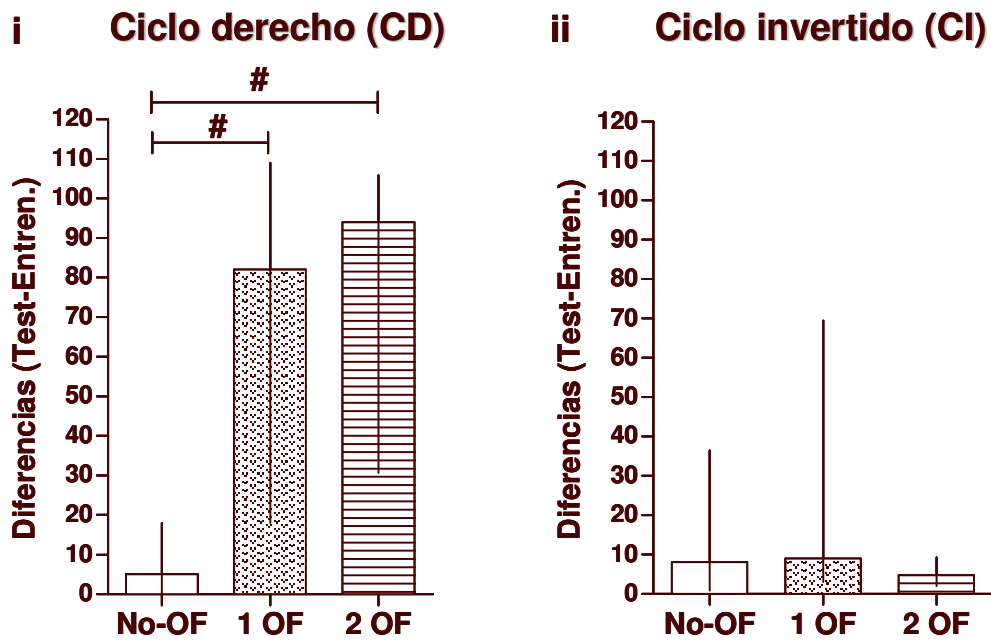


Fig 3.9 C: Desempeño en SD-IA con entrenamiento suave de ratas mantenidas en ciclo de luz/oscuridad derecho (CD) (i) y de aquellas criadas en ciclo invertido (CI) (ii). Todas fueron entrenadas durante el día objetivo.

Las barras representan las medianas de las diferencias de latencias (test-entrenamiento) con sus rangos intercuartiles (25; 75) obtenidas para los animales de las **figuras 3.5 A y B (ii), 3.9 B (i)** de los grupos expuestos a dos sesiones de campo abierto (2 OF, barras rayadas), grupos expuestos a una sesión de campo abierto (1 OF, barras punteadas) y grupos que no fueron expuestos al OF (No-OF, barras vacías).

que fueron entrenados en su fase de sueño demoraron más tiempo (tuvieron valores de latencias más elevados) en descender de la plataforma durante el entrenamiento en SD-IA con respecto a los grupos entrenados durante su fase de mayor actividad.

Efecto del OF sobre el desempeño en SD-IA en animales con entrenamiento “fuerte” (de 0,75 mA) durante su período de sueño (en ratas mantenidas en ciclo luz/ oscuridad derecho)

En base a los resultados obtenidos previamente en animales cirios en CI, nos propusimos investigar la posible influencia de la luz y/o del ritmo circadiano sobre el efecto que ejerce el OF sobre la memoria de SD-IA, cuando se entrena con una intensidad de choque fuerte.

Dos grupos de machos se entrenaron en SD-IA con un choque de 0,75 mA, y se evaluó la influencia de la exposición previa a dos sesiones en el OF, realizadas 24 h y 1 h 30 min antes del entrenamiento en SD-IA (ver esquema del diseño del ensayo en la parte superior de la figura 3.10 A). Nuevamente el test de SD-IA se realizó a las 24 h del entrenamiento.

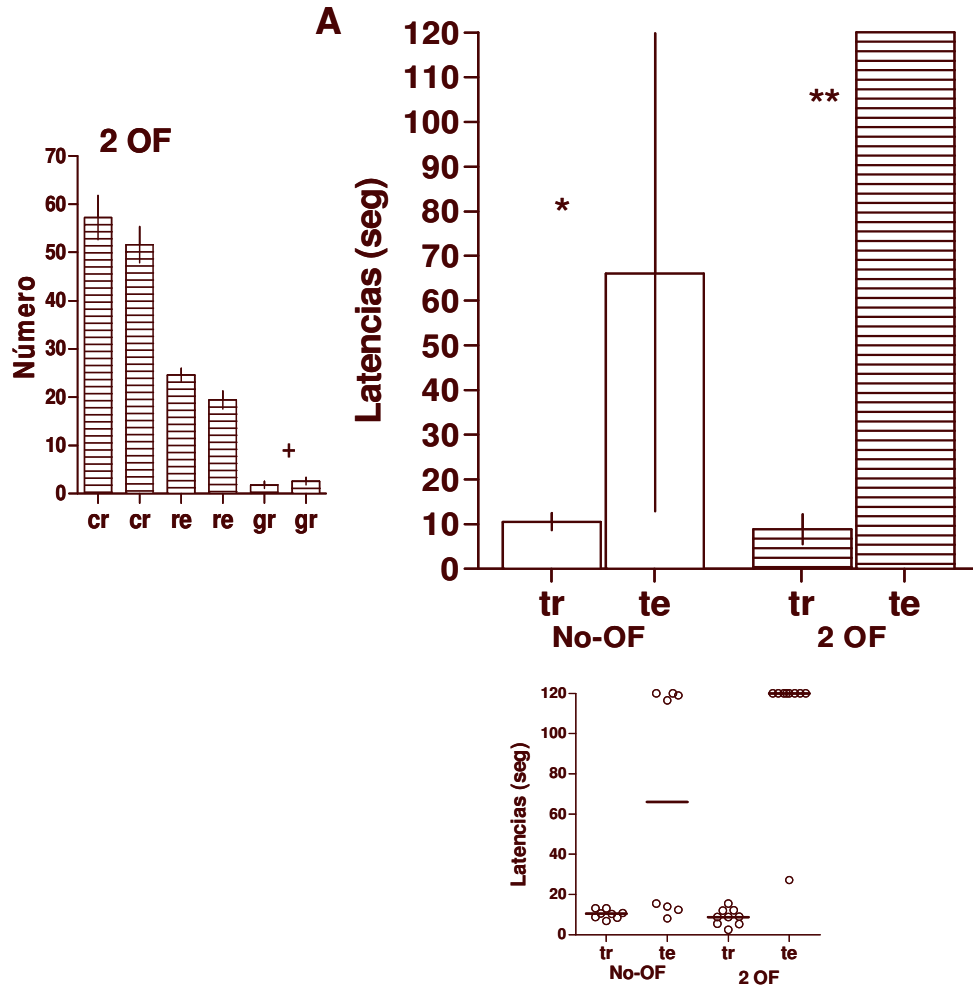
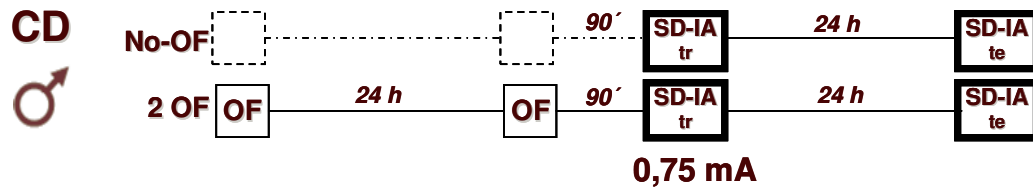


Fig 3.10: Efecto del OF sobre el desempeño en SD-IA en animales con entrenamiento “fuerte” (de 0,75 mA) durante su periodo de sueño (en ratas mantenidas en ciclo luz/oscuridad derecho).

Arriba: Esquema del diseño experimental de los ensayos de comportamiento. Se entrenaron grupos de ratas macho, con el ciclo luz oscuridad derecho, durante su fase de sueño, con un choque de 0,75 mA.

A: Las barras corresponden a las medianas con sus rangos intercuartiles (25; 75) de latencias de descenso en SD-IA del grupo que no fue expuesto al OF (barras vacías, grupo No-OF, N=8), y del grupo expuesto a dos sesiones de campo abierto (barras rayadas, grupo 2 OF, N=9).

tr: latencia de entrenamiento; **te:** latencia de test.

Panel inferior: gráfico de *scatter*.

El gráfico a la izquierda corresponde al desempeño en el campo abierto del grupo de los dos grupos de machos que pasaron por esta tarea. Las barras representan medias y error estándar del número de cruces (cr), elevaciones sobre las patas traseras, (*rearings*: re) y acicalamientos (*groomings*: gr).

Diferencias significativas entre entrenamiento y test; prueba para datos apareados de Wilcoxon ($p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

+ Diferencias significativas para parámetro correspondiente entre primera y segunda sesión de OF; prueba de t de Student para datos apareados (+ $p < 0,05$).

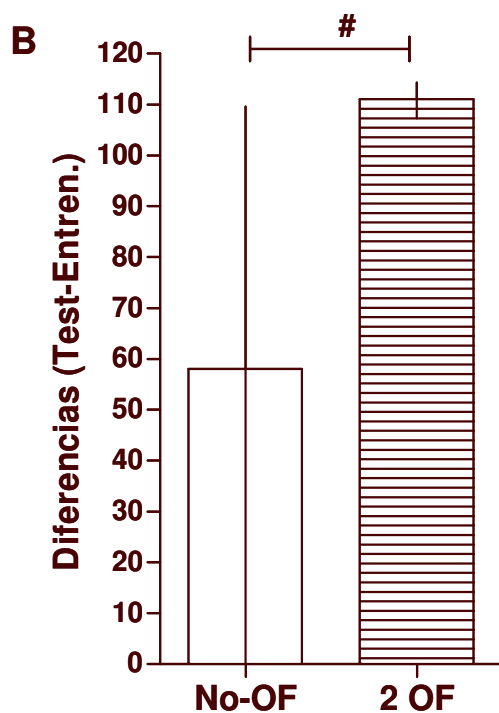


Fig 3.10: Efecto del OF sobre el desempeño en SD-IA en animales con entrenamiento “fuerte” (de 0,75 mA) durante su periodo de sueño (en ratas mantenidas en ciclo luz/oscuridad derecho).

B: Diferencias de latencias (test-entrenamiento) con sus rangos intercuartiles (25; 75) de los grupos OF y No-OF de la parte A de esta figura.

Diferencias significativas entre las diferencias por prueba de comparaciones múltiples de Dunns (# $p < 0,05$).

La figura 3.10 corresponde al desempeño en SD-IA de los grupos de machos entrenados durante su período de sueño. La parte A de la figura muestra un gráfico de barras que representa las medianas y desvíos intercuartiles de las latencias de descenso de la plataforma, para el grupo que no fue expuesto al campo abierto (grupo No-OF, barras vacías) y para el grupo que fue expuesto a dos sesiones previas en el campo abierto (grupo 2 OF, barras rayadas). No hubo diferencias significativas en las latencias de entrenamiento en SD-IA entre los grupos ($p > 0,05$, por prueba para muestras no apareadas de Mann Whitney). Las latencias del test fueron significativamente diferentes y mayores respecto a las del entrenamiento, tanto para el grupo que no fue expuesto al OF, como para aquel expuesto a dos sesiones de OF ($p < 0,05$ para el grupo No-OF [N=8]; $p < 0,01$; para el grupo 2 OF [N=9]; por prueba para muestras apareadas de Wilcoxon); es decir que ambos grupos alcanzaron el criterio de aprendizaje de la tarea, evidenciándose la formación de LTM.

La figura 3.10 B es un gráfico de barras de las diferencias de latencias (test - entrenamiento) de los dos grupos: No-OF y 2 OF, respectivamente. El grupo de ratas expuestas a dos sesiones de OF tuvo un desempeño significativamente mejor al del grupo que no fue expuesto al OF ($p < 0,05$ en la comparación de las diferencias de latencias [test-entrenamiento], prueba de Mann Whitney). Es decir que la exposición previa a dos sesiones de campo abierto mejoró el desempeño en SD-IA, en grupos de animales que se encontraban en su período de sueño y que recibieron un entrenamiento “fuerte”.

Luego se comparó el desempeño en SD-IA de los grupos de animales criados en CD vs. los mantenidos en CI. La fig 3.10 C corresponde a la comparación de las diferencias de latencias (test - entrenamiento), entre los grupos que se consideran en su fase de sueño (parte i de la figura, animales en CD), y aquellos que se encuentran “despiertos” (parte ii de la figura, animales en CI). Se comparó el desempeño de los grupos mantenidos en CD con respecto a aquellos mantenidos en CI, luego de que fueran expuestos a dos sesiones de OF (grupos 2 OF), o de los que no fueran expuestos al OF (grupos No-OF) (datos de fig 3.8 vs. fig 3.10 A). No hubo diferencias significativas para ninguna de las comparaciones de diferencias de latencias realizadas ($p > 0,05$, por prueba para muestras no apareadas de Mann Whitney). (fig 3.10 C). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la comparación de las latencias durante la sesión de entrenamiento evidenció que hubo diferencias significativas entre los animales de ciclo derecho (CD), respecto a los de ciclo invertido, siendo mayores los valores de latencias de entrenamiento para los grupos de animales en CD ($p < 0,001$; por prueba de Kruskal Wallis, ANOVA de una vía).

En resumen: En forma similar a lo que ocurrió en los animales en CI (que se encontraban en su fase de vigilia al realizar la SD-IA), los grupos que se encontraban en su fase de sueño evidenciaron un efecto de facilitación de la memoria de SD-IA con un entrenamiento fuerte, por la previa exposición a dos sesiones de OF. También debe tenerse en cuenta que los grupos que fueron

entrenados en su fase de sueño, demoraron más tiempo en descender de la plataforma durante el entrenamiento en SD-IA, con respecto a los grupos entrenados durante su fase de mayor actividad.

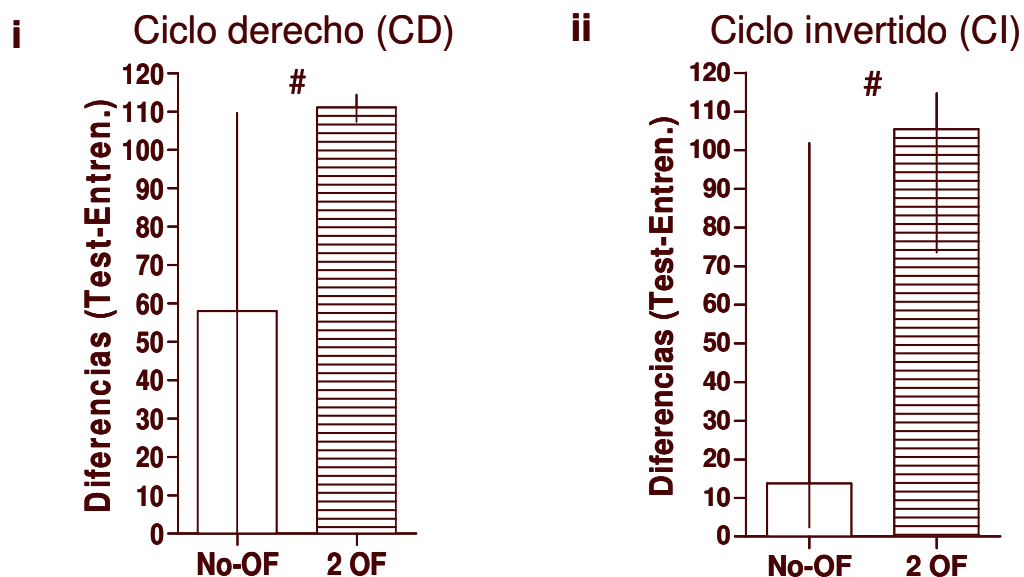


Fig 3.10 C: Desempeño en SD-IA con entrenamiento fuerte de ratas mantenidas en ciclo de luz/oscuridad derecho (CD) (i) y de aquellas criadas en ciclo invertido (CI) (ii). Todas fueron entrenadas durante el día objetivo.

Las barras representan las medianas de las diferencias de latencias (test-entrenamiento) con sus rangos intercuartiles (25; 75) obtenidas para los animales de las **figuras 3.10 A, 3.8** de los grupos expuestos a dos sesiones de campo abierto (grupos 2 OF, barras rayadas) y grupos que no fueron expuestos al OF (grupos No-OF, barras vacías).

Desempeño en el OF de las ratas criadas con ciclo de luz/oscuridad derecho (CD) vs. aquellas criadas con ciclo invertido (CI)

En las ratas la luz tiene un efecto de disminución de la actividad locomotora [278; 279; 362; 363]. Nos propusimos evaluar si los animales criados con ciclo derecho (CD) (que se encuentran en su fase de sueño) se diferencian en el desempeño en el campo abierto, de aquellos que se encuentran su fase de vigilia (ciclo invertido: CI).

Se observó el desempeño de dos grupos de ratas macho en CD y de dos grupos en CI, que pasaron o no por dos sesiones de campo abierto de 3 min cada una, separadas entre sí por 24 h. Como habitualmente se hace, en el OF se registraron los cruces, elevaciones sobre los miembros posteriores y acicalamientos.

La tabla 3.4 corresponde al desempeño en el campo abierto, tanto de los grupos mantenidos en CD, como de aquellos mantenidos en CI (se expresa la media y error estándar para los distintos

parámetros registrados). Se observó disminución significativa del número de cruces y de las elevaciones sobre los miembros posteriores, para los animales mantenidos en CD ($p < 0,05$ para las elevaciones y $p < 0,01$ para los cruces, por prueba de t), así como para aquellos mantenidos en CI ($p < 0,01$ para las elevaciones y $p < 0,001$ para los cruces, por prueba de t). Por lo tanto podemos concluir que los animales en CD, así como aquellos en CI, se comportaron como habituados al OF, ya que reconocieron la arena, lo que se evidenció por la disminución en los parámetros que denotan exploración, en la segunda sesión de OF.

Tabla 3.4: Desempeño en el OF de ratas mantenidas en ciclo de luz/oscuridad derecho (CD) y de aquellas mantenidas en ciclo invertido (CI) (ratas que se encuentran en su fase de sueño vs. aquellas que se encuentran despiertas. Todas fueron entrenadas durante el día objetivo).

Campo Abierto (OF)		Cruces		Elevaciones		Acicalamientos	
		1ra sesión	2da sesión	1ra sesión	2da sesión	1ra sesión	2da sesión
Ciclo derecho	Media	44,83 +++	39,17 +++	25,33* +++	19,56* +	3,00++	4,00+++
	Error	±4,20	± 4,00	± 1,10	± 1,32	± 0,62	± 0,80
Ciclo invertido	Media	75,76*** +++	64,27*** +++	19,48** +++	16,39** +	1,27++	0,89+++
	Error	± 2,84	± 3,52	± 0,94	± 0,68	± 0,25	± 0,27

La tabla muestra las medias y error estándar y desvío del número de cruces (cr), elevaciones sobre las patas traseras (*rearings*: re) y acicalamientos (*groomings*: gr) de cinco grupos de ratas distintos para cada ciclo, de la primera o segunda sesión de campo abierto.

Diferencias significativas del parámetro durante la primera y segunda sesión, por prueba apareada de t ($p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

+Diferencias significativas del parámetro durante la misma sesión entre animales en CD y CI, por prueba de t (+ $p < 0,05$; ++ $p < 0,01$; +++ $p < 0,001$).

Tanto en la primera, como en la segunda sesión de OF, el número de cruces totales fue significativamente mayor en los animales mantenidos en CI, respecto de aquellos mantenidos en CD ($p < 0,001$ tanto para la primera, como para la segunda sesión de OF, por prueba de t). En cambio, el número de elevaciones sobre los miembros posteriores fue significativamente menor durante ambas sesiones, en los animales mantenidos en CI respecto de aquellos mantenidos en CD ($p < 0,001$ para la primera sesión y $p < 0,05$ para la segunda sesión de OF, por prueba de t). Hubo diferencias significativas en el número total de acicalamientos, siendo mayores para los animales mantenidos en CD respecto de aquellos mantenidos en CI ($p < 0,001$ para la segunda sesión y $p < 0,01$ para la primera sesión de OF, por prueba de t).

Es decir, la diferencia más sobresaliente observada entre los animales en CD con respecto a los mantenidos en CI, es la menor exploración horizontal y una mayor exploración vertical.

III. 4. EVITACIÓN INHIBITORIA: PASAJE DE COMPARTIMIENTO EN UN PASO (STEP THROUGH)

En la versión de la tarea de evitación inhibitoria de descenso desde una plataforma (SD-IA), el animal es colocado en una plataforma angosta y elevada, de la cual suele descender muy rápidamente, dificultando la asociación entre el contexto (CS) y el estímulo aversivo (US) [364]. Además los valores de medianas de latencias suelen ser muy bajos, y la comparación de las latencias de test y entrenamiento dan valores cercanos al límite de significación estadística, para choques de 0,5 y 0,6 mA.

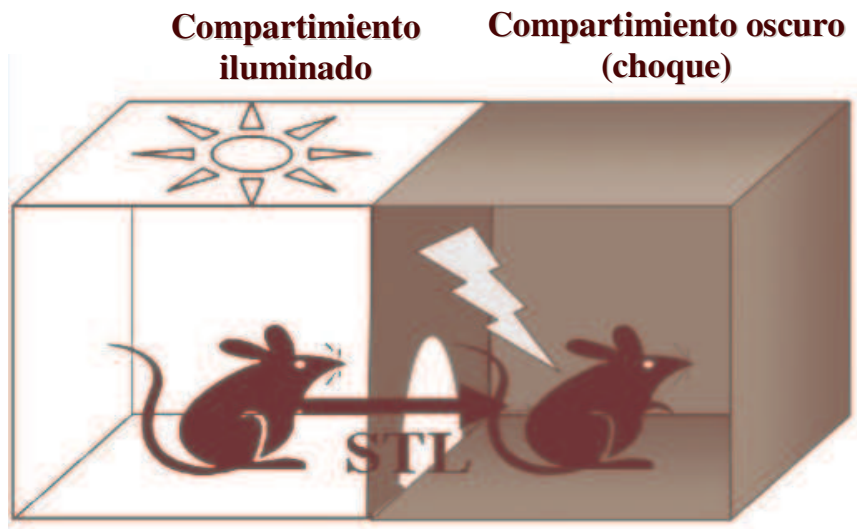


Figura esquemática de la tarea de evitación inhibitoria por pasaje de compartimiento (ST-IA)

Por esos motivos y tratando de dilucidar si los hallazgos descritos en SD-IA podían generalizarse para las tareas asociativas con componentes espaciales y aversivos, del tipo de la evitación inhibitoria, decidimos poner a punto la versión que consiste en evitar el pasaje de un compartimiento iluminado a otro oscuro (preferido), en un paso (*step through*) (ST-IA). En esta tarea (Mat. y Met, pag 58) se supone que los 15 segundos previos a que se abra la puerta-guillotina, así como el espacio “más confortable” en que se encuentra el animal, servirían para independizar relativamente la prueba de la “novedad” que representa la primera exposición a la caja de entrenamiento, por un lado, así como de la manipulación por el experimentador, tal vez manteniendo más bajo el nivel de estrés generado por dicha manipulación, por el otro. Todo ello permitiría obtener valores de latencias de test más altos, comparados a los obtenidos en SD-IA para igual intensidad de choque.

Efecto de la intensidad del estímulo sobre la memoria de la prueba de ST-IA

Para la puesta a punto de la prueba, ratas machos y hembras con manipulación sistemática desde el destete, recibieron distintos choques durante el entrenamiento. A todos los grupos se les realizó el test a las 24 h en ausencia de choque eléctrico. Ninguno de los grupos pasó previamente por el campo abierto.

La figura 3.11 muestra gráficos de barras que representan las latencias de ingreso al compartimiento oscuro, para machos (3.11 A) y hembras (3.11 B) que fueron entrenados en ST-IA con distintas intensidades de choque. En primer lugar, los machos se entrenaron en ST-IA con 0,4; 0,5, 0,6 o 0,75 mA. Luego, en base a esos resultados se entrenaron hembras con 0,4 o 0,5 mA. No se encontraron diferencias significativas en las latencias de entrenamiento entre los distintos grupos de machos ni de hembras ($p > 0,05$; por prueba de Kruskal Wallis, ANOVA de una vía). Tanto machos como hembras aprendieron la tarea, evidenciando formación de una LTM para todas las intensidades de estímulo utilizadas; es decir que las latencias del test fueron significativamente mayores que las del entrenamiento ($p < 0,05$; para machos entrenados con 0,6 mA [N=7]; $p < 0,01$ para los entrenados con 0,4 mA [N=13], con 0,5 mA [N=18] y con 0,75 mA [N=10] y para hembras entrenadas con 0,4 mA [N=17]; $p < 0,001$ para hembras entrenadas con 0,5 mA [N=13]; por prueba para muestras apareadas de Wilcoxon). Los valores de las medianas de las latencias del test para las hembras, fueron aparentemente más altos que aquellos para los machos, pero cuando se compararon estadísticamente las diferencias de latencias (test-entrenamiento) para igual intensidad de choque, no hubo diferencias significativas entre los grupos ($p > 0,05$ test de t para muestras no pareadas, Mann Whitney test).

Los grupos de machos evidenciaron coherencia entre el aumento de las latencias en el test y el aumento de la intensidad de choque, sin embargo no hubo correlación significativa, si bien el análisis estadístico arrojó un valor de p cercano al límite de significación ($p = 0,083$, y coeficiente de Spearman $r = 1$, correlación no paramétrica entre diferencias de latencia y la intensidad de choque).

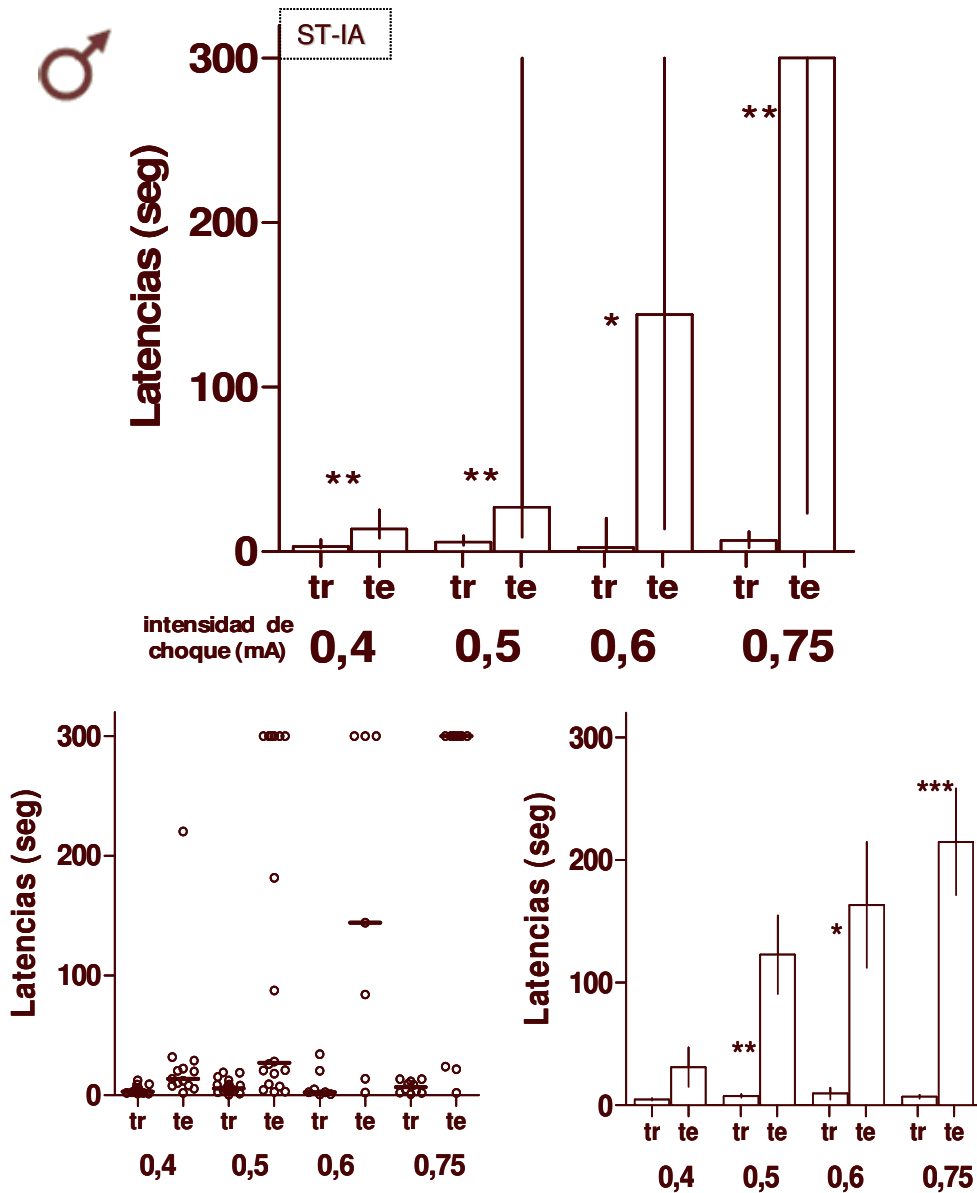


Fig 3.11 A: Efecto de la intensidad del estímulo sobre el aprendizaje y la memoria de la prueba de ST-IA: grupos de machos.

Diagrama de barras: Las barras representan las medianas con rangos intercuartiles (25; 75) de las latencias de ingreso al compartimiento oscuro de machos, que recibieron manipulación sistemática desde el destete, entrenados con distintas intensidades de choque (0,4; 0,5; 0,6 y 0,75 mA, N= 13; 18; 7 y 10 respectivamente) en ST-IA.

tr: latencia de entrenamiento; **te:** latencia de test.

Paneles inferiores: gráfico de *scatter* (inferior izquierdo); y representación paramétrica de los datos (media y error estándar, abajo derecha).

Diferencias significativas por test pareado de Wilcoxon ($p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

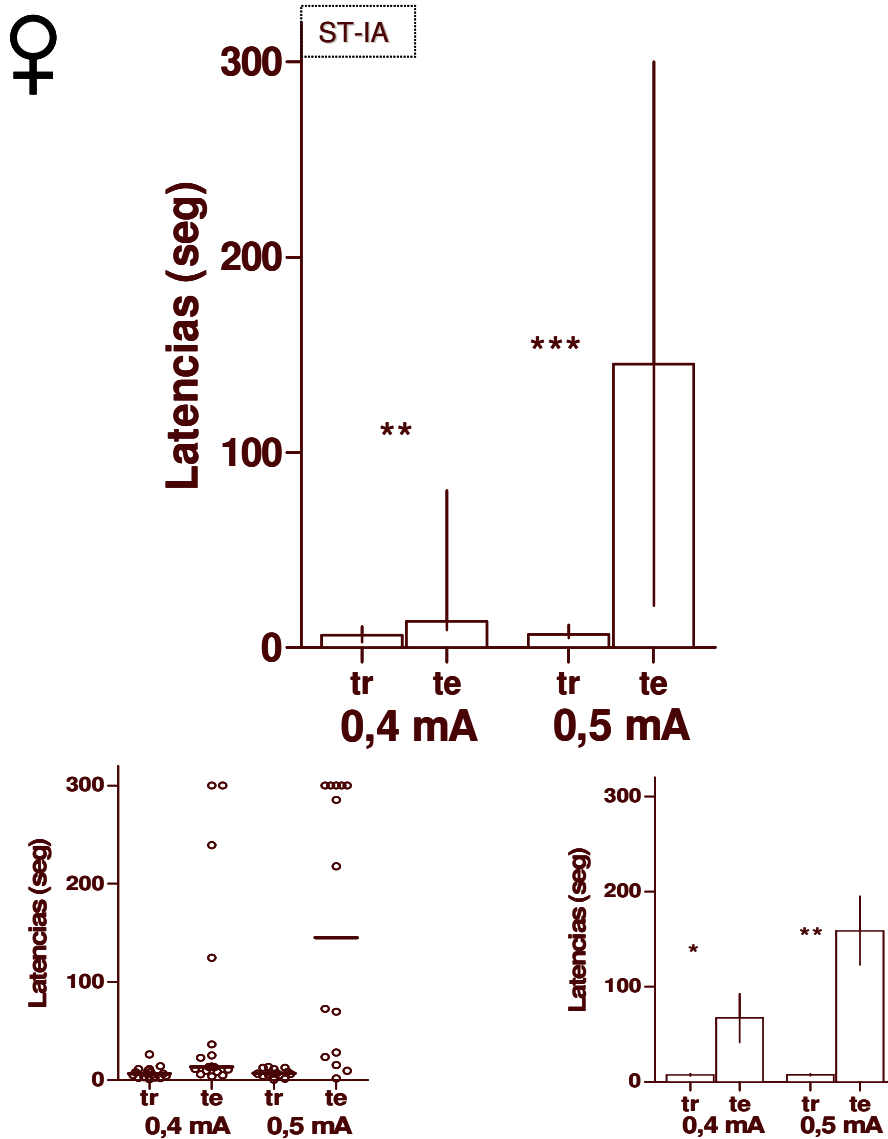


Fig 3.11. B: Efecto de la intensidad del estímulo sobre el aprendizaje y la memoria de la prueba de ST-IA: grupos de hembras.

Diagrama de barras: Las barras representan las medianas con rangos intercuartiles (25; 75) de las latencias de ingreso al compartimiento oscuro de hembras, que recibieron manipulación sistemática desde el destete, entrenadas con dos intensidades de choque (0,4 y 0,5 mA, N=17 y 13 respectivamente).

tr: latencia de entrenamiento; te: latencia de test.

Paneles inferiores: gráfico de *scatter* (inferior izquierdo); y representación paramétrica de los datos (media y error estándar, abajo derecha).

*Diferencias significativas por test pareado de Wilcoxon (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Efecto de la manipulación de los animales sobre el desempeño en la prueba de ST-IA

Del mismo modo que se hizo con la tarea de SD-IA, evaluamos el desempeño en ST-IA de machos y hembras que no recibieron manipulación sistemática (*handling*) (excepto por la manipulación mínima que se realizó periódicamente al limpiar la jaula), entrenados con una intensidad de choque de 0,5 mA. Se realizó el test a las 24 h, sin aplicar choque eléctrico.

La figura 3.12 muestra gráficos de barras que representan las latencias de ingreso al compartimiento oscuro, correspondientes al desempeño de ratas hembras (fig 3.12 A y B) y machos (3.12 C) cuando recibieron o no manipulación sistemática. No hubo diferencias significativas en las latencias de entrenamiento entre los grupos de machos y hembras ($p > 0,05$ por prueba de Kruskal Wallis, ANOVA de una vía). Es decir que, como era de esperar, el desempeño durante la sesión de entrenamiento (antes de haber recibido el choque eléctrico) fue similar para ambos grupos. Tanto los grupos de machos como los de hembras alcanzaron el criterio de aprendizaje y evidenciaron una memoria de larga duración con una intensidad de choque de 0,5 mA, ya que las latencias del test fueron significativamente mayores que las del entrenamiento ($p < 0,05$ para el grupo de las hembras sin manipulación sistemática [N=11]; $p < 0,01$ para los grupos de machos con y sin manipulación [N=14 y 11 respectivamente]; $p < 0,001$ para el grupo de hembras con manipulación [N=14]; por prueba para muestras apareadas de Wilcoxon). La comparación de las diferencias de latencias (test-entrenamiento) del grupo de machos con el grupo de hembras que no recibieron manipulación sistemática, no fue estadísticamente significativa ($p > 0,05$; por prueba para muestras no apareadas de Mann Whitney).

Para evaluar el efecto de la manipulación sistemática se compararon los grupos sin manipulación de estos ensayos (figura 3.12 A y C), con aquellos entrenados con igual intensidad de choque, pero que recibieron manipulación sistemática desde el destete, correspondientes a los ensayos que se representan en las figuras 3.11 A y 3.11 B entrenados con 0,5 mA. No hubo diferencias significativas entre las diferencias de los grupos de machos con manipulación periódica, comparados contra aquellos sin manipulación periódica ($p > 0,05$; por prueba para muestras no apareadas de Mann Whitney). En cambio, hubo diferencias significativas en la comparación de las diferencias de los grupos de hembras con y sin manipulación sistemática, entrenadas con 0,5 mA ($p < 0,05$; por prueba para muestras no apareadas de Mann Whitney) (Fig 3.12 B). En este caso, el grupo que recibió manipulación periódica desde el destete mostró un mejor desempeño en esta tarea. Entonces, la manipulación sistemática desde el destete, mostró tener un efecto positivo en el desempeño de las hembras, que no fue estadísticamente significativo en los machos (al menos para las intensidades de choque utilizadas y en las condiciones de estos ensayos). Siguiendo la misma línea de razonamiento que para SD-IA, 0,5 mA constituiría un estímulo supra-umbral para esta ST-IA, ya que el umbral estaría cerca de los 0,3 mA (especialmente en las hembras que son un poco más pequeñas que los machos de igual camada); es posible entonces, que este constituya un

estímulo relevante comportamentalmente; y de modo similar a lo que ocurrió en SD-IA con un estímulo supraumbral elevado, la manipulación sistemática previa facilite la memoria de la ST-IA. Sin embargo, como en el caso de los animales utilizados en SD-IA, también en estos ensayos continuamos con la manipulación sistemática, ya que la experiencia de los entrenadores permite concluir que simplifica la necesaria manipulación de las ratas durante el ensayo de comportamiento.

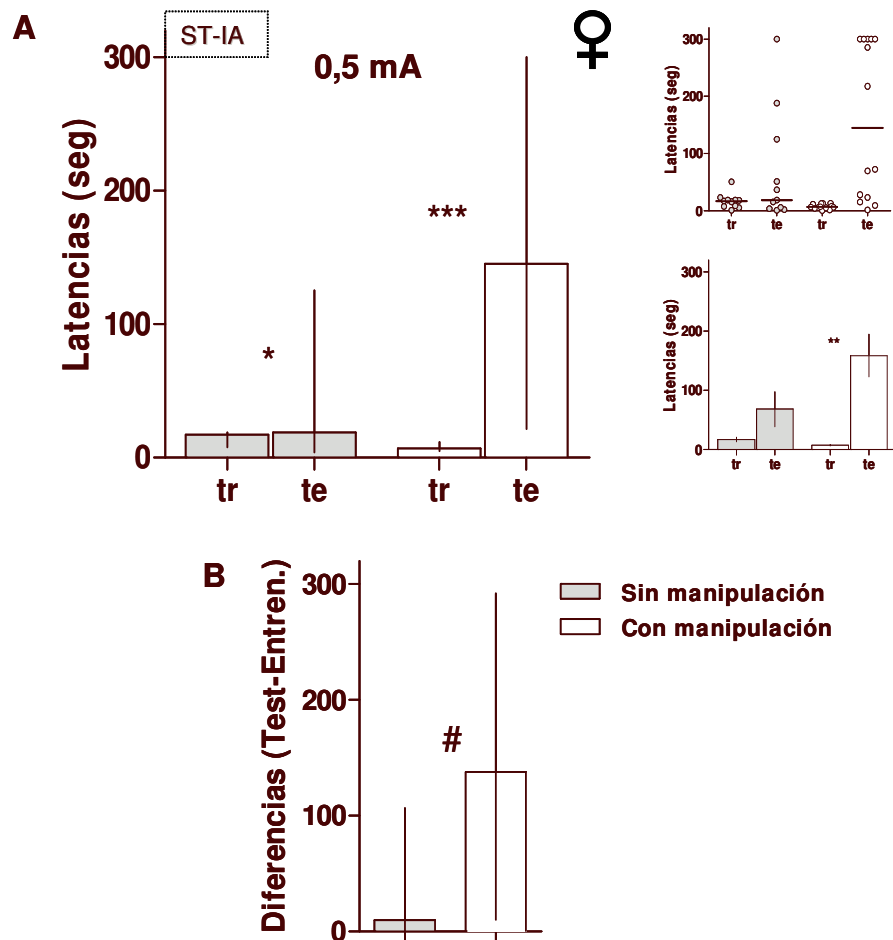


Fig 3.12 A y B: Efecto de la manipulación de ratas hembra sobre el desempeño en la prueba de ST-IA.

A: Las barras representan las medianas con rangos intercuartiles (25; 75) de las latencias de ingreso al compartimiento oscuro de hembras entrenadas con intensidad de choque de 0,5 mA, que recibieron manipulación sistemática desde el destete (barras grises; N=14) y que no recibieron esta manipulación (barras blancas, N=11).

tr: latencia de entrenamiento; te: latencia de test.

Paneles laterales a la derecha: gráfico de *scatter* (arriba); y representación paramétrica de los datos (media y error estándar, abajo).

B: Las barras corresponden a las diferencias de latencias (test-entrenamiento) con sus rangos intercuartiles (25; 75) de los grupos de la parte A de la figura.

Diferencias significativas por test pareado de Wilcoxon ($p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

Diferencias significativas entre las diferencias de latencias por prueba para muestras no pareadas de Mann Whitney. (# $p < 0,05$)

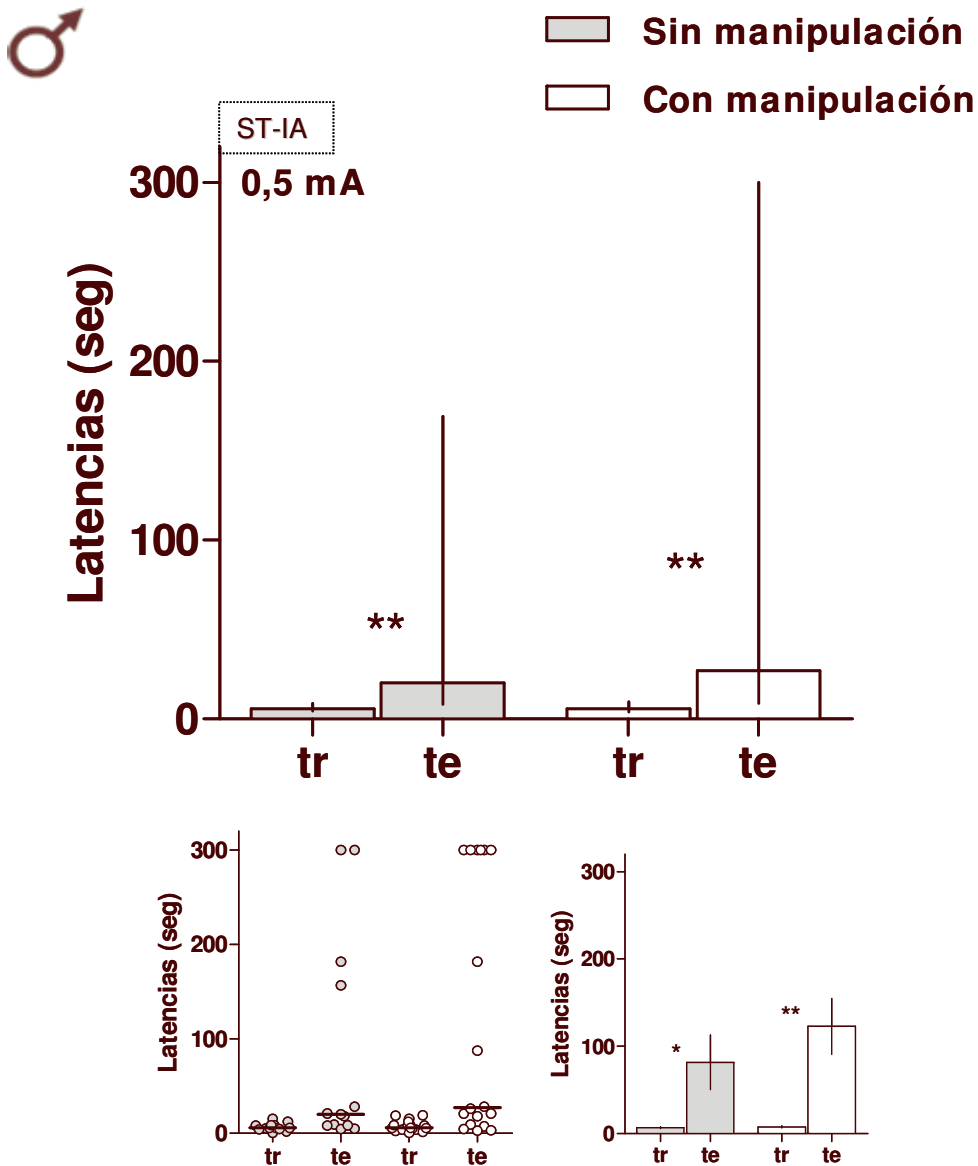


Fig 3.12 C: Efecto de la manipulación de los animales sobre el desempeño en la prueba de ST-IA: grupos de machos.

Diagrama de barras: Las barras representan las medianas con rangos intercuartiles (25; 75) de latencias de ingreso al compartimiento oscuro de ratas macho entrenadas con intensidad de choque de 0,5 mA, que recibieron manipulación sistemática (barras grises, N=14) y que no recibieron esta manipulación (barras blancas, N=11). **tr:** latencia de entrenamiento; **te:** latencia de test.

Paneles inferiores: gráfico de *scatter* (inferior izquierdo); y representación paramétrica de los datos (media y error estándar, abajo derecha).

* Diferencias significativas por test pareado de Wilcoxon (** $p < 0,01$).

Efecto de dos exposiciones al OF sobre el desempeño en ST-IA en animales con entrenamiento “suave” (0,5 mA)

Nos propusimos evaluar el efecto de la la exposición previa a dos sesiones de OF de 3 min cada una (según el mismo diseño experimental ya descrito en el capítulo III, sección 2, para la tarea de SD-IA) en dos grupos de machos y dos grupos de hembras entrenados en la ST-IA con un choque de 0,5 mA (ver esquema del diseño experimental de la fig 3.13).

La figura 3.13 muestra gráficos de barras de las medianas y sus desvíos intercuartiles, de las latencias de descenso durante el entrenamiento y durante el test en ST-IA: las barras rayadas corresponden a los grupos que fueron previamente expuestos a dos sesiones de OF (grupo 2 OF), mientras que las barras vacías corresponden a animales que no fueron expuestos al OF (grupo No-OF). No hubo diferencias significativas en las latencias de entrenamiento entre los grupos ($p > 0,05$, por prueba para muestras no apareadas de Mann Whitney). Las latencias de test fueron significativamente diferentes y mayores respecto de las del entrenamiento para los cuatro grupos analizados ($p < 0,001$ para todos los grupos: hembras 2 OF [N=16] y No- OF [N=17] y machos No-OF [N=18] y 2 OF [N=17]; por prueba para muestras apareadas de Wilcoxon). Es decir que los grupos de ratas expuestas previamente a las dos sesiones en el OF, como aquellas que no tuvieron esta exposición al OF (No-OF), alcanzaron el criterio de aprendizaje de la tarea, expresando una LTM de la ST-IA. A su vez, las diferencias de latencias (test-entrenamiento) de los grupos que fueron expuestos a 2 OF respecto de aquellos que no tuvieron esta exposición, tanto para el caso de los machos como de las hembras, no fueron estadísticamente diferentes ($p > 0,05$, grupo OF vs. grupo No-OF por prueba para muestras no apareadas de Mann Whitney). Es decir que la exposición a dos sesiones en el OF, previamente al entrenamiento suave en ST-IA no produjo cambios significativos en la retención y LTM de esta tarea.

En la segunda sesión en el OF, las hembras tuvieron disminución significativa del número de elevaciones sobre los miembros posteriores ($p < 0,05$, por prueba de t para datos apareados, ver pie de fig 3.13).

En conclusión, la exposición al OF (dos sesiones de 3 min cada una) previa al entrenamiento en ST-IA, con intensidad de choque de 0,5 mA, no dio lugar a una modificación significativa en el desempeño en esta última tarea, tanto para el caso de los machos, como para el caso de las hembras.

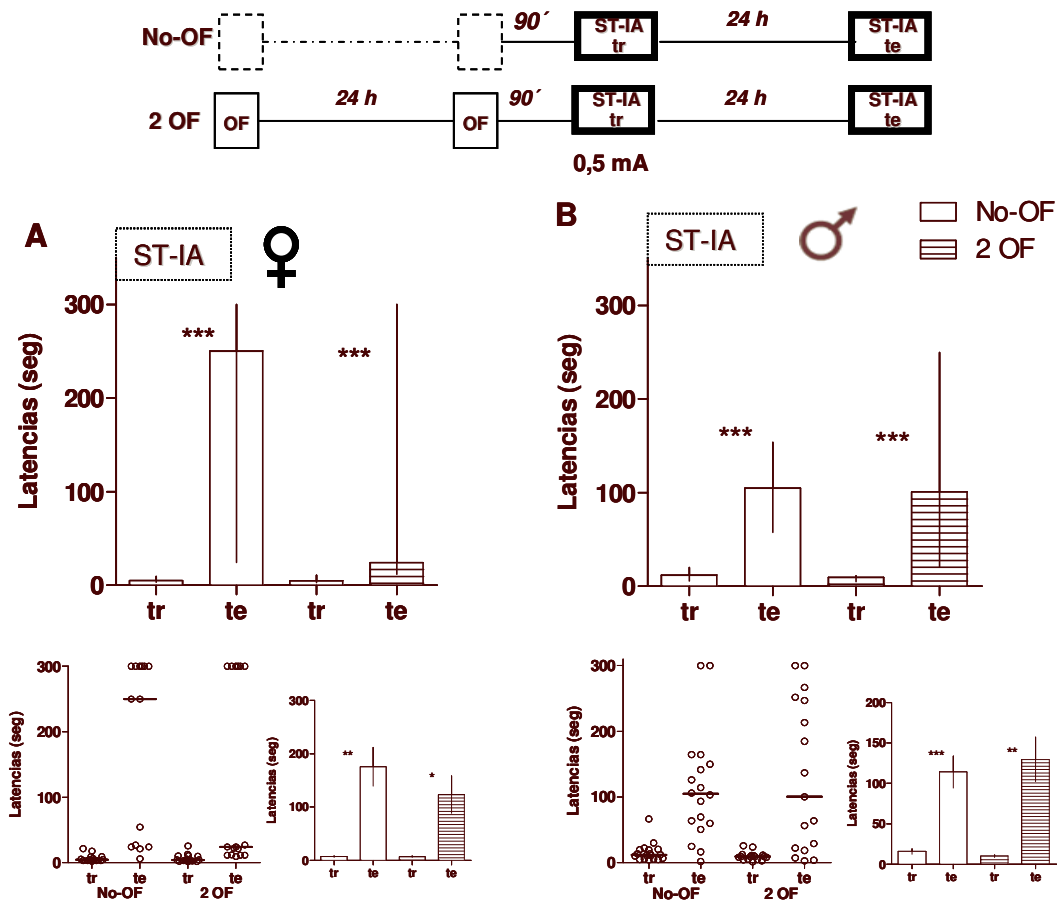


Fig 3.13: Efecto de dos exposiciones al OF sobre el desempeño en ST-IA en animales entrenados con 0,5 mA.

Arriba: Esquema del diseño experimental para evaluar el efecto de la previa exposición al OF en el desempeño de la SD-IA.

A y B: Gráfico de barras que representa las medianas con sus rangos intercuartiles (25; 75) de latencias de descenso de dos grupos de ratas que recibieron manipulación sistemática, hembras (A) y dos grupos de machos (B): los grupos 2 OF fueron previamente entrenados en dos sesiones de campo abierto (barras rayadas) [hembras N= 16, machos N=17], y los grupos No-OF (barras vacías) no fueron expuestos al campo abierto [hembras N= 17, machos N=18].

Paneles inferiores: gráfico de *scatter* (inferior izquierdo; y representación paramétrica de los datos (media y error estándar, abajo derecha).

Campo abierto: Hembras: el número de cruces y elevaciones fueron significativamente menores en la segunda sesión de OF (media de cruces: 1ra sesión: $92,00 \pm 2,86$; 2da sesión: $68,54 \pm 6,11$ media elevaciones: 1ra sesión $33,69 \pm 1,84$; 2da sesión $25,38 \pm 2,61$). Los machos no tuvieron disminución significativa para ninguno de los parámetros del OF.

*Diferencias significativas entre entrenamiento y test; prueba para datos apareados de Wilcoxon (***) $p < 0,001$.

Capítulo IV

ENSAYOS FARMACOLÓGICOS

PARTE II

IV.1 MODULACIÓN DE LA MEMORIA DE EVITACIÓN INHIBITORIA POR EXPOSICIÓN A UN CAMPO ABIERTO: PARTICIPACIÓN DE LA TRANSMISIÓN MUSCARÍNICA.

Efectos del antagonista muscarínico escopolamina.

La SD-IA involucra un tipo de aprendizaje asociativo que se adquiere en una sola sesión de entrenamiento, por medio de la activación de varias estructuras cerebrales tales como la amígdala, el hipocampo y distintas estructuras corticales, que se activan en respuesta a diversos estímulos sensoriales, entre los que se encuentran percepciones visuales y espaciales, dolor y miedo [23; 29]. Ha sido reportado que en el hipocampo aumenta la liberación de acetilcolina durante el desempeño en tareas que involucran memoria espacial y que este aumento en la liberación de acetilcolina correlaciona positivamente con un mejor desempeño, por ejemplo en un laberinto radial [365], con la novedad, la actividad exploratoria y también con la habituación a un campo abierto [15], como así también con fenómenos cognitivos y atencionales que subyacen a procesos de motivación (como el laberinto radial con recompensa) [366].

Se considera que la memoria de la evitación inhibitoria depende de la activación del sistema colinérgico, por diversos ensayos de farmacología [199; 367; 368; 369; 370; 371; 372]. La administración del antagonista muscarínico escopolamina produce amnesia en este tipo de tareas en la rata.

Como ya hemos visto en el capítulo anterior, la exposición a dos sesiones en un campo abierto previamente al entrenamiento en evitación inhibitoria con un choque fuerte, ejerció un efecto facilitador significativo en la memoria de largo plazo, que se puso en evidencia durante la sesión de evocación 24 horas más tarde. Sin embargo, ese efecto no se evidenció cuando el entrenamiento se realizó con una intensidad de choque suave (ver Capítulo III).

En experimentos previos, observamos que los animales expuestos a 2 sesiones de OF antes del entrenamiento en SD-IA o ST-IA, que fueron inmediatamente inyectados en el hipocampo con 2 o 4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de escopolamina, no evidenciaban diferencias significativas en el desempeño comparados con sus respectivos controles, inyectados con salina. Es decir que, ante el bloqueo de los receptores muscarínicos del hipocampo dorsal, no se observaba el reportado efecto amnésico [16].

Dosis escopo	Choque	Tarea	Lat (tr vs. te)	Dif (trat vs. cont)
2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	0,6 mA	SD-IA	p<0,01	p>0,05
4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	0,4 mA		p<0,05	p>0,05
2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	0,5 mA	ST-IA	p<0,05	p>0,05
4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$			p<0,001	p>0,05

Tabla 4: La tabla corresponde al desempeño de grupos de machos que pasaron por 2 OF previo al entrenamiento con distinta intensidad de choque en SD-IA o ST-IA. Luego del entrenamiento fueron inyectados con 2 o 4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de escopolamina. La comparación estadística de las latencias del entrenamiento vs. latencias del test, evidencia que todos los grupos alcanzaron criterio de aprendizaje. La comparación estadística entre las diferencias de latencias (test-entrenamiento) de los grupos tratados vs. los grupos control evidencia que el desempeño fue similar cuando fueron inyectados con escopolamina o bien con solución salina.

Con el objetivo de comprender la naturaleza de la amnesia causada por bloqueo de los receptores muscarínicos y para intentar arrojar luz sobre la participación del sistema colinérgico en esta tarea, particularmente en la interacción con la exposición previa al OF, diseñamos ensayos en los que ratas previamente expuestas al campo abierto recibieron escopolamina intraperitoneal antes de ser entrenadas en SD-IA con un choque suave (0,5 mA).

Efecto del campo abierto sobre la amnesia de la SD-IA causada por administración de escopolamina i.p. antes del entrenamiento.

Cabe aclarar aquí que, en los casos que se señalan, los ensayos se realizaron tanto con ratas machos, como con hembras, por supuesto separadamente, para su comparación. Luego, como no encontramos diferencias significativas en el desempeño entre ambos sexos en esta tarea, ni en los efectos del campo abierto sobre la SD-IA (Capítulo III.2), en algunos ensayos utilizamos solamente hembras, mientras que en otros ensayos, utilizamos solamente machos, pertenecientes a las mismas camadas.

Entonces se evaluó el efecto del antagonista muscarínico escopolamina administrado i.p. antes del entrenamiento en la tarea de SD-IA, en ratas hembra con y sin exposición previa al campo abierto. Parte de los animales fueron expuestos al OF y en la segunda sesión de OF, se observó disminución significativa del número de elevaciones sobre los miembros posteriores (número de *rearings*, $p < 0,01$ por prueba de t para datos apareados; tabla 4.1).

Tabla 4.1 A: Desempeño en el OF de ratas hembra correspondientes al ensayo de la figura 4.1 B (grupo 2 OF).

Campo abierto	Cruces		Elevaciones		Acicalamientos	
	1° sesión	2° sesión	1° sesión	2° sesión	1° sesión	2° sesión
(Media ± ES)	81,85 ± 4,03	68,85 ± 6,25	26,33 ± 1,82**	20,92 ± 2,10**	2,54 ± 0,55	2,85 ± 0,59

Medias ± error estándar de los distintos parámetros registrados durante las dos sesiones de OF.

•Diferencias significativas para el parámetro correspondiente, entre la primera y segunda sesión; prueba de t para datos apareados (***) $p < 0,001$.

Algunos de dichos animales fueron inyectados con escopolamina i. p. en dosis de 1 mg/kg, en 0,5 ml (grupo tratado), 30 min antes del entrenamiento en evitación inhibitoria. Las ratas del grupo control fueron inyectadas con igual volumen de solución salina. A su vez, se evaluó si dos sesiones de campo abierto, de 3 min cada una, realizadas una el día anterior y la otra, 1 h 30 min antes del entrenamiento de SD-IA, con choque de 0,5 mA (igual protocolo que para los animales *naive*), ejercieron algún efecto sobre el desempeño en la evitación inhibitoria.

Como siempre, a las 24 h se realizó el test de SD-IA sin choque para evaluar la retención y formación de LTM.

En la figura 4.1 los diagramas de barras corresponden a las medianas de latencias en SD-IA, de los animales previamente expuestos o no al campo abierto (grupo OF, barras rayadas, fig 4.1 A; grupo No-OF, barras lisas, fig 4.1 B). Las barras color gris corresponden a los grupos tratados con escopolamina, y las barras blancas, al grupo control de animales inyectados con solución salina. De ahora en más, salvo que se explicita lo contrario, los grupos que se compararon no tuvieron diferencias significativas en las latencias de entrenamiento ($p > 0,05$; por prueba de Kruskal Wallis, ANOVA de una vía); es decir que las ratas en todos los grupos tuvieron un comportamiento similar durante el entrenamiento en SD-IA, ya sea que hubieran o no pasado por el OF.

Los grupos control, tanto aquel expuesto a las dos sesiones en el campo abierto (grupo 2 OF), como el que no fue expuesto (grupo No-OF), tuvieron latencias de test significativamente diferentes y mayores que las latencias del entrenamiento ($p < 0,05$ para el grupo control No-OF [N=13]; $p < 0,001$ para el grupo control OF [N=14]; por prueba para muestras apareadas de Wilcoxon) (figuras 4.1 A y B).

Es decir que estos grupos alcanzaron el criterio de aprendizaje y evidenciaron haber formado una LTM de la tarea. En este caso se observó una tendencia a una mejora por exposición al campo abierto en los animales del grupo control con 2 OF, ya que hubo una mayor proporción de animales con latencias elevadas durante el test (cercasas al valor máximo registrado) respecto al grupo control No-OF. Si bien la mediana de las diferencias de latencias fue mayor para el grupo con 2 OF (49,09) respecto del grupo No-OF (11,63), no hubo diferencias significativas ($p > 0,05$; en la

comparación de las diferencias de latencias [test- entrenamiento] del grupo control No-OF vs. grupo control 2 OF, por prueba para muestras no apareadas de Mann Whitney, fig 4.1 C). En cambio, las ratas tratadas con escopolamina que no fueron previamente expuestas al OF, no alcanzaron el criterio de aprendizaje de la SD-IA, resultando amnésicas ($p > 0,05$, entrenamiento vs. test, prueba para muestras apareadas de Mann Whitney; [N=15]). Coherentemente, tuvo un mejor desempeño del grupo control no expuesto al OF, respecto del tratado con escopolamina no expuesto al OF ($p < 0,05$; comparación de las diferencias de latencias [test- entrenamiento] del grupo control No-OF vs. grupo tratado No-OF, por prueba para muestras no apareadas de Mann Whitney, fig 4.1C). Es decir que se puso de manifiesto un efecto amnésico de la escopolamina sobre la memoria de la tarea de SD-IA, cuando fue administrada i.p. antes de un entrenamiento suave.

En cambio, los animales inyectados con escopolamina 1 mg/kg, pero que sí fueron expuestos a dos sesiones de campo abierto (grupo escopo 2 OF), tuvieron latencias de test significativamente mayores que las latencias del entrenamiento ($p < 0,05$; por prueba para muestras apareadas de Wilcoxon, [N=14]). Por lo tanto, la previa exposición al campo abierto habría sido suficiente para que no se manifestara la amnesia instigada por escopolamina.

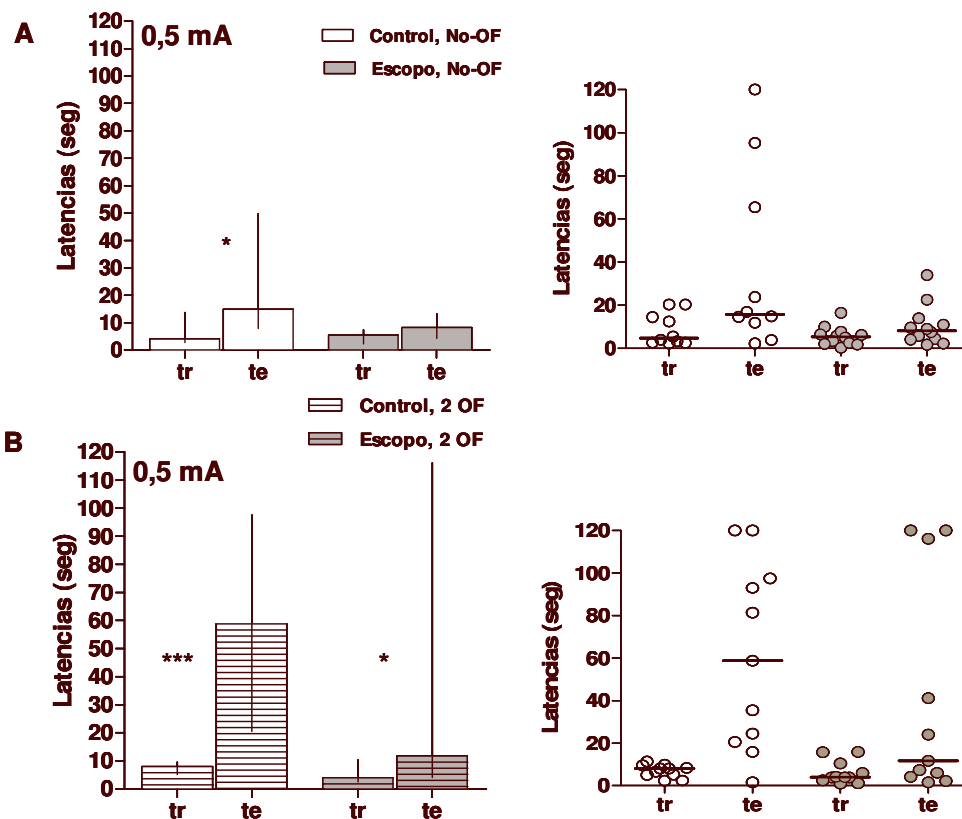
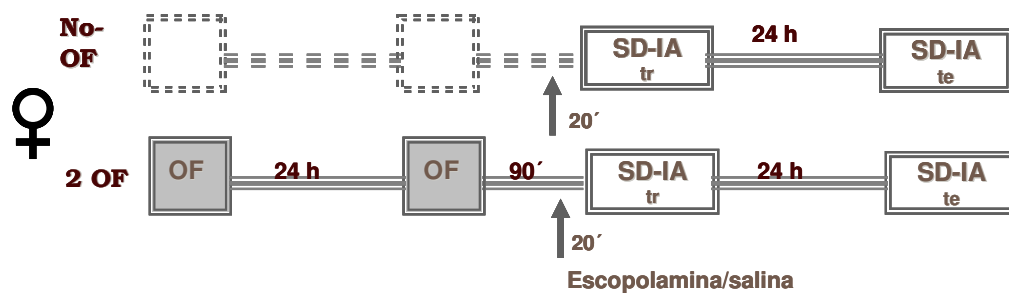


Fig 4.1: Efecto del campo abierto sobre la amnesia de SD-IA causada por administración de escopolamina intraperitoneal.

Arriba: Esquema del diseño experimental para evaluar el efecto de escopolamina intraperitoneal sobre SD-IA, con y sin exposición previa al OF. Las ratas hembra fueron entrenadas en SD-IA con un choque de 0,5 mA. La flecha indica la inyección de escopolamina o solución salina.

A y B: Los gráficos de barras representan medianas de latencias con sus rangos intercuartiles (25; 75) en SD-IA de animales expuestos a dos sesiones previas en el OF (barras rayadas, B) y de los que no fueron expuestos al OF (grupo 2 OF, barras vacías, A). Se inyectó vía i.p. solución salina (grupo No-OF, control, barras blancas); o escopolamina 1mg/kg (escopo, barras grises).

tr: latencia de entrenamiento; **te:** latencia de test.

A la derecha: gráficos de *scatter*

Diferencias significativas entre entrenamiento y test; prueba para datos apareados de Wilcoxon ($p < 0,05$. *** $p < 0,001$).

Las diferencias de latencias (test-entrenamiento) (fig. 4.1C) de los grupos de animales expuestos previamente a 2 OF, ya fueran inyectados con escopolamina o salina, no resultaron significativamente diferentes. Es decir que la previa exposición a 2 OF permitió superar la amnesia que produce el bloqueo de receptores muscarínicos por escopolamina antes de un entrenamiento suave en SD-IA.

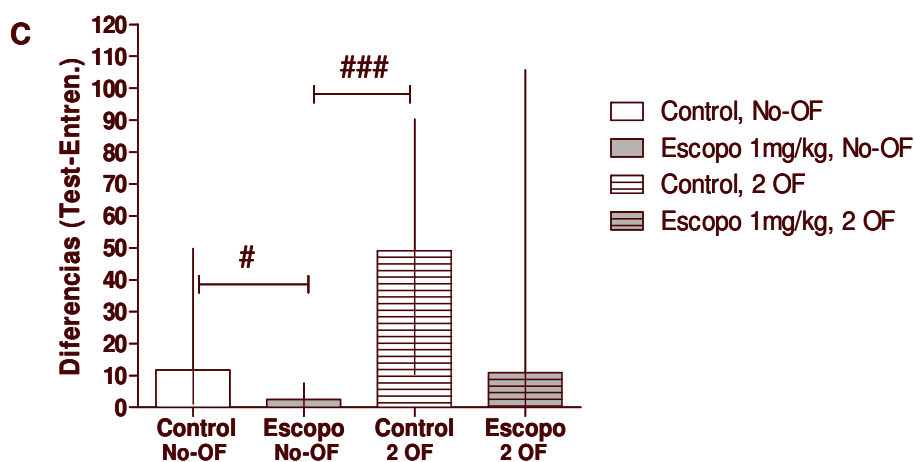


Fig 4.1 C: Efecto del campo abierto sobre la amnesia de SD-IA causada por administración de escopolamina intraperitoneal.

Las barras representan las **diferencias de latencias** (test-entrenamiento) con sus rangos intercuartiles (25; 75), de los animales inyectados con escopolamina y con solución salina (correspondientes a las partes A y B de la figura).

Grupos No-OF: control N=13 y tratado N=15. Grupos 2 OF: control N=14 y tratado N=14.

#Diferencias significativas entre las diferencias de latencias por prueba no pareada de Mann Whitney (# p<0,05; ###p<0,001).

Efecto de la previa exposición al OF sobre la memoria de corta duración (STM) y sobre la de larga duración (LTM) de la de SD-IA. Efecto sobre la amnesia por administración de escopolamina intraperitoneal.

Se ha reportado que la escopolamina inyectada en forma sistémica en ratones 15 min antes del entrenamiento [373] o bien en el hipocampo en ratas, inmediatamente luego del entrenamiento [2] afecta negativamente la memoria de corta duración de SD-IA.

Teniendo en cuenta los resultados de la sección anterior sobre la LTM y los antecedentes mencionados, investigamos que ocurría con STM en similares condiciones. Utilizando el mismo protocolo experimental de la figura 4.1 A y B, se evaluó si la administración de escopolamina via i.p. afectaba la memoria de corta duración (STM) de manera semejante a como lo hacía con la LTM, provocando amnesia, y si dicha amnesia podía ser superada por el paso por el OF.

La mitad de un lote de ratas hembra fueron expuestas a 2 sesiones en el OF de 3 min cada una con igual protocolo al del ensayo anterior (diagrama superior de figura 4.1 D), antes del entrenamiento de SD-IA. En la segunda sesión de OF se observó disminución significativa del número de cruces y del número de elevaciones sobre los miembros posteriores (cruces, $p < 0,001$ y elevaciones, $p < 0,05$ por prueba de t para datos apareados; tabla 4.1 B).

Tabla 4.1 B: Desempeño en el OF de las ratas hembra correspondientes al ensayo de la figura 4.1 E (grupo 2 OF).

Campo abierto	Cruces		Elevaciones		Acicalamientos	
	1° sesión	2° sesión	1° sesión	2° sesión	1° sesión	2° sesión
(Media ± ES)	87,86 ± 3,46***	72,71 ± 2,63***	32,71 ± 2,64*	22,57 ± 6,47*	0,28 ± 0,28	4,43 ± 2,14

Medias ± error estándar de los distintos parámetros registrados durante las dos sesiones de OF.

* Diferencias significativas para el parámetro correspondiente, entre la primera y segunda sesión, prueba de t para datos apareados (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

Luego de **1 hora de** la segunda sesión en el OF, las ratas recibieron una inyección intraperitoneal del vehículo o de escopolamina; 30 min después fueron entrenadas en SD-IA (fig 4.1 E).

Luego los animales fueron inyectados 30 min antes del entrenamiento en SD-IA con 1 mg/kg de escopolamina, en un volumen final de 0,5 ml, o bien fueron inyectados con igual volumen de solución salina. A continuación fueron entrenados en SD-IA con un choque umbral de 0,5 mA. Se realizó el test de SD-IA a los 40 min para evaluar STM, como lo indica el diagrama superior de la figura 4.1 D. A las 24 h se realizó el test para evaluar LTM en los mismos animales.

En la figura 4.1 D y E, los diagramas de barras corresponden a las medianas de latencias en SD-IA de los animales previamente expuestos o no al OF (grupo No-OF, barras lisas, de fig 4.1 D; grupo

OF, barras rayadas de fig 4.1 E), inyectados con escopolamina (barras grises) o con salina (barras blancas).

Los grupos control, tanto el expuesto al OF (grupo OF) como el que no fue expuesto (grupo No-OF), tuvieron latencias del test realizado a los 40 min, significativamente diferentes y mayores que las latencias del entrenamiento ($p < 0,01$ por prueba para muestras apareadas de Wilcoxon, $[N=11]$) (figura 4.1 D y E). Es decir que estos grupos alcanzaron el criterio de aprendizaje y evidenciaron tener una STM de la tarea. En cambio, los grupos tratados con escopolamina, expuestos o no al OF, no evidenciaron una STM de la tarea, ya que no hubo diferencias significativas entre las latencias del entrenamiento y del test ($p > 0,05$ cuando se evaluó STM [grupo tratado No-OF $N=8$ y grupo tratado OF $N=7$]; por prueba para muestras apareadas de Wilcoxon) (figura 4.1 D y E).

Es decir que la escopolamina ejerció un efecto amnésico ya que no hubo evidencias de retención y, a diferencia de lo que ocurrió previamente con la LTM, esta amnesia no fue superada por las exposiciones previas al OF.

Como se puede ver en la fig. 4.1 F, hubo diferencias significativas entre algunos de los grupos experimentales ($p < 0,001$, comparación de las diferencias de latencias [test - entrenamiento para STM], por Kruskal Wallis, ANOVA). Es evidente que tanto el grupo control expuesto al OF como el no expuesto, tuvieron un mejor desempeño en la STM, que los dos grupos tratados con escopolamina, incluso el que fue expuesto al OF previo ($p < 0,05$; para las diferencias de latencias [test - entrenamiento para STM] del grupo control OF vs. grupo tratado OF; $p < 0,01$ entre el grupo control OF vs. grupo tratado No-OF; por prueba de comparaciones múltiples de Dunns; fig 4.1 F) ($p < 0,05$; para las diferencias de latencias [test - entrenamiento para STM] del grupo control No-OF vs. grupo tratado OF; $p < 0,01$ entre el grupo control No-OF vs. grupo tratado No-OF; por prueba de Mann Whitney; fig 4.1 F).

Pasadas las 24 horas del entrenamiento en SD-IA, se realizó un nuevo test de estos cuatro grupos de animales, para evaluar la LTM. En la fig 4.1 D y E también se muestran las medianas de latencias obtenidas para los distintos grupos en el entrenamiento y en el test realizado a las 24 h (te LTM). Se comprobó que los grupos tratado y control expuestos previamente al OF, así como el grupo control no expuesto al OF, alcanzaron el criterio de aprendizaje y formaron una LTM ($p < 0,05$ para entrenamiento vs. test, prueba para muestras apareadas de Wilcoxon). Como era de esperar, el grupo tratado con escopolamina que no fue expuesto al OF, no evidenció memoria de larga duración ($p > 0,05$ para la comparación entrenamiento vs. test, prueba para muestras apareadas de Wilcoxon), corroborando los resultados previos.

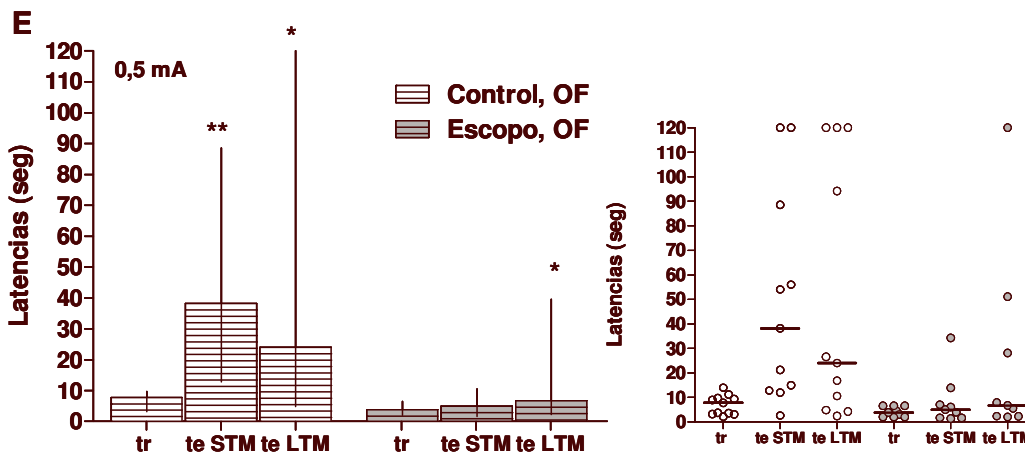
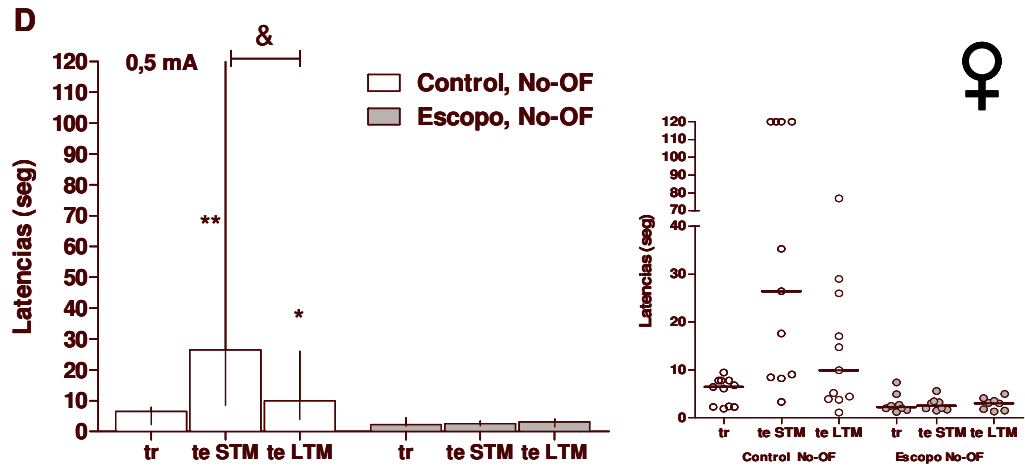
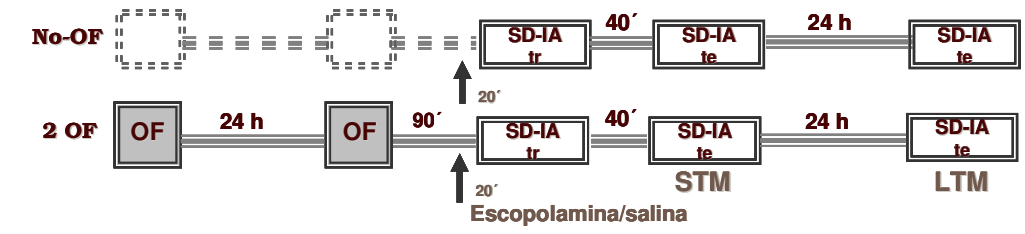


Fig 4.1 D y E: Efecto de la previa exposición al OF sobre la memoria de corta duración (STM) y sobre la de larga duración (LTM) de la de SD-IA. Efecto sobre la amnesia por administración de escopolamina intraperitoneal.

Arriba: Esquema del diseño experimental para evaluar el efecto escopolamina i.p. sobre SD-IA, con y sin exposición previa al OF. La flecha indica la inyección vía i.p. de solución salina (control, barras blancas), o escopolamina 1 mg/kg (escopo, barras grises). Ratas hembra fueron entrenadas en SD-IA con un choque de 0,5 mA. Se realizó una sesión de test a los 40 min (para evaluar memoria de corta duración: STM), y otra sesión de test a las 24 h (para evaluar memoria de larga duración: LTM)

D y E: Las **barras representan medianas de latencias con sus rangos intercuartiles (25; 75)**. **E:** animales expuestos a dos sesiones previas de campo abierto (grupos 2 OF, **E**), representados por barras rayadas; **D:** animales que no tuvieron exposición previa al OF (grupos No-OF, **D**), barras vacías.

tr: latencia de entrenamiento; **te STM:** latencia de test de memoria de corta duración.

te LTM: latencia de test de memoria de larga duración.

Paneles a la derecha: gráficos de *scatter*.

Grupos No-OF: control N=11 y tratado N=8. Grupos 2 OF: control N=11 y tratado N=9.

Diferencias significativas entre entrenamiento y test; prueba para datos apareados de Wilcoxon ($p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

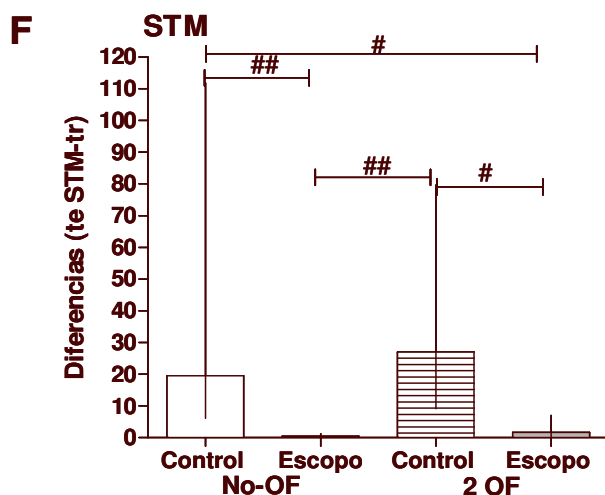


Fig 4.1 F : Efecto de la exposición al OF sobre la memoria de corta duración (STM) y larga duración (LTM) de la de SD-IA. Efecto sobre la amnesia por administración de escopolamina intraperitoneal: Diferencias de latencias.

Diferencias de latencias (test STM-entrenamiento) (F) con sus rangos intercuartiles (25; 75) de los grupos inyectados con escopolamina y con solución salina de la parte D y E de la figura.

#Diferencias significativas entre las diferencias de latencias entre grupos por prueba de comparaciones múltiples de Dunn's (post Kruskal Wallis ANOVA) (## $p < 0,01$).

Para el grupo control, no expuesto al OF las latencias del test realizado a los 40 min fueron significativamente mayores a las del test realizado a las 24 h ($p < 0,05$ por prueba para muestras apareadas de Wilcoxon) (figura 4.1 D).

Para descartar la posibilidad de que el efecto de escopolamina i.p. sobre el desempeño evaluado a los 40 min, pudiera deberse a una alteración de este fármaco sobre la locomoción [374; 375], más que un efecto cognitivo, se realizó un ensayo preliminar. Para ello se observó la actividad locomotora (exploratoria) en un OF, 60 min después de la inyección de 1 mg/kg de escopolamina i.p. En este ensayo no hubo diferencias significativas en la locomoción, evaluada por el número de cruces y elevaciones sobre los miembros posteriores en el OF, entre los animales tratados con escopolamina y el respectivo control inyectado con salina ($p < 0,05$ por test de T; **cruces:** grupo

escopolamina: $61,25 \pm 5,79$ [N= 12]; grupo control: $52,27 \pm 3,59$ [N=11]; elevaciones: grupo escopolamina: $12,50 \pm 1,25$; grupo control: $16,09 \pm 2,25$). De esta manera se descartó la posibilidad de que las diferencias encontradas en el desempeño en el test realizado 40 min después del entrenamiento en SD-IA (60 min después de la inyección de escopolamina i. p.) se deban a alteraciones locomotoras producidas por escopolamina.

En síntesis, la administración de escopolamina i. p. antes del entrenamiento en SD-IA, fue amnésica tanto para la STM como para la LTM de la tarea. La doble exposición al campo abierto rescató la traza de LTM luego de administración de escopolamina, como ya habíamos comprobado (fig. 4.1 B), pero no la de STM en los mismos animales.

Efecto de campo abierto sobre la amnesia por escopolamina administrada intrahipocampo en la consolidación de la memoria de SD-IA.

La administración del antagonista muscarínico escopolamina en el hipocampo dorsal durante la consolidación de SD-IA produce amnesia retrógrada en la rata [16]. Por lo tanto se ha considerado que la transmisión mediada por receptores muscarínicos del hipocampo es necesaria para la consolidación de esta memoria. Pero dicha amnesia retrógrada se produciría cuando se entrena a los animales con un choque suave, es decir, cuando el aprendizaje no resulta tan robusto y cuando se utilizan altas concentraciones del antagonista [376; 377; 378; 379; 380].

Con el objetivo de comprender la naturaleza de la amnesia retrógrada causada por bloqueo de los receptores muscarínicos del hipocampo dorsal y para intentar arrojar luz sobre la participación del sistema colinérgico en esta tarea, diseñamos ensayos en los que ratas previamente expuestas al campo abierto, fueron entrenadas en SD-IA con un choque suave (0,5 mA), recibiendo escopolamina intrahipocampo inmediatamente luego del entrenamiento.

Habiendo comprobado que el campo abierto “impidió” que se manifestara la amnesia instigada por escopolamina inyectada por vía intraperitoneal previamente al entrenamiento (fig. 4.1), y teniendo en cuenta que la consolidación de la tarea utilizada depende del hipocampo, se decidió evaluar si la exposición al campo abierto continuaba siendo “facilitatoria” o “promoviendo” la formación de LTM cuando la escopolamina se administraba durante la consolidación y estaba restringida al hipocampo dorsal.

Entonces el **objetivo específico fue evaluar si la exposición al campo abierto era capaz de producir alguna modulación positiva sobre la consolidación temprana de SD-IA, que permitiera superar el efecto amnésico de la inhibición de la transmisión muscarínica en el hipocampo durante la consolidación.**

Algunos animales fueron inyectados con $8 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ de escopolamina intrahipocampo dorsal, $1 \mu\text{l}$ por lado, inmediatamente luego del entrenamiento en evitación inhibitoria, constituyendo el grupo

tratado. Las ratas del grupo control fueron inyectadas en hipocampo dorsal, con igual volumen de solución salina.

Grupos de hembras:

Algunas ratas hembras fueron expuestas a dos sesiones de OF de 3 minutos cada una, realizadas 24 h y 1 h 30 min antes) como lo indica el diagrama superior de la figura 4.2. En la segunda sesión en el campo abierto se observó una disminución significativa del número de elevaciones (*rearings*) ($p < 0,05$, por prueba de t para datos apareados) (ver tabla 4.2).

Tabla 4.2: Desempeño en el OF de las ratas hembra correspondientes al ensayo de la figura 4.2 (grupo 2 OF).

Campo abierto	Cruces		Elevaciones		Acicalamientos	
	1° sesión	2° sesión	1° sesión	2° sesión	1° sesión	2° sesión
(Media ± ES)	84,47 ± 4,57	76,40 ± 4,85	25,07 ± 1,63*	19,60 ± 2,17*	0,60 ± 0,29	0,46 ± 0,16

Medias y su error estándar para los distintos parámetros registrados.

* Diferencias significativas para el parámetro correspondiente, entre la primera y segunda sesión, prueba de t para datos apareados ($*p < 0,05$).

Luego de la segunda sesión en el OF, las ratas fueron entrenadas en SD-IA y recibieron inmediatamente una inyección intrahipocampo del vehículo o de escopolamina (fig 4.2).

En la figura 4.2 los diagramas de barras corresponden a las latencias de descenso de la plataforma para ratas hembra que no fueron expuestas al OF (grupos No-OF, barras vacías, A) y de las que fueron expuestas a 2 sesiones de OF (grupos 2 OF, barras rayadas, B) así como de la tratadas con escopolamina intrahipocampo (grupos No-OF y OF; barras grises), con los respectivos controles con solución salina (barras blancas). Las latencias del test fueron significativamente mayores que las del entrenamiento para el grupo control expuesto al OF y para el grupo no expuesto al OF (No-OF), así como también para el grupo tratado con escopolamina expuesto a 2 OF ($p < 0,001$ para grupos tratado con 2 OF [N=14]; $p < 0,01$ para el grupo control 2 OF [N=13]; $p < 0,05$ para grupo control No-OF [N=12]; prueba para muestras apareadas de Wilcoxon), es decir que estos animales formaron una LTM. En cambio, los inyectados con escopolamina en hipocampo dorsal, pero no expuestos al OF previo (No-OF), no mostraron una retención significativa que evidenciara la formación de una LTM de la tarea ($p > 0,05$, por prueba para muestras apareadas de Wilcoxon, N=12). En otras palabras, los animales control formaron una LTM de la tarea, mientras que los inyectados con escopolamina que no pasaron por el OF, no evidenciaron recordarla. Hubo diferencias significativas en el desempeño en SD-IA entre algunos de los grupos ($p < 0,01$, comparación de las diferencias de latencias [test- entrenamiento] por Kruskal Wallis ANOVA). Los grupos de animales expuestos previamente al OF, ya sea que fueron tratados con escopolamina o inyectados con salina mostraron un desempeño significativamente mejor que el del grupo tratado

que no fue expuesto al OF ($p < 0,05$ para diferencias de latencias [test-entrenamiento] para grupos tratados con escopolamina OF vs. No-OF y $p < 0,01$ entre grupos control OF vs. escopolamina No-OF, por prueba para muestras no apareadas de Mann Whitney). Aunque los animales del grupo control, expuestos a 2 sesiones de OF mostraron una tendencia de un mejor desempeño en el test respecto del grupo control que no pasó por el OF, esta no alcanzó a ser significativa (ya que la comparación de las diferencias de latencias [test-entrenamiento]= 37,40 y 4,97 respectivamente] arrojó un $p = 0,077$, por prueba para muestras no apareadas de Mann Whitney).

Estos resultados corroborarían el ya reportado efecto amnésico de la escopolamina sobre la consolidación cuando es administrada intrahipocampo inmediatamente luego de entrenamiento en la tarea de SD-IA, y demuestran que dicha amnesia retrógrada fue superada cuando se realizaron dos sesiones en el OF de 3 minutos cada una, 24 h y 1 h 30 min antes del entrenamiento. A su vez, demuestran que esta superación de la amnesia ocurrió en animales que se habían habituado al OF.

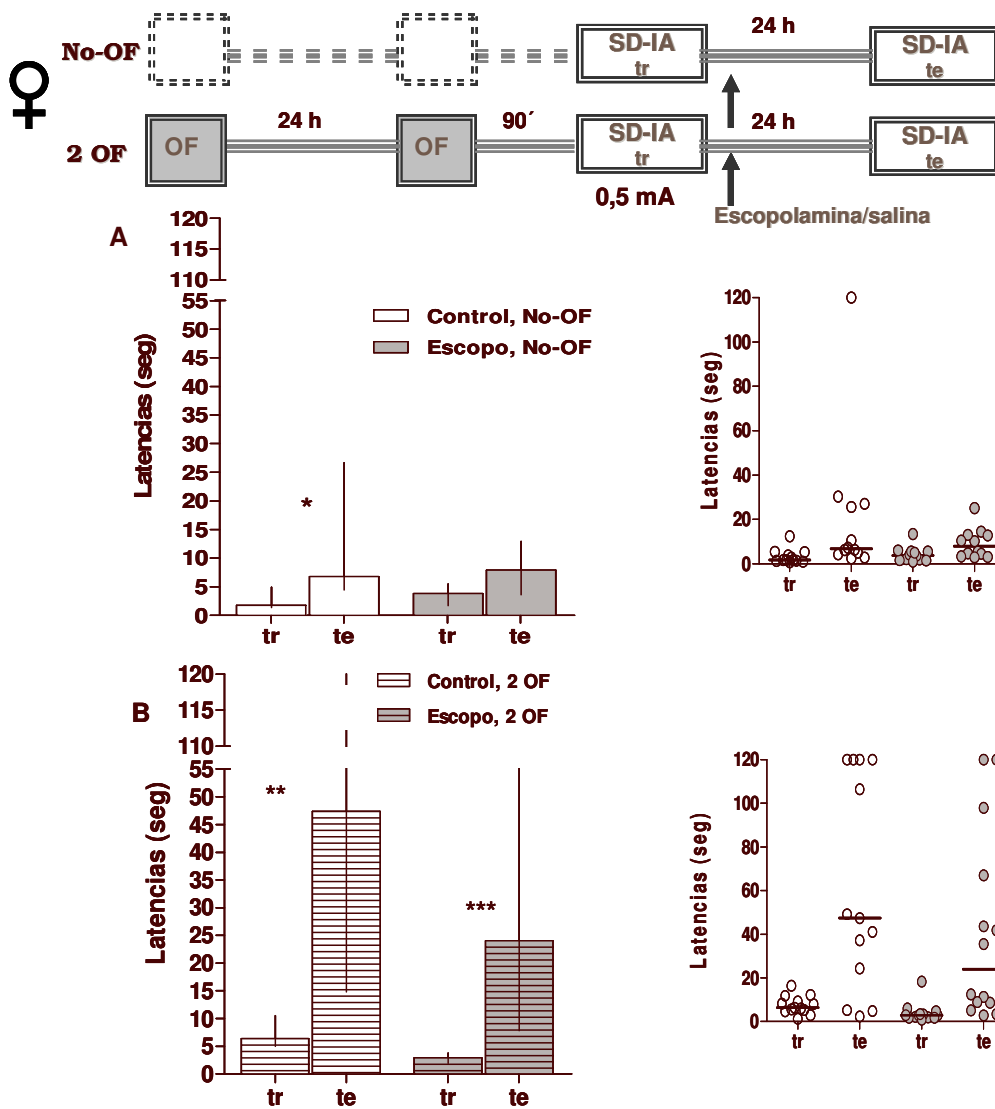


Fig 4.2: Efecto de campo abierto sobre la amnesia por escopolamina administrada intrahipocampo en la consolidación de la LTM de SD-IA: (entrenamiento suave) en ratas hembras.

Arriba: Esquema del diseño de los experimentos para evaluar el efecto sobre el desempeño en la SD-IA de la escopolamina intrahipocampo, cuando se expone o no al OF. Los grupos de ratas hembra fueron entrenados en SD-IA con un choque de 0,5 mA. La flecha indica el momento en que se inyectó escopolamina o solución salina.

A y B: Los gráficos de barras corresponden al desempeño en SD-IA de grupos de animales expuestos a dos sesiones de campo abierto (grupo 2 OF, barras rayadas, **B**) y de grupos que no fueron expuestos al OF (grupo No-OF, barras vacías, **A**). En cada caso se inyectó intrahipocampo con solución salina (control, barras blancas); o escopolamina 8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (escopo, barras grises). Las barras representan medianas de latencias con sus rangos intercuartiles (25; 75) **tr**: latencia de entrenamiento; **te**: latencia de test.

Paneles laterales a la derecha: gráfico de *scatter*.

* Diferencias significativas entre entrenamiento y test; prueba para datos apareados de Wilcoxon (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

C

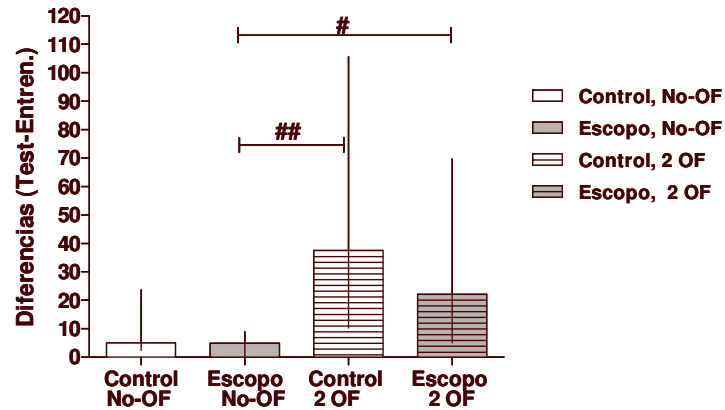


Fig 4.2: Efecto de campo abierto sobre la amnesia por escopolamina administrada intrahipocampo en la consolidación de la memoria de SD-IA: (entrenamiento suave) en ratas hembras.

C.: Diferencias de latencias (test-entrenamiento) con sus rangos intercuartiles (25; 75) de los grupos inyectados con escopolamina y con solución salina, de las partes A y B de la figura. Grupos No-OF, control N=12 y tratado N=12. Grupos 2 OF, control N=13 y tratado N=14.

Diferencias significativas entre las diferencias de latencias por prueba para datos no apareados de Mann Whitney (# p<0,05, ## p<0,01).

Grupos de machos:

Para discriminar entre el efecto de una exposición al OF, donde estaría involucrado el factor novedad y la doble exposición al OF, que involucra habituación, teniendo en cuenta la propuesta participación del hipocampo en la detección de novedad [161; 162; 163; 164] y de su clásico rol en la formación de memoria [381; 382] (ver Introducción, pag 35), decidimos investigar si una sola sesión en el campo abierto, realizada 1 h 30 min antes del entrenamiento en SD-IA, era suficiente por sí sola, para superar el efecto amnésico de la escopolamina.

Algunos animales fueron expuestos a dos sesiones de campo abierto antes del entrenamiento en SD-IA (grupos 2 OF); mientras que a diferencia del ensayo anterior, otros animales fueron

Tabla 4.3: Desempeño en el OF de las ratas macho del ensayo de la figura 4.3 C (grupo 2 OF).

Campo abierto	Cruces		Elevaciones		Acicalamientos	
	1° sesión	2° sesión	1° sesión	2° sesión	1° sesión	2° sesión
(Media ± ES)	67,7 ± 5,45	57,90 ± 5,50	19,60 ± 1,95***	14,40 ± 1,93***	1,00 ± 0,42	0,70 ± 0,40

Se muestran las medias y su error estándar para los distintos parámetros registrados.

* Diferencias significativas para el parámetro correspondiente, entre la primera y segunda sesión, prueba de t para datos apareados (***)p<0,001).

Luego de la segunda sesión en el OF, las mismas ratas fueron entrenadas en SD-IA y recibieron inmediatamente una inyección intrahipocampo del vehículo o de escopolamina (fig 4.3 C).

expuestos a una única sesión de 3 min en el OF, 1 h 30 min antes del entrenamiento en SD-IA (grupo 1 OF); y otros, sólo fueron entrenados en SD-IA (grupos No-OF). Los animales que fueron expuestos dos veces al OF, en la segunda sesión mostraron una disminución significativa del número de elevaciones (*rearings*) ($p < 0,001$, por prueba de t para datos apareados) (ver tabla 4.3). Como lo indica el diagrama de la figura 4.3, utilizando el mismo protocolo experimental que con las hembras (de la fig.4.2), se evaluó el desempeño de machos entrenados en SD-IA con un choque eléctrico suave (0,5 mA), que fueron inyectados intrahipocampo inmediatamente luego del entrenamiento con 1 μ l de escopolamina 8 μ g/ μ l por lado, o bien con 1 μ l de solución salina. A las 24 h se realizó el test.

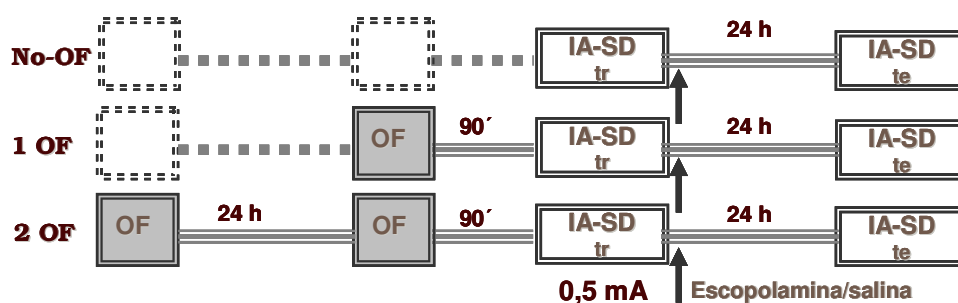


Fig 4.3: Efecto del campo abierto sobre la amnesia por escopolamina administrada intrahipocampo en la consolidación de la memoria de SD-IA: (entrenamiento suave) en ratas macho.

Arriba: Esquema del diseño experimental para evaluar el efecto de la escopolamina intrahipocampo sobre el desempeño en la SD-IA, **cuando se expone o no al OF**. Los grupos de ratas macho fueron entrenados en SD-IA con un choque de 0,5 mA. La flecha indica el momento en que se inyectó escopolamina o solución salina.

En la figura 4.3, los diagramas de barras corresponden a las medianas de las latencias de descenso de la plataforma para los animales que no fueron expuestos al OF (grupo No-OF, A), para los que pasaron por una sola sesión (grupo 1 OF, barras punteadas, fig. 4.3 B), y para los que pasaron por 2 sesiones en el OF (grupo 2 OF, barras rayadas, fig 4.3 C), así como para los grupos tratados con escopolamina intrahipocampo (barras grises) y los respectivos controles (barras blancas). Las latencias del test fueron significativamente mayores que las del entrenamiento, tanto para los animales de los grupos control (ya sea que hubieran pasado por una, dos o ninguna sesión de OF), como para los grupos tratados con escopolamina que fueran expuestos previamente a una o a dos sesiones de OF ($p < 0,01$ para los grupos control expuestos 1 OF [N=8], o 2 OF [N=10] para el grupo No-OF [N=14], y para el grupo tratado con escopolamina expuesto a 1 OF [N=13] y 2 OF [N=8]; por prueba para muestras apareadas de Wilcoxon) (figs 4.3 A, B y C).

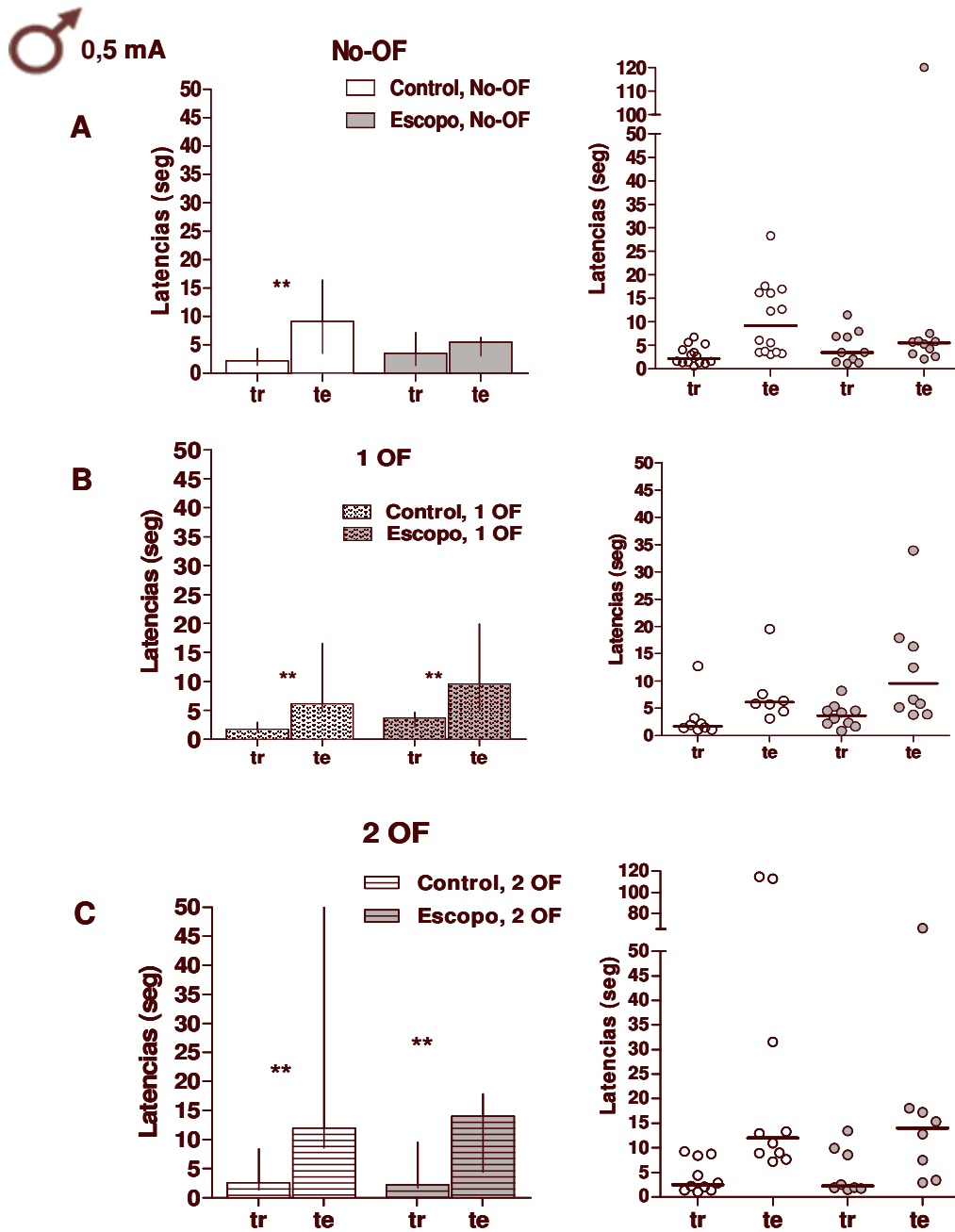


Fig 4.3: Efecto de campo abierto sobre la amnesia por escopolamina administrada intrahipocampo en la consolidación de la memoria de SD-IA: (entrenamiento suave) en ratas macho.

A, B y C: Los gráficos de barras corresponden al desempeño en SD-IA de grupos de animales que no fueron expuestos al OF (barras vacías, A), grupos expuestos a una sesión (barras punteadas, B) y grupos expuestos a dos sesiones de campo abierto (barras rayadas, C).

Fig 4.3: Efecto de campo abierto sobre la amnesia por escopolamina administrada intrahipocampo en la consolidación de la memoria de SD-IA: (entrenamiento suave) en ratas macho.

En cada caso se inyectó intrahipocampo con solución salina (control, barras blancas); o escopolamina 8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (escopo, barras grises). Las barras representan medianas de latencias con sus rangos intercuartiles (25; 75)

tr: latencia de entrenamiento; **te:** latencia de test.

Paneles laterales a la derecha: gráfico de *scatter*.

Grupos No-OF: control N=14 y tratado N=10. Grupos 1 OF: control N=8 y tratado N=13.

Grupos 2 OF: control N=10 y tratado N=8.

*Diferencias significativas entre entrenamiento y test; prueba para datos apareados de Wilcoxon (** $p < 0,01$).

En cambio, el grupo de ratas inyectadas con escopolamina en hipocampo dorsal, que no fue expuesto al campo abierto (No-OF), no alcanzó el criterio de aprendizaje, no evidenciando memoria de SD-IA en el test ($p > 0,05$ por prueba para muestras apareadas de Wilcoxon, N=10) (fig 4.3 A).

Todos los grupos resultaron significativamente diferentes del grupo No-OF inyectado con escopolamina ($p < 0,05$ para la comparación de diferencias de latencias entre grupo tratado No-OF vs. grupo control No-OF; vs. grupo tratado y control 1 OF; vs. grupo tratado 2 OF; $p < 0,01$ entre el grupo tratado No-OF vs. grupo control 2 OF; por prueba para muestras no apareadas de Mann Whitney).

En otras palabras, el bloqueo de los receptores muscarínicos del hipocampo luego del entrenamiento en aquellas ratas que no pasaron por el campo abierto, fue amnésico. Mientras que tanto los animales del grupo control, como los animales con bloqueo muscarínico en el hipocampo, que fueron expuestos antes a una o dos sesiones de OF, aprendieron la tarea y formaron LTM.

No hubo diferencias significativas entre los grupos que pasaron por una sesión de OF con respecto a aquellos que pasaron por dos sesiones de OF, ya sea en el caso de los animales tratados con escopolamina, como en el caso de los controles ($p > 0,05$ comparación 1 OF vs 2 OF, por prueba de Mann Whitney). Tampoco hubo diferencias significativas entre los grupos control, ya sea que hayan sido expuestos (a una o dos sesiones) o no al campo abierto ($p > 0,05$ por prueba de Kruskal Wallis ANOVA).

Como ya se mencionó, la administración pre- o postentrenamiento del antagonista muscarínico escopolamina produce amnesia de la SD-IA en la rata. Pero esta amnesia se produciría cuando se entrena a los animales con un choque suave, es decir, cuando el aprendizaje no resulta tan robusto [376; 383]. Se requieren bajas dosis de escopolamina intraperitoneal para deteriorar la retención evaluada a las 24 h de la tarea de evitación inhibitoria (ST-IA) cuando se la administra antes de la sesión de aprendizaje [219; 384], y mayores dosis para lograr un deterioro cuando se la administra después de esta sesión [379]; indicando un efecto más pronunciado de esta droga sobre la adquisición y una menor influencia sobre la consolidación [380].

Estos resultados corroboran el efecto amnésico aparente de la escopolamina sobre la consolidación, cuando fue administrada intrahipocampo luego de entrenamiento suave en la tarea de SD-IA. Dicho efecto pudo revertirse cuando los animales fueron expuestos a una o dos sesiones en el campo abierto, previas al entrenamiento en SD-IA.

Efecto de la previa exposición al OF sobre la memoria de corta duración (STM) y sobre la de larga duración (LTM) de la de SD-IA. Efecto sobre la amnesia por administración de escopolamina intrahipocampo.

En la sección anterior en los que se evidenció un efecto amnésico de escopolamina i.p. sobre la STM y la LTM de la SD-IA. La doble exposición al campo abierto rescató la traza de LTM luego de administración de escopolamina, (fig. 4.1), pero no la de STM en los mismos animales. También vimos que la escopolamina inyectada en el hipocampo también tuvo un efecto amnésico sobre la LTM de SD-IA, que pudo ser rescatado por la exposición a 1 OF o bien a 2 OF (fig 4.3).

Se ha reportado que la escopolamina inyectada en el hipocampo en ratas, inmediatamente luego del entrenamiento [2] afecta negativamente la memoria de corta duración de SD-IA.

Teniendo en cuenta los resultados de la sección anterior y los antecedentes mencionados, investigamos que ocurría con STM en similares condiciones. Utilizando el mismo protocolo experimental de la figura 4.3, se evaluó si la administración de escopolamina intrahipocampo afectaba la memoria de corta duración (STM) de manera semejante a como lo hacía con la LTM, provocando amnesia, y si dicha amnesia podía ser superada por el paso por el OF.

La mitad de un lote de ratas macho fueron expuestas a 2 sesiones en el OF de 3 min cada una con igual protocolo al del ensayo anterior (diagrama superior de figura 4.3 D y E), antes del entrenamiento de SD-IA. En la segunda sesión de OF no se observó disminución significativa ni del número de cruces como tampoco del número de elevaciones sobre los miembros posteriores ($p > 0,05$ por prueba de t para datos apareados).

Inmediatamente luego del entrenamiento con un choque umbral de 0,5 mA en SD-IA los animales fueron inyectados con 8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de escopolamina, en un volumen final de 1 μl , o bien fueron inyectados con igual volumen de solución salina. Se realizó el test de SD-IA a los 40 min para evaluar STM, como lo indica el diagrama superior de la figura 4.3 D y E. A las 24 h se realizó el test para evaluar LTM en los mismos animales.

En la figura 4.3 D y E, los diagramas de barras corresponden a las medianas de latencias en SD-IA de los animales previamente expuestos o no al OF (grupo No-OF, barras lisas, de fig 4.3 D; grupo OF, barras rayadas de fig 4.3 E), inyectados con escopolamina (barras grises) o con salina (barras blancas).

Los grupos control, tanto el expuesto a 2 OF (grupo **OF**) como el que no fue expuesto (grupo **No-OF**) y el grupo tratado expuesto a 2 OF tuvieron latencias del test realizado a los 40 min, significativamente diferentes y mayores que las latencias del entrenamiento ($p < 0,05$, para el grupo

control que no pasó por el OF [N=12] y $p < 0,01$ para los grupos tratado y control que pasaron por 2 OF [grupo control N=10; grupo tratado N=11] por prueba para muestras apareadas de Wilcoxon) (figura 4.3 D y E). Es decir que estos grupos alcanzaron el criterio de aprendizaje y evidenciaron tener una STM de la tarea. En cambio, el grupo tratado con escopolamina, no expuestos al OF (grupo No-OF), no evidenció una STM de la tarea, ya que no hubo diferencias significativas entre las latencias del entrenamiento y del test ($p > 0,05$ cuando se evaluó STM; por prueba para muestras apareadas de Wilcoxon [N=11]) (figura 4.1 D).

Es decir que la escopolamina intrahipocampo ejerció un efecto amnésico ya que no hubo evidencias de retención y, a diferencia de lo que ocurrió con la STM cuando la escopolamina fue administrada via intraperitoneal antes del entrenamiento en SD-IA (fig 4.1 D y E), esta amnesia fue superada por las exposiciones previas al OF.

Como se puede ver en la fig. 4.3 F, hubo diferencias significativas en el desempeño evaluado a los 40 min, entre algunos de los grupos experimentales ($p < 0,001$, comparación de las diferencias de latencias [test - entrenamiento para STM], por Kruskal Wallis, ANOVA). Es evidente que el grupo tratado con escopolamina y que no fue expuesto al OF fue aquel que tuvo un desempeño en la STM más pobre respecto al resto de los grupos ($p < 0,05$; para las diferencias de latencias [test - entrenamiento para STM] de los grupos tratados con escopolamina No-OF vs. 2 OF ; $p < 0,01$ para los grupos control No-OF vs. grupo tratado No-OF ; $p < 0,001$ entre el grupo control 2 OF vs. grupo tratado No-OF; por prueba de comparaciones múltiples de Dunns; fig 4.3 F).

Pasadas las 24 horas del entrenamiento en SD-IA, se realizó un nuevo test de estos cuatro grupos de animales, para evaluar la LTM. En la fig 4.3 D y E también se muestran las medianas de latencias obtenidas para los distintos grupos en el entrenamiento y en el test realizado a las 24 h (te LTM). Se comprobó que los grupos tratado y control expuestos previamente al OF, así como el grupo control no expuesto al OF, alcanzaron el criterio de aprendizaje y formaron una LTM ($p < 0,05$ para entrenamiento vs. test para los grupos control No-OF y 2 OF, $p < 0,01$ para el grupo tratado con escopolamina 2 OF, prueba para muestras apareadas de Wilcoxon). Como era de esperar, el grupo tratado con escopolamina que no fue expuesto al OF, no evidenció memoria de larga duración ($p > 0,05$ para la comparación entrenamiento vs. test, prueba para muestras apareadas de Wilcoxon), corroborando los resultados previos (fig 4.3 A y C). Como se puede ver en la fig. 4.3 G, hubo diferencias significativas en el desempeño evaluado a los 24 h, entre algunos de los grupos experimentales ($p < 0,05$, comparación de las diferencias de latencias [test - entrenamiento para LTM], por Kruskal Wallis, ANOVA). Es evidente que el grupo tratado con escopolamina y que no fue expuesto al OF tuvo un desempeño en la LTM más pobre respecto a los grupos expuestos a 2 OF tratado con escopolamina y control ($p < 0,05$; para las diferencias de latencias [test - entrenamiento para LTM] de los grupos 2 OF tratados y

control vs. el grupo tratado con escopolamina No-OF; por prueba Mann Whitney para muestras no apareadas; fig 4.3 G).

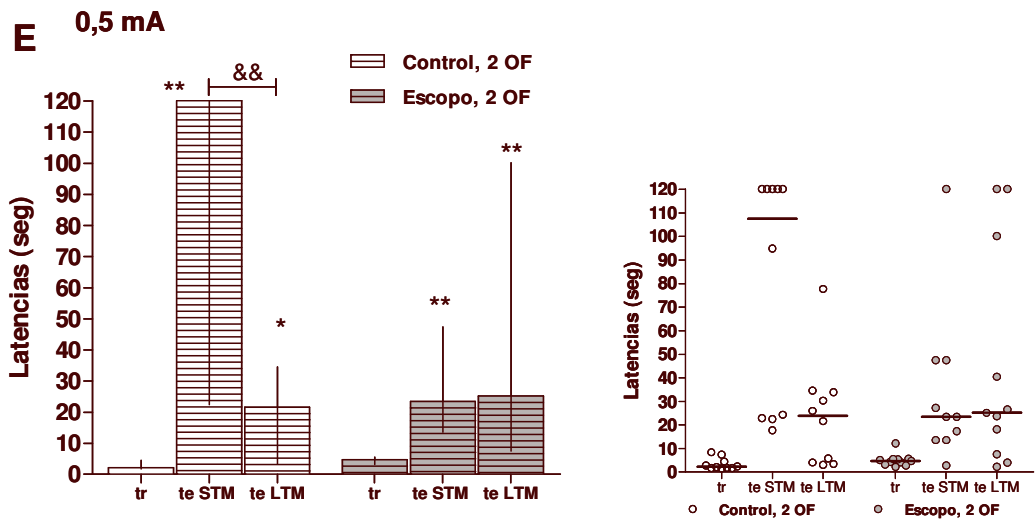
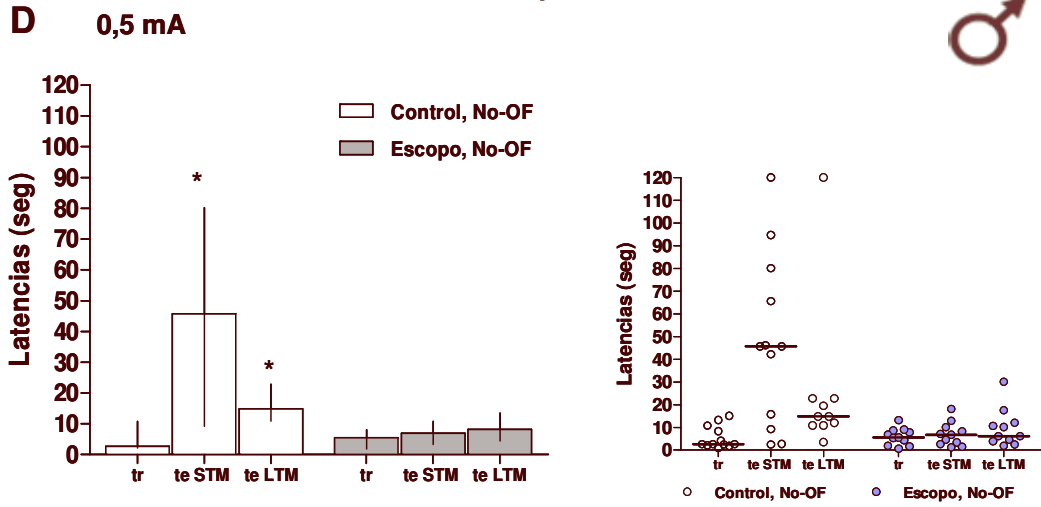
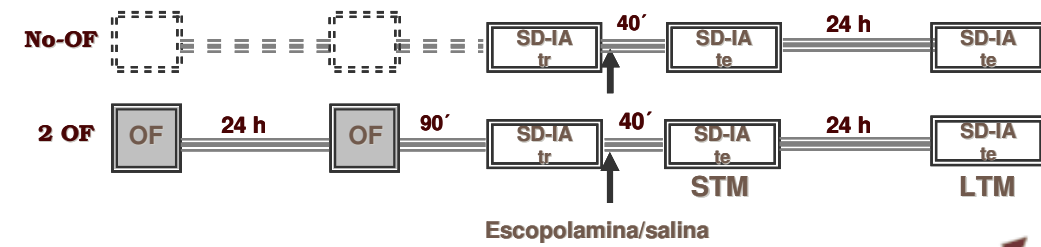


Fig 4.3 D y E: Efecto de la previa exposición al OF sobre la memoria de corta duración (STM) y sobre la de larga duración (LTM) de la de SD-IA. Efecto sobre la amnesia por administración de escopolamina intrahipocampo.

Arriba: Esquema del diseño experimental para evaluar el efecto escopolamina intrahipocampo, sobre SD-IA, con y sin exposición previa al OF. La flecha indica la inyección en el hipocampo dorsal, de solución salina (control, barras blancas), o escopolamina 8 µg/µl (escopo, barras grises).

Ratas macho fueron entrenadas en SD-IA con un choque de 0,5 mA. Se realizó una sesión de test a los 40 min (para evaluar memoria de corta duración: STM), y otra sesión de test a las 24 h (para evaluar memoria de larga duración: LTM)

D y E: Las **barras representan medianas de latencias con sus rangos intercuartiles** (25; 75). **E:** animales expuestos a dos sesiones previas de campo abierto (grupos 2 OF, **E**), representados por barras rayadas; **D:** animales que no tuvieron exposición previa al OF (grupos No-OF, **D**), barras vacías.

tr: latencia de entrenamiento; **te STM:** latencia de test de memoria de corta duración.

te LTM: latencia de test de memoria de larga duración.

Paneles a la derecha: gráficos de *scatter*.

Grupos No-OF: control N=12 y tratado N=11. Grupos 2 OF: control N=10 y tratado N=11.

Diferencias significativas entre entrenamiento y test; prueba para datos apareados de Wilcoxon ($p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

& Diferencias significativas entre test LTM y test STM; prueba para datos apareados de Wilcoxon (&& $p < 0,01$).

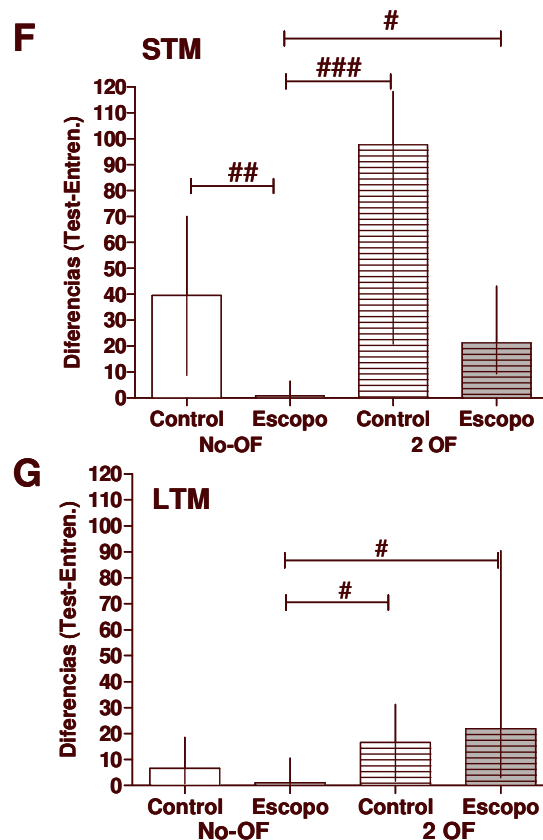


Fig 4.3 F y G: Efecto de la exposición al OF sobre la memoria de corta duración (STM) y larga duración (LTM) de la de SD-IA. Efecto sobre la amnesia por administración de escopolamina intrahipocampo: Diferencias de latencias.

Diferencias de latencias (test STM-entrenamiento) (F) y diferencias de latencias (test LTM-entrenamiento) (G) con sus rangos intercuartiles (25; 75) de los grupos inyectados con escopolamina y con solución salina de la parte D y E de la figura.

#Diferencias significativas entre las diferencias de latencias por prueba de comparaciones múltiples de Dunns/ por prueba para muestras no apareadas de Mann Whitney (# $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$)

En síntesis, la administración de escopolamina intrahipocampo inmediatamente después del entrenamiento en SD-IA, fue amnésica tanto para la STM como para la LTM de la tarea. La doble exposición al campo abierto rescató tanto la traza de STM como de la LTM luego de administración de escopolamina.

IV.2 EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS PROTEICA SOBRE LA MODULACIÓN DE LA MEMORIA DE SD-IA.

Efecto sobre la reversión de la amnesia de SD-IA por la doble exposición al OF

Se ha propuesto que la inducción de la LTP está asociada con la formación de una “etiqueta sináptica” en aquellas sinapsis que fueron activadas (mediante la aplicación de un estímulo de tipo tetánico). Esta etiqueta tendría el rol de secuestrar proteínas vinculadas con plasticidad sináptica, que servirían para estabilizar aquellos cambios sinápticos transitorios, de manera que esos cambios extenderían su persistencia. Es decir, que una LTP temprana podría ser transformada en una LTP tardía dependiendo de la historia de activación de la neurona durante el período previo y posterior (dentro de un intervalo de 2 horas aproximadamente) [177]. Como la LTP es un proceso que se postula como mecanismo que subyace a los procesos de memoria y aprendizaje, esta posibilidad de modificar la persistencia de la LTP podría ser un proceso que permitiría extender la ventana temporal para la transformación de un STM en una LTM [177].

Ha sido reportado que un entrenamiento débil en evitación inhibitoria, que normalmente no genera memoria de largo plazo, pudo generarla cuando se lo realizó dentro de un periodo próximo a la exploración de un campo abierto. Los autores postularon que el efecto promotor del campo abierto sobre la memoria de evitación inhibitoria estaría mediado por la síntesis de proteínas vinculadas con plasticidad sináptica [170].

Con el objetivo de **empezar a investigar si se requería síntesis *de novo* de proteínas en el hipocampo, para que tengan lugar los efectos aquí reportados de la exposición al OF sobre la amnesia de SD-IA instigada por escopolamina**, utilizamos el inhibidor de la síntesis proteica anisomicina.

Para ello, previamente investigamos si había algún efecto de anisomicina sobre la adquisición/consolidación de la memoria de SD-IA, cuando es administrada en el hipocampo dorsal 1 h 30 min antes del entrenamiento.

El diseño experimental completo fue el siguiente:

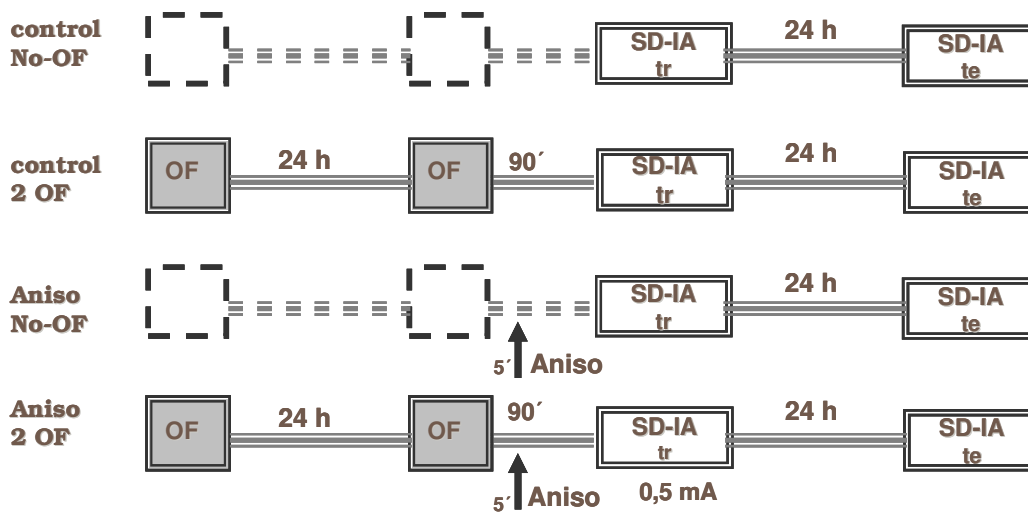


Fig 4.4: Efecto de la inhibición de la síntesis proteica sobre la modulación de la memoria de SD-IA. Efecto sobre la reversión por la doble exposición al OF, de la amnesia de SD-IA causada por anisomicina.

Esquema del diseño experimental para evaluar el efecto sobre el desempeño en la SD-IA de la inyección de anisomicina intrahipocampo, cuando se expone o no al OF. Los grupos de ratas hembra fueron entrenados en SD-IA con un choque de 0,5 mA. La flecha indica el momento en que se inyectó anisomicina (5 min después de la segunda sesión de OF).

Para los animales que fueron expuestos a dos sesiones de OF, en la segunda sesión hubo disminución significativa de los cruces y de las elevaciones sobre los miembros posteriores ($p < 0,01$, para los cruces y $p < 0,05$ para las elevaciones, por prueba de t para datos apareados), por lo que consideramos que reconocieron la arena, habiéndose habituado a ella.

Se evaluó el desempeño en SD-IA de cuatro grupos de ratas hembra expuestas o no a dos sesiones de OF, de 3 min cada una, realizadas 24 h y 1 h 30 min antes del entrenamiento en SD-IA con un estímulo de 0,5 mA (grupos OF y grupos No-OF). Algunos animales fueron inyectados con anisomicina (0,8 μ l de 100 μ g/ μ l) en el hipocampo dorsal (grupos aniso) 1 h 25 min antes del entrenamiento en SD-IA (es decir, 5 min después de la sesión de OF), mientras que otros animales no recibieron inyección alguna.

En la figura 4.4, las barras corresponden a las medianas de las latencias de descenso de la plataforma a la grilla para los animales que pasaron previamente por el campo abierto (grupos OF, barras rayadas), y para los no expuestos al campo abierto (grupos No-OF, barras vacías), inyectados en hipocampo dorsal con 0,8 μ l de anisomicina 100 μ g/ μ l (barras grises) y animales control (barras blancas).

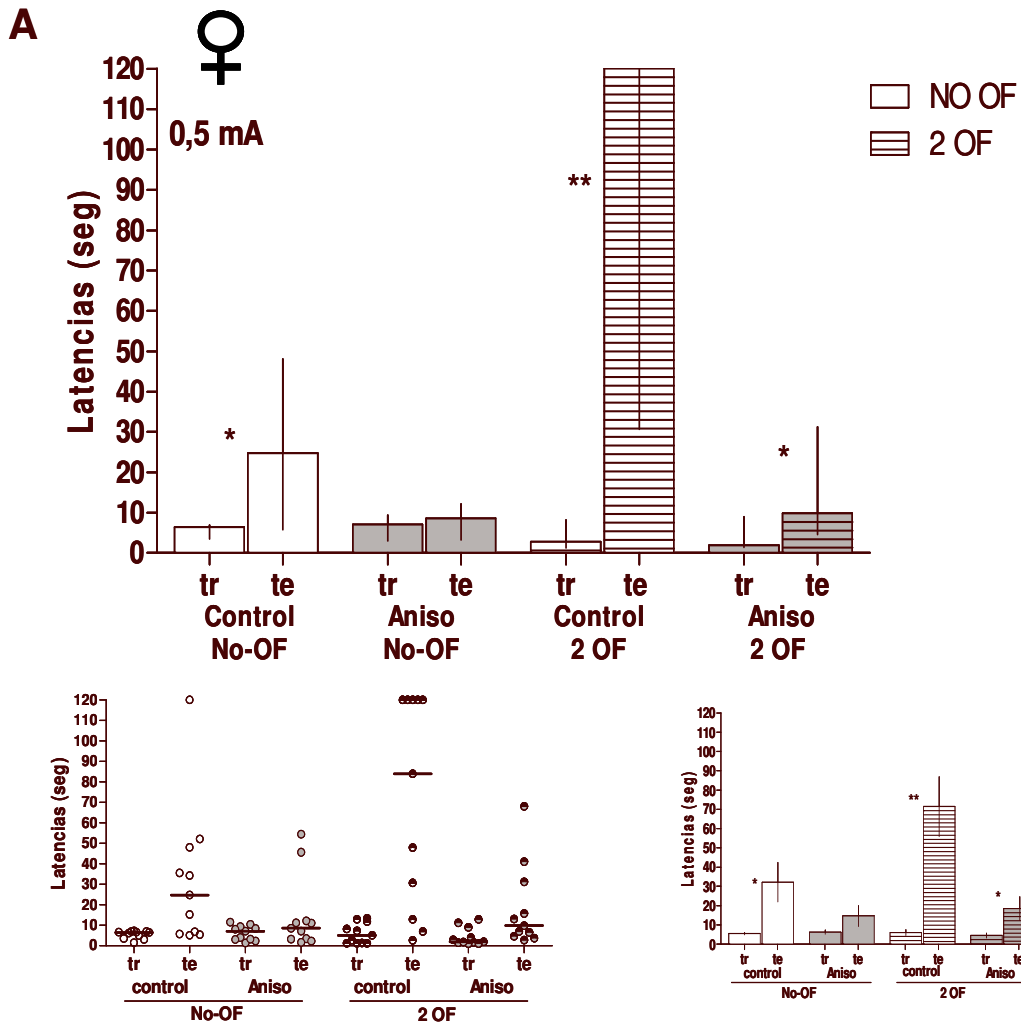


Fig 4.4: Efecto de la inhibición de la síntesis proteica sobre la modulación de la memoria de SD-IA. Efecto sobre la reversión por la doble exposición al OF, de la amnesia de SD-IA causada por anisomicina.

A: Los gráficos de barras corresponden al desempeño en SD-IA de grupos de animales expuestos a dos sesiones de campo abierto (barras rayadas) y de grupos que no fueron expuestos al OF (barras vacías). A su vez se compara el desempeño de animales control que no recibieron inyección alguna (barras blancas) con los grupos “anisomicina” que fueron inyectados intrahipocampo con 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ anisomicina (barras grises) 95 min antes del entrenamiento en SD-IA, y para los animales expuestos a 2 OF, 5 min luego de la 2da sesión. Las barras representan medianas de latencias con sus rangos intercuartiles (25; 75)

tr: latencia de entrenamiento; te: latencia de test.

Paneles inferiores: gráfico de *scatter* (izquierda); y representación paramétrica de los datos (media y error estándar, derecha).

N=11 para todos los grupos.

*Diferencias significativas entre entrenamiento y test; prueba para datos apareados de Wilcoxon (*p<0,05. **p<0,01).

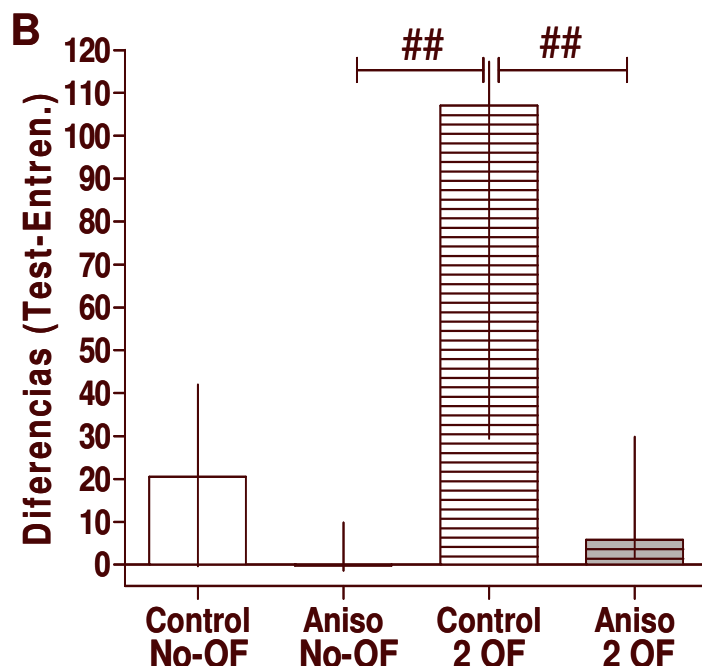


Fig 4.4: Efecto de la inhibición de la síntesis proteica sobre la modulación de la memoria de SD-IA. Efecto sobre la reversión por la doble exposición al OF, de la amnesia de SD-IA causada por anisomicina.

B. Diferencias de latencias (test-entrenamiento) con sus rangos intercuartiles (25; 75) tanto de los grupos inyectados con anisomicina, y de los grupos naive de la parte A de la figura.

Diferencias significativas entre las diferencias de latencias por prueba no pareada de Mann Whitney. (## $p < 0,01$).

Las latencias durante el test, 24 h después del entrenamiento, fueron significativamente mayores que las del entrenamiento para los dos grupos expuestos previamente al OF - tanto el de animales inyectados con anisomicina como el control -, y para el grupo control que no fue expuesto al OF ($p < 0,05$ para el grupo con 2 OF inyectado con anisomicina y para el grupo control No-OF; $p < 0,01$ para el grupo control con 2 OF, [N=11] para cada grupo; por prueba para muestras apareadas de Wilcoxon) (Fig 4.4 A). En cambio, para el grupo de ratas inyectadas con anisomicina pero no expuestas al OF, las latencias del test no fueron significativamente distintas de las del entrenamiento ($p > 0,05$; por prueba para muestras apareadas de Wilcoxon, N=11), es decir que la anisomicina habría causado amnesia de la SD-IA.

Se detectaron diferencias significativas en la comparación de las diferencias de latencias de los cuatro grupos ($p < 0,05$, comparación de las diferencias de latencias [test-entrenamiento], Kruskal Wallis ANOVA) (fig. 4.4 B).

El grupo control expuesto a 2 sesiones de OF evidenció un desempeño significativamente mejor que los dos grupos inyectados con anisomicina, expuestos o no al OF ($p < 0,01$, comparación de

diferencias de latencias [test - entrenamiento] del grupo OF control vs. No-OF aniso; y vs. OF aniso; por prueba de Mann Whitney para datos no apareados). Es decir que, como se mencionó más arriba, anisomicina inyectada 1 h 25 min antes del entrenamiento, deterioró la formación de la memoria de SD-IA testeada a las 24 horas.

El grupo control, expuesto a dos sesiones de campo abierto, mostró una tendencia de un mejor desempeño respecto de los animales control no expuestos al campo abierto, aunque no hubo diferencias estadísticamente significativas, al igual que en ensayos anteriores ($p= 0,088$; comparación de diferencias de latencias [test - entrenamiento] del grupo OF control vs. No-OF control; por prueba de Mann Whitney para datos no apareados).

En otras palabras, la inhibición de las síntesis de proteínas en hipocampo desde 1 h 25 min antes del entrenamiento, fue amnésica para la tarea de SD-IA. Dicha amnesia fue superada por la previa exposición a 2 sesiones en el OF, aunque las latencias en ese caso fueron significativamente menores a las de los controles expuestos a 2 sesiones de OF, por lo que se puede sugerir que la recuperación no habría sido completa, como pareció en el caso del bloqueo muscarínico por escopolamina.

En resumen: anisomicina administrada antes del entrenamiento en SD-IA en hipocampo afectó la adquisición y/o consolidación de esta tarea, provocando amnesia. Dicho deterioro pudo ser superado por la previa exposición a dos sesiones de campo abierto, ya que se verificó la expresión de LTM en esas ratas. Sin embargo, los controles que pasaron por el OF tuvieron un desempeño en el test significativamente mejor al del grupo inyectado con anisomicina también expuesto al OF. Entonces podemos considerar que la reversión del efecto de la droga habría sido parcial. Se puede especular, por ejemplo, que las dos sesiones de OF habrían sido suficientes para superar un posible efecto amnésico de anisomicina a nivel de la adquisición/consolidación de SD-IA, aunque la droga podría haber anulado el efecto promotor del OF, pero se requieren evidencias *ad hoc* para esclarecer los mecanismos involucrados. Entonces se estudió si el efecto promotor del OF sobre la SD-IA dependía de la síntesis proteica que se desencadena durante la segunda sesión de OF. Para ello se administró anisomicina en el hipocampo dorsal 2 h antes del entrenamiento, 30 min antes de la segunda exposición al OF.

El diseño experimental completo fue el siguiente:

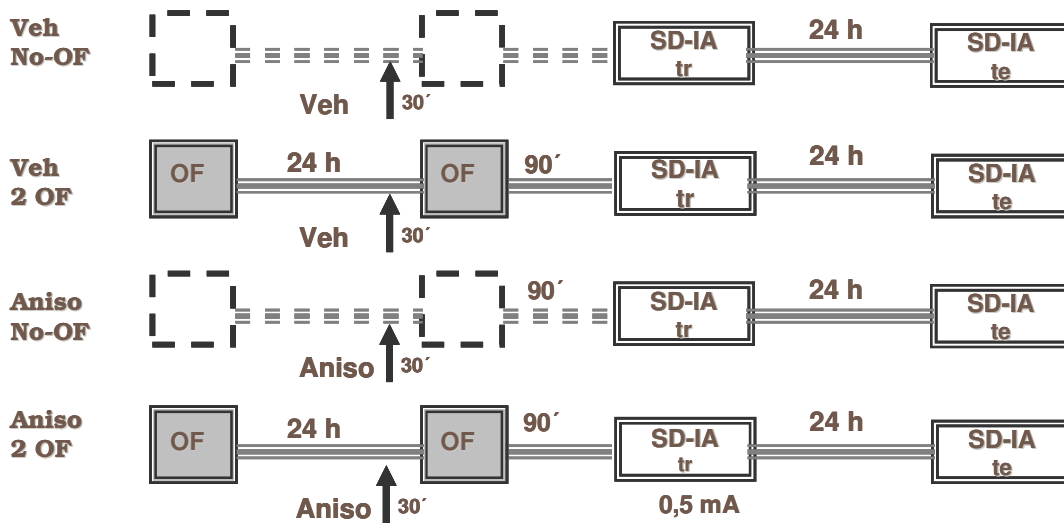


Fig 4.4 C: Efecto de la inhibición de la síntesis proteica sobre la modulación de la memoria de SD-IA. Efecto sobre la reversión por la doble exposición al OF, de la amnesia de SD-IA causada por anisomicina.

Esquema del diseño experimental para evaluar el efecto sobre el desempeño en la SD-IA de la inyección de anisomicina intrahipocampo, cuando se expone o no al OF. Los grupos de ratas hembra fueron entrenados en SD-IA con un choque de 0,5 mA. La flecha indica el momento en que se inyectó anisomicina o vehículo (2 h antes del entrenamiento en SD-IA, y para los animales expuestos al OF, 30 min antes de la segunda sesión).

Las latencias durante el test, 24 h después del entrenamiento, fueron significativamente mayores que las del entrenamiento para todos los grupos estudiados ($p < 0,05$ para el grupo No-OF inyectado con anisomicina [N=8]; $p < 0,01$ para los grupos inyectados con vehículo No-OF [N=8] y con 2 OF [N=10] y para el grupo vehículo No-OF [N=9]; por prueba para muestras apareadas de Wilcoxon) (Fig 4.4 C). Se detectaron diferencias significativas en la comparación de las diferencias de latencias de los cuatro grupos ($p < 0,01$, comparación de las diferencias de latencias [test-entrenamiento], Kruskal Wallis ANOVA). El grupo inyectado anisomicina no expuesto al OF evidenció un desempeño significativamente más pobre que de los grupos los grupos inyectados con anisomicina expuesto al OF, o que aquel inyectado con vehículo no expuesto al OF ($p < 0,05$ comparación de diferencias de latencias [test - entrenamiento] para grupo aniso No-OF vs .vehículo No- OF, $p < 0,001$ para grupo aniso No-OF vs. aniso 2 OF; por prueba de Mann Whitney para datos no apareados) (fig. 4.4 D). Es decir que la inyección de anisomicina, 2 h antes del entrenamiento, si bien dio lugar a la formación de una LTM de SD-IA, produjo un deterioro sobre esta memoria que pudo ser superado por la previa exposición a dos sesiones de OF.

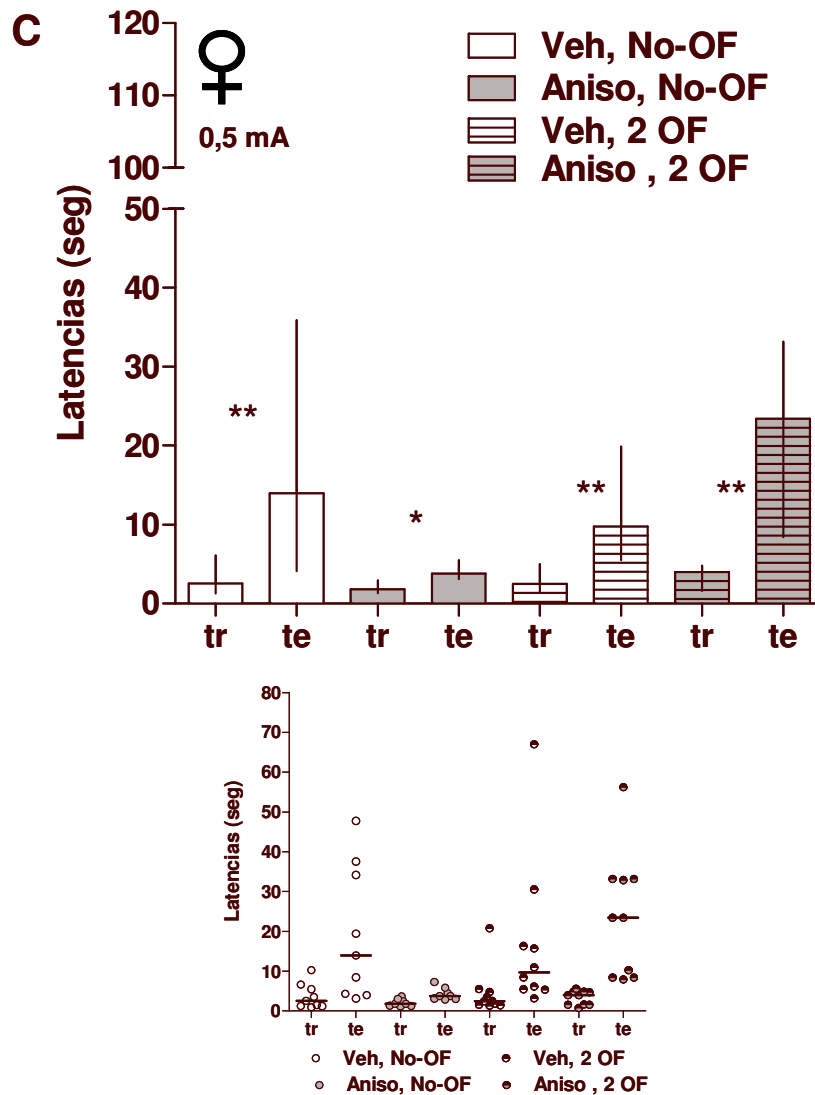


Fig 4.4 C: Efecto de la inhibición de la síntesis proteica sobre la modulación de la memoria de SD-IA. Efecto sobre la reversión por la doble exposición al OF, de la amnesia de SD-IA causada por anisomicina.

A: Los gráficos de barras corresponden al desempeño en SD-IA de grupos de animales expuestos a dos sesiones de campo abierto (barras rayadas) y de grupos que no fueron expuestos al OF (barras vacías). A su vez se compara el desempeño de animales control que recibieron inyección de vehículo (barras blancas) con grupos fueron inyectados intrahipocampo con 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ anisomicina (barras grises) 2 h antes del entrenamiento en SD-IA (30 min antes de la 2da sesión de OF). Las barras representan medianas de latencias con sus rangos intercuartiles (25; 75)

tr: latencia de entrenamiento; **te:** latencia de test.

Paneles inferiores: gráfico de *scatter* (abajo).

Grupos No-OF: Vehículo N=9 y Anisomicina N=8; Grupos 2 OF: Vehículo y Anisomicina: N=10.

Diferencias significativas entre entrenamiento y test; prueba para datos apareados de Wilcoxon ($p < 0,05$. ** $p < 0,01$).

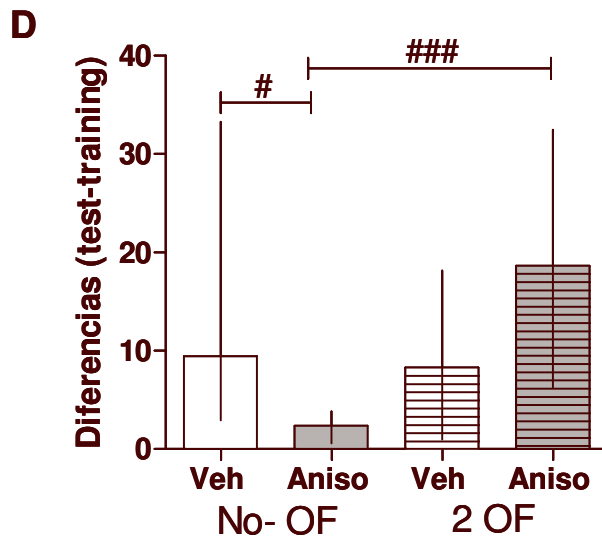


Fig 4.4: Efecto de la inhibición de la síntesis proteica sobre la modulación de la memoria de SD-IA. Efecto sobre la reversión por la doble exposición al OF, de la amnesia de SD-IA causada por anisomicina.

D: Diferencias de latencias (test-entrenamiento) con sus rangos intercuartiles (25; 75) tanto de los grupos inyectados con anisomicina, y de los grupos naive de la parte C de la figura.

Diferencias significativas entre las diferencias de latencias por prueba no pareada de Mann Whitney. (# $p < 0,05$; ### $p < 0,001$).

En otras palabras, la inhibición de las síntesis de proteínas en hipocampo 2 h o 1 h 25 min antes del entrenamiento, fue amnésica para la tarea de SD-IA. Dicha amnesia fue superada por la previa exposición a 2 sesiones en el OF. Cuando la anisomicina fue inyectada 1 h 25 min antes del entrenamiento, las latencias en ese caso fueron significativamente menores a las de los controles expuestos a 2 sesiones de OF, por lo que se puede sugerir que la recuperación no habría sido completa, como pareció en el caso de que la inyección se realizó 35 min antes, o cuando se bloquearon los receptores muscarínicos por escopolamina.

Con estos resultados, intentamos **comenzar a investigar si la modulación positiva del campo abierto sobre la memoria de SD-IA, que lleva a “suprimir la amnesia retrógrada” instigada por escopolamina durante la consolidación, podría involucrar procesos de síntesis proteica en el hipocampo dorsal.** Sin embargo, debe tenerse presente que anisomicina fue amnésica *per se*.

Se evaluó el desempeño en OF y en SD-IA de acuerdo con el siguiente diseño experimental:

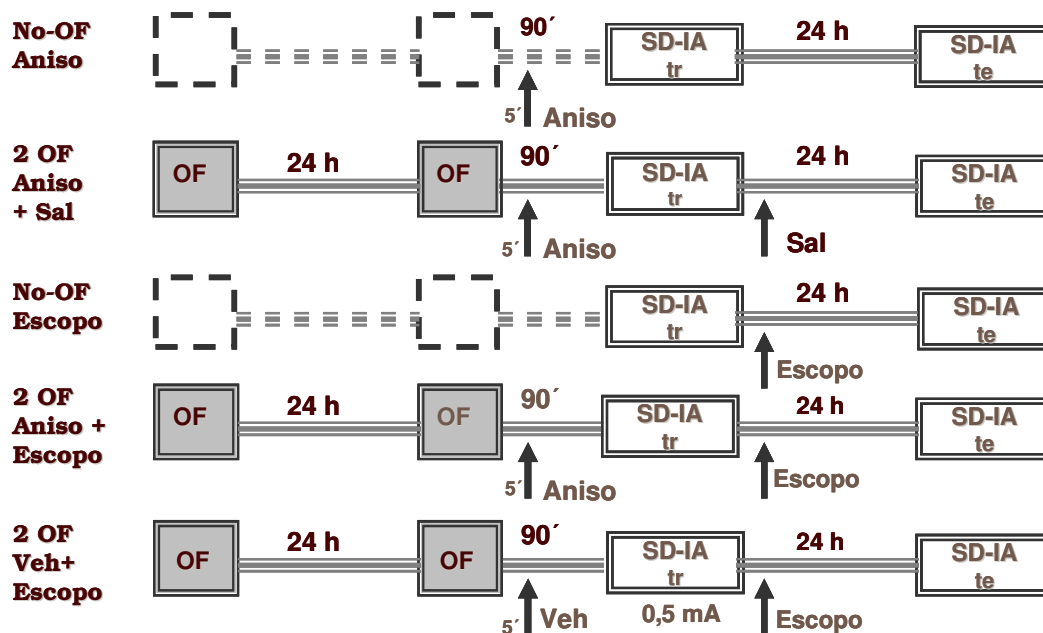


Fig 4.5: Efecto de la inhibición de la síntesis proteica sobre la modulación de la memoria de SD-IA. Efecto sobre la reversión por la doble exposición al OF, de la amnesia de SD-IA causada por escopolamina.

Esquema del diseño experimental para evaluar el efecto sobre el desempeño en la SD-IA de la inyección de anisomicina y/o escopolamina intrahipocampo, cuando se expone o no al OF. La flecha indica el momento en que se inyectó anisomicina/vehículo (5 min luego de la segunda sesión de OF), o bien escopolamina/salina (inmediatamente después del entrenamiento en SD-IA).

Se formaron tres grupos de ratas hembras que fueron expuestas a 2 sesiones de 3 min en el OF, realizadas como es habitual, 24 h y 1 h 30 min antes del entrenamiento en SD-IA. En la segunda sesión de campo abierto hubo disminución significativa del número de cruces y de elevaciones sobre los miembros posteriores ($p < 0,01$ para los cruces, y $p < 0,05$ para las elevaciones, por prueba de t para datos apareados) (ver tabla 4.5). Estos resultados permiten considerar que los animales se habituaron a la arena (como ocurrió generalmente).

Tabla 4.5: Desempeño en el OF de las ratas hembra del ensayo de la figura 4.6 (grupos 2 OF).

Campo abierto	Cruces		Elevaciones		Acicalamientos	
	1° sesión	2° sesión	1° sesión	2° sesión	1° sesión	2° sesión
(Media ± ES)	88,62 ± 4,05**	72,10 ± 3,42**	29,43 ± 1,98*	24,62 ± 1,38*	0,76 ± 0,25*	1,68 ± 0,28*

Se muestran las medias y su error estándar para los distintos parámetros registrados.

* Diferencias significativas para el parámetro correspondiente, entre la primera y segunda sesión, prueba de t para datos apareados (*p<0,05; **p<0,01).

Luego de la segunda sesión en el OF, las mismas ratas fueron inyectadas intrahipocampo con anisomicina/vehículo, y luego entrenadas en SD-IA y nuevamente recibieron inmediatamente una inyección intrahipocampo del vehículo o de escopolamina (fig 4.5).

Dos grupos de ratas que no fueron expuestas al OF se entrenaron directamente en SD-IA, con igual protocolo que las ratas expuestas al OF: durante el entrenamiento recibieron un choque de 0,5 mA al descender de la plataforma; como es habitual, a las 24 h se realizó el test. En uno de estos grupos las ratas fueron inyectadas en hipocampo dorsal con 0,8 µl/lado de anisomicina 100 µg/µl, 1 h 25 min antes del entrenamiento en SD-IA (grupo No-OF + aniso). En el otro grupo, los animales fueron inyectados con escopolamina luego del entrenamiento en SD-IA (grupo No-OF + escopo), para controlar el efecto amnésico de esta droga. También se inyectó escopolamina post-entrenamiento en uno de los grupos de animales expuestos a 2 OF (grupo OF + escopo).

En los otros dos grupos expuestos al OF, las ratas fueron inyectadas en hipocampo dorsal también con 0,8 µl/lado de anisomicina 100 µg/µl, o con igual volumen del vehículo, 1 h 25 min antes del entrenamiento en SD-IA (ya que para los animales que fueron expuestos al OF la inyección se administró 5 min luego de la segunda sesión). En uno de estos grupos se inyectó también escopolamina luego del entrenamiento en IA (grupo OF aniso + escopo).

Los controles correspondientes a las inyecciones de droga se hicieron en los tiempos equivalentes, con el vehículo para anisomicina (ver Cap. II, Materiales y Métodos) y con solución salina para escopolamina.

En la figura 4.5 el diagrama de barras representa las medianas de las latencias de descenso a la grilla de los animales que pasaron previamente por el OF (grupos OF, barras rayadas), y de los que no fueron expuestos al OF (grupos No-OF, barras vacías); tratados con 8 µg de escopolamina intrahipocampo (barras grises), o inyectados con 80 µg (0,8 µl de 100 µg/µl) de anisomicina intrahipocampo (barras blancas).

Las latencias durante el test fueron significativamente mayores que las del entrenamiento en SD-IA, para los tres grupos expuestos a las dos sesiones previas en el OF (p<0,05 para el grupo con anisomicina [N=21]; p<0,01, para el grupo con anisomicina y escopolamina [N=16], y para el grupo con escopolamina [N=15]; por prueba para muestras apareadas de Wilcoxon). En cambio,

para los grupos no expuestos al OF, inyectados con escopolamina o con anisomicina, las latencias de test no fueron significativamente distintas de las del entrenamiento ($p > 0,05$, tanto para el grupo inyectado con escopolamina [N=7], como para el grupo inyectado con anisomicina [N=11]; por prueba para muestras apareadas de Wilcoxon). En el caso de escopolamina, que fue inyectada luego del entrenamiento en IA, podemos afirmar que el efecto amnésico se habría producido durante la consolidación, mientras que en los animales inyectados con anisomicina antes del entrenamiento en SD-IA, la amnesia podría haber sido causada por un efecto sobre la adquisición y/o sobre la consolidación. En ambos casos no se evidenció la formación de una LTM de la tarea.

El desempeño en SD-IA de los animales expuestos a 2 OF, inyectados con vehículo y escopolamina, fue significativamente mejor respecto de los grupos no expuestos al OF, tanto de los inyectados con anisomicina, como de los inyectados con escopolamina ($p < 0,05$ Kruskal Wallis ANOVA, $p < 0,05$ para diferencias de latencias del grupo 2 OF + escopo *vs.* grupo No-OF escopo; o *vs.* grupo No-OF aniso, por prueba para muestras no apareadas de Mann Whitney) (fig 4.5 B). Además, el grupo de animales expuestos a 2 OF, inyectados con ambas drogas, anisomicina y escopolamina, tuvo un desempeño significativamente mejor al del grupo no expuesto al OF inyectado solamente con escopolamina ($p < 0,01$ para diferencias de latencias del grupo OF ani + escopo *vs.* grupo No-OF escopo, prueba para muestras no apareadas de Mann Whitney) (fig 4.5 B). El grupo inyectado con escopolamina + anisomicina expuesto a 2 OF, mostró una tendencia de un mejor desempeño comparado con el grupo inyectado solamente con anisomicina no expuesto al OF, aunque no fue significativa, ($p = 0,0532$, para diferencias de latencias por prueba para muestras no apareadas de Mann Whitney) (fig 4.5 B).

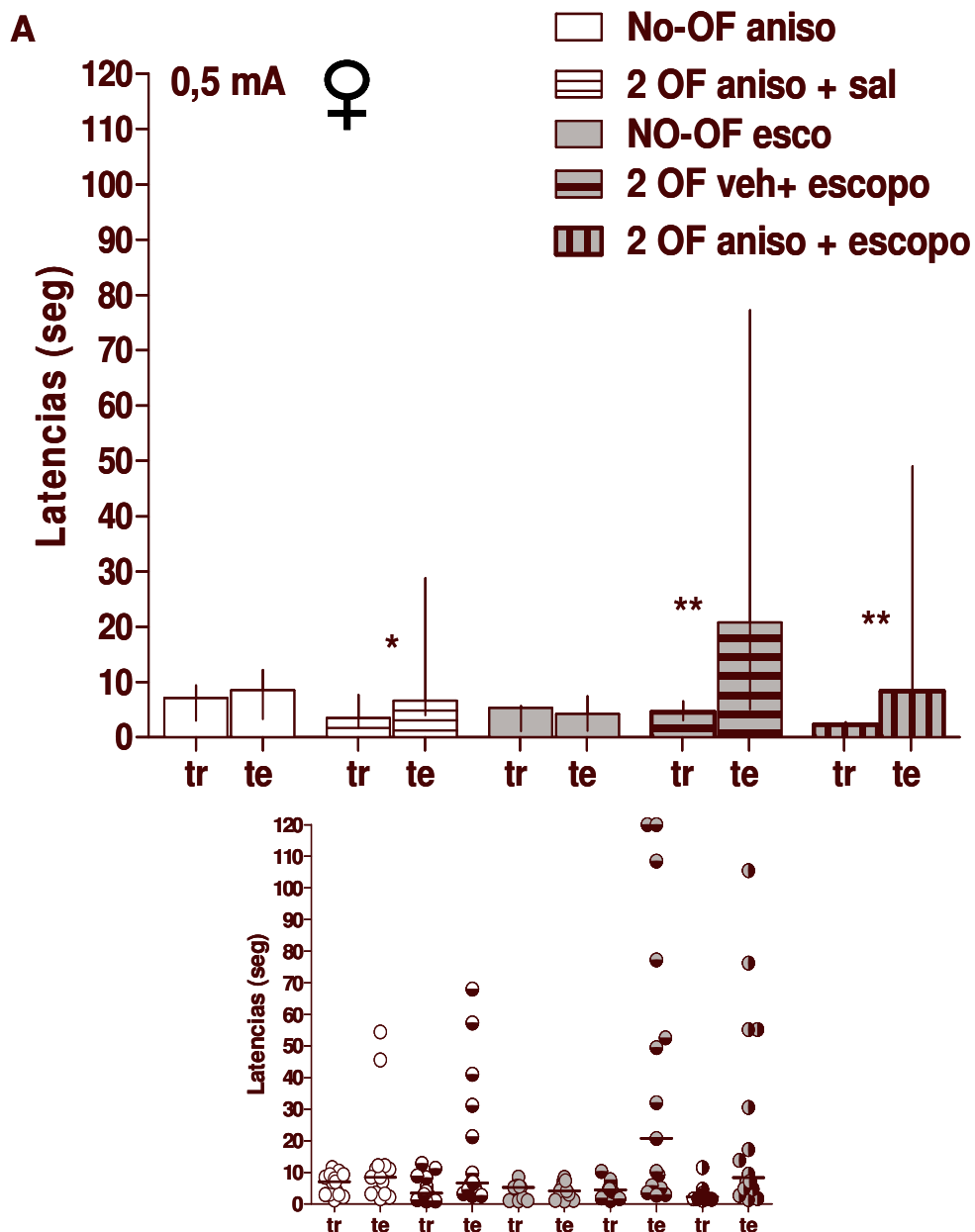


Fig 4.5: Efecto de la inhibición de la síntesis proteica sobre la modulación de la memoria de SD-IA. Efecto sobre la reversión por la doble exposición al OF, de la amnesia de SD-IA causada por escopolamina.

Se evaluó el efecto de la inyección de anisomicina y/o escopolamina intrahipocampo sobre el desempeño en la SD-IA, cuando se expone o no al OF. Los grupos de ratas hembra fueron entrenados en SD-IA con un choque de 0,5 mA.

A: El diagrama de barras corresponde al desempeño en SD-IA de grupos de animales expuestos a dos sesiones de campo abierto (barras rayadas) y de grupos que no fueron expuestos al OF (barras vacías).

En cada caso se inyectó intrahipocampo en dos ocasiones: luego de la 2da sesión de OF se inyectó con 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ anisomicina (barras blancas) o vehículo; y luego del entrenamiento de SD-IA: se inyectó con solución salina u 8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ escopolamina (escopo, barras grises) o solución salina. Las barras representan medianas de latencias con sus rangos intercuartiles (25; 75)

tr: latencia de entrenamiento; te: latencia de test.

Panel inferior: gráfico de *scatter*

Grupos No-OF: aniso N=14 y escopo N=10.

Grupos 2 OF: Aniso+sal N=16; Veh+escopo N=15 y Ani+escopo=16 .

* Diferencias significativas entre entrenamiento y test; prueba para datos apareados de Wilcoxon (* $p < 0,05$. ** $p < 0,01$).

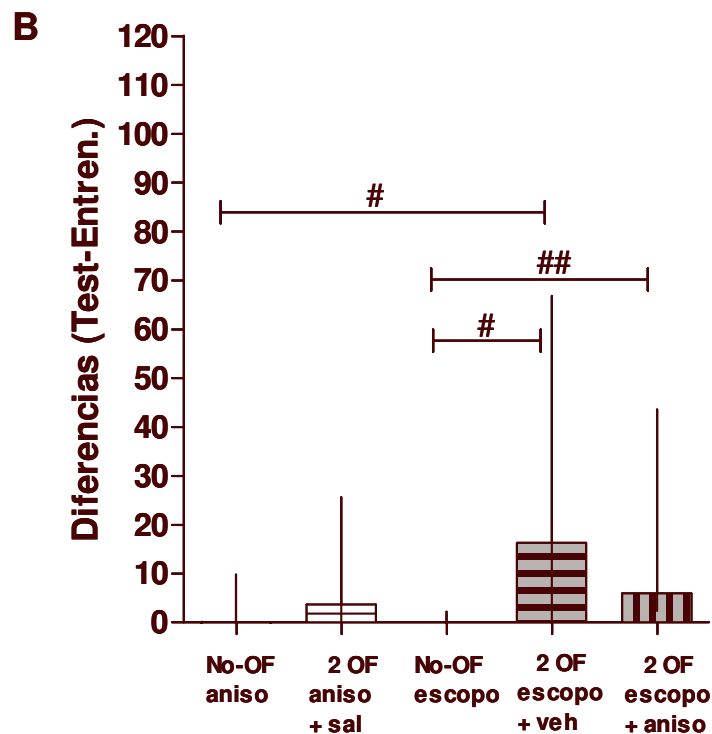


Fig 4.5: Efecto de la inhibición de la síntesis proteica sobre la modulación de la memoria de SD-IA. Efecto sobre la reversión por la doble exposición al OF, de la amnesia de SD-IA causada por escopolamina

B: Diferencias de latencias (test-entrenamiento) con sus rangos intercuartiles (25; 75) de los grupos de animales inyectados con escopolamina y/o anisomicina y/o con solución salina y/o vehículo de la parte A de la figura.

Diferencias significativas entre las diferencias de latencias, prueba no pareada de Mann Whitney (# $p < 0,05$; ## $p < 0,01$).

Resumiendo: tanto la anisomicina como la escopolamina inyectadas en el hipocampo, afectaron el desempeño en SD-IA, lo que se puso de manifiesto en el test 24 h después. La escopolamina afectó, como era de esperar, la consolidación de la memoria y, en consecuencia, fue amnésica. Como ya se mencionó, anisomicina inyectada 1 h 25 min antes del entrenamiento en SD-IA, también fue amnésica, pero pudo haber afectado la adquisición y/o la consolidación de la memoria. Dicha amnesia por anisomicina fue superada (revertida parcialmente?) cuando se expuso a los animales a

dos sesiones de OF, previas a la inyección y al entrenamiento (fig. 4.5). En esas condiciones hubo formación de LTM. Por otra parte, la superación del efecto amnésico de la escopolamina por exposición previa a 2 OF, pareció ser muy conspicua revirtiéndose completamente, ya que el desempeño de esos animales no fue diferente del de los controles. De todas formas, hay que tomar en consideración que el tratamiento con anisomicina podría estar afectando tanto la adquisición como la consolidación, así como podría interferir el efecto promotor del segundo OF, realizado pocos minutos antes; mientras que el tratamiento con escopolamina es posterior a la adquisición de SD-IA, por lo que sólo estaría afectando el proceso de consolidación de la memoria de esta tarea. El grupo que se infundió con anisomicina y escopolamina, y que antes fue expuesto a 2 sesiones de OF, mostró un desempeño muy similar al de los otros grupos expuestos a 2 sesiones de OF, tanto el inyectado con anisomicina, como el tratado con escopolamina. Aún cuando no hubo diferencias significativas entre estos grupos con 2 OF, en el gráfico de *scatter* correspondiente (fig. 4.5) se puede observar que más animales del grupo tratado con escopolamina, parecieron haber formado una memoria robusta de la tarea (ver gráfico de *scatter*, fig. 4.5).

Con estos resultados podemos sugerir que el deterioro causado por anisomicina y escopolamina no fue aditivo, ya que el grado de reversión del efecto de ambas drogas, en los animales que pasaron por 2 sesiones de OF, fue similar al efecto cuando sólo se infundió una de las drogas.

Aún cuando la anisomicina fue capaz de provocar amnesia *per se*, su administración no bloqueó (totalmente?) el efecto promotor de la exposición al OF sobre la memoria de SD-IA, al menos en las dosis utilizadas y en los tiempos en que se administró.

IV.3 TAREA DE EVITACION INHIBITORIA POR PASAJE DE COMPARTIMIENTO (ST-IA)

Efecto de campo abierto sobre la amnesia por escopolamina administrada intrahipocampo en la consolidación de la memoria de ST-IA (en ratas macho).

Como se recordará (Materiales y métodos, pag 58) en la versión de la tarea de evitación inhibitoria de descenso desde una plataforma (SD-IA), el animal es colocado en una plataforma angosta y elevada, de la cual suele descender muy rápidamente, dificultando la asociación entre el contexto (CS) y el estímulo aversivo (US) [364]. En la SD-IA, cuando se entrenó con intensidades de choque que pueden ser consideradas “suaves” (como 0,5 y 0,6 mA) los valores de latencias de test fueron bajos, comparados a los obtenidos en ST-IA para igual intensidad de choque. Cuando se entrenó en ST-IA con un estímulo, considerado “suave” para la SD-IA, se obtuvo un mejor desempeño. El la intensidad de choque umbral fue menor para la ST-IA que para la SD-IA. En ST-IA (Materiales y métodos, pag 58) se supone que los 15 segundos previos a que se abra la puertaguillotina, así como el espacio “más confortable” en que se encuentra el animal, servirían para independizar relativamente la prueba de la “novedad” que representa la primera exposición a la

caja de entrenamiento, por un lado, así como de la manipulación por el experimentador, tal vez manteniendo más bajo el nivel de estrés generado por dicha manipulación, por el otro. Todo ello permitiría obtener valores de latencias de test más altos, comparados a los obtenidos en SD-IA para igual intensidad de choque.

Quisimos investigar si los efectos farmacológicos detectados en SD-IA podían generalizarse para las tareas asociativas con componentes espaciales y aversivos, del tipo de la evitación inhibitoria ST-IA.

De modo similar a los ensayos que habíamos desarrollado en SD-IA, y con el objetivo de investigar si los fenómenos detectados podían generalizarse para tareas dependientes del hipocampo, con componentes aversivos, decidimos evaluar el efecto del bloqueo de los receptores muscarínicos con escopolamina, sobre el desempeño en ST-IA con y sin previa exposición al campo abierto.

La mitad de un lote de ratas macho fueron expuestas a dos sesiones de OF de 3 min cada una, realizadas como siempre 24 h y 1 h 30 min antes del entrenamiento, esta vez en ST-IA (grupos OF). En la segunda sesión de OF hubo disminución significativa de las elevaciones sobre los miembros posteriores ($p < 0,05$ por prueba de t para datos apareados)

Durante el entrenamiento en ST-IA los animales recibieron un choque eléctrico en las patas de 0,5 mA al ingresar al compartimiento oscuro. Inmediatamente después del entrenamiento en ST-IA fueron inyectados intrahipocampo con 8 μ g de escopolamina en un volumen final de 1 μ l por hipocampo, o con vehículo (solución salina). A las 24 h se realizó el test.

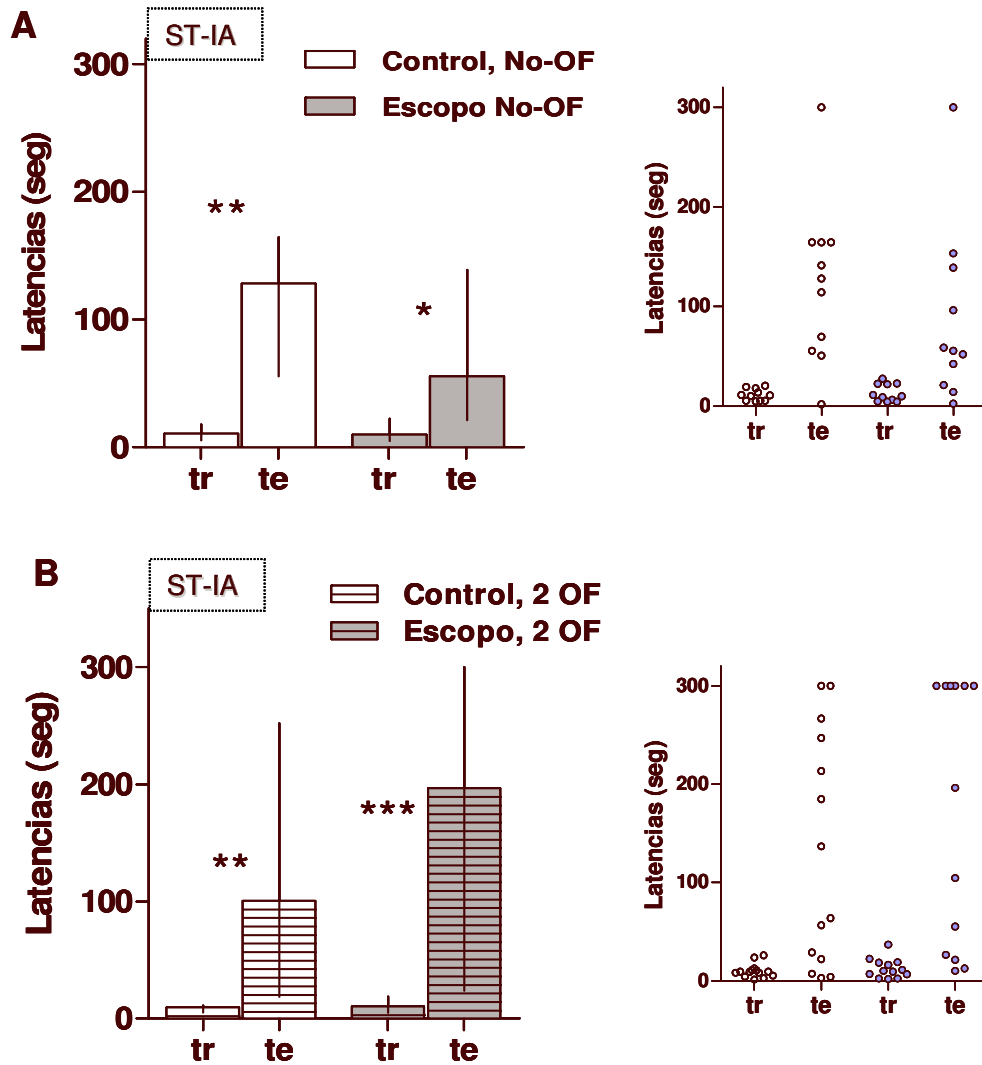
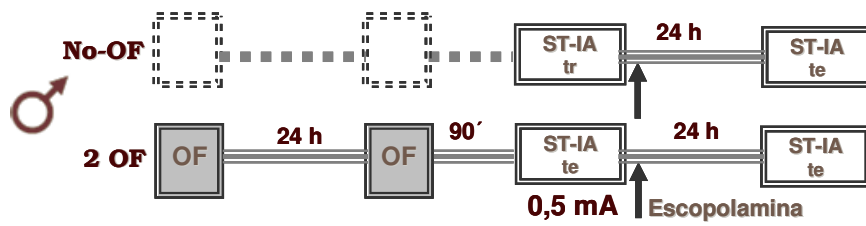


Fig 4.6: Efecto de campo abierto sobre la amnesia por escopolamina administrada intrahipocampo en la consolidación de la memoria de ST-IA: en ratas macho.

Arriba: Esquema del diseño de los experimentos para evaluar el efecto de escopolamina intrahipocampo, cuando hubo o no exposición previa al OF, sobre el desempeño en ST-IA. La flecha indica el momento en que se inyectó intrahipocampo solución salina u 8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de escopolamina.

A y B: Los gráficos de barras corresponden a las medianas de latencias con sus rangos intercuartiles (25; 75) obtenidas por los grupos de ratas macho que fueron entrenadas con choque de 0,5 mA en ST-IA. Las ratas expuestas a dos sesiones de campo abierto (grupo 2 OF, barras rayadas, **B**) y las que no fueron expuestas al OF (grupo No-OF, barras vacías, **A**). En cada caso se inyectó intrahipocampo con solución salina (control, barras blancas) u 8 µg/µl escopolamina (escopo, barras grises).

tr: latencia de entrenamiento; **te:** latencia de test.

Paneles laterales: gráfico de *scatter*.

Grupos No-OF: control N=11 y tratado N=11. Grupos 2 OF: control N=14 y tratado N=13.

*Diferencias significativas entre entrenamiento y test; prueba para datos apareados de Wilcoxon (*p<0,05, **p<0,01;***p<0,001).

La figura 4.6 corresponde al desempeño en ST-IA de los distintos grupos mencionados. En las partes A y B de la figura se representan las latencias de ingreso al compartimiento oscuro para los animales que pasaron previamente por dos sesiones en el OF (grupo OF, barras rayadas), y para los que no fueron expuestos al OF (grupo No-OF, barras lisas); y para los grupos de animales inyectados con escopolamina intrahipocampo (barras grises), con los respectivos controles inyectados con salina (barras blancas).

El análisis estadístico mostró que las latencias de ingreso al compartimiento oscuro, durante el test fueron significativamente mayores que las del entrenamiento (p<0,05 para grupo tratado No-OF [N=11]; p<0,01 para grupo control OF [N=14], y para grupo control No-OF, [N=11]; p<0,001 para grupo tratado OF [N=13]; por prueba para muestras apareadas de Wilcoxon). En consecuencia, puede decirse que en todos los grupos se evidenció la formación de LTM. No fueron distintas las diferencias (test-entrenamiento) entre los grupos tratados y controles, expuestos o no al OF. Tampoco fueron distintas las diferencias de latencias entre los grupos con exposición al OF vs. aquellos grupos sin exposición al OF (p>0,05 en la comparación del grupo OF vs. No-OF –tratado y control-; por prueba para muestras no apareadas de Mann Whitney). Las medianas de las latencias del test de los animales tratados con escopolamina, si bien no fueron estadísticamente distintas, mostraron una tendencia a ser mayores en aquellos animales con previa exposición al OF (196,4 seg) y mucho menores para el grupo sin OF (55,5 seg) (ver tabla 4.6).

Tabla 4.6: Efecto del campo abierto sobre la amnesia por escopolamina intrahipocampo de la memoria de ST-IA (en ratas macho).

Latencias del Test	Escopolamina No- OF	Escopolamina 2 OF
Percentilo 25%	21,31	23,91
Mediana	55,47	196,40
Percentilo 75%	139,20	300,00

Mediana con los percentilos 25% y 75% de las latencias del test de los grupos de machos entrenados en ST-IA (*Step Through*), tratados con escopolamina 8 µg/µl intrahipocampo, con y sin exposición previa al campo abierto (OF).

IV.4 RATAS CON CICLO LUZ/OSCURIDAD DERECHO

Efecto del campo abierto sobre la amnesia de SD-IA por escopolamina intrahipocampo, en ratas mantenidas en ciclo luz/oscuridad derecho entrenadas durante su período de sueño.

Hemos comprobado que el campo abierto ejerció un efecto facilitatorio sobre la memoria de SD-IA cuando se entrenaron animales criados en ciclo luz/oscuridad invertido (CI) con un estímulo fuerte (fig 3.8). También demostramos que la doble exposición al OF impidió que se manifestara la amnesia instigada por escopolamina inyectada en el hipocampo, cuando las ratas fueron entrenadas con estimulación umbral (Capítulo IV, figuras 4.2 a 4.3).

Entonces, se decidió estudiar la modulación de la memoria de SD-IA por exposición al OF y la participación de la transmisión colinérgica muscarínica en dicha modulación, en animales criados con el ciclo luz/oscuridad derecho (CD), entrenados durante su período de sueño (día objetivo), teniendo en cuenta que nuestros ensayos se hicieron con ratas CI, pero que la mayor parte de los ensayos reportados por otros autores se hicieron en condiciones de CD (Capítulo I, página 45). La mitad de los animales fueron expuestos a las dos sesiones de campo abierto de 3 min cada una, realizadas 24 h y 1 h 30 min antes del entrenamiento en SD-IA (grupos OF), mientras que los otros animales fueron entrenados directamente en SD-IA sin exposición previa al OF (grupo No-OF) con una intensidad de choque de 0,5 mA durante su fase de sueño. Durante la segunda sesión de campo abierto se observó disminución significativa del número de cruces y de las elevaciones sobre los miembros posteriores ($p < 0,001$ para cruces; $p < 0,05$ para elevaciones; prueba de t para datos apareados) (Fig 4.7 A). Algunas ratas expuestas al OF y otras no expuestas, fueron inyectadas con 8 μ g de escopolamina en 1 μ l por hipocampo, inmediatamente luego del entrenamiento en evitación inhibitoria. Las ratas del grupo control fueron igualmente inyectadas con el mismo volumen de solución salina.

Las partes B y C de la figura 4.7 corresponden al desempeño en la SD-IA de los distintos grupos de animales y muestran las latencias de descenso de la plataforma a la grilla del grupo de animales que pasaron previamente por dos sesiones en el OF (grupo 2 OF, barras rayadas), y de los que no fueron expuestos al OF (grupo No-OF, barras vacías), tratados con escopolamina intrahipocampo (barras grises), con sus respectivos controles inyectados con solución salina (barras blancas). No hubo diferencias significativas en las latencias de entrenamiento entre los grupos ($p > 0,05$; por prueba de Kruskal Wallis, ANOVA de una vía).

A

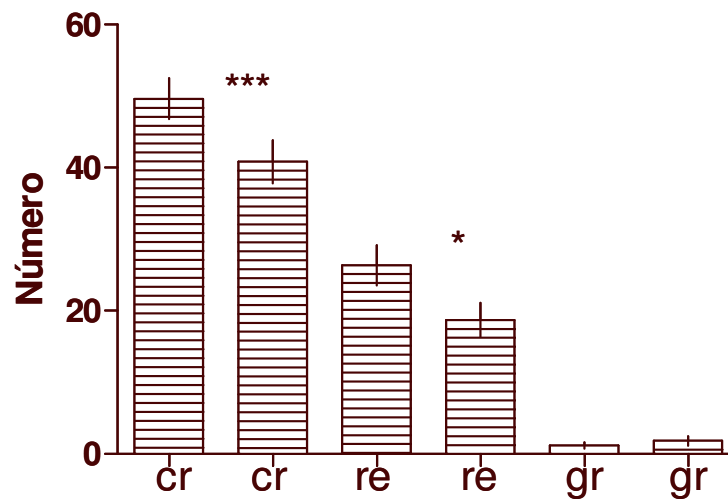


Fig 4.7 A: Desempeño en el campo abierto de ratas macho entrenadas durante su período de sueño. (Luego fueron entrenadas en SD-IA). Las barras representan medias y error estándar del número de cruces (cr), elevaciones sobre las patas traseras, (*rearings*: re) y acicalamientos (*groomings*: gr).

* Diferencias significativas para el parámetro correspondiente, entre la primera y segunda sesión, prueba de t para datos apareados (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$).

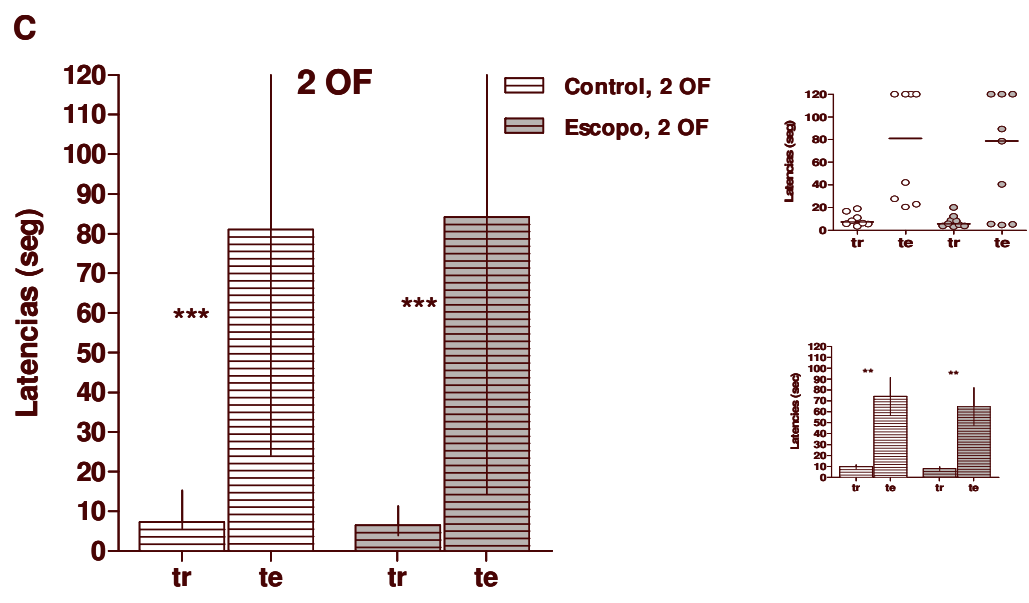
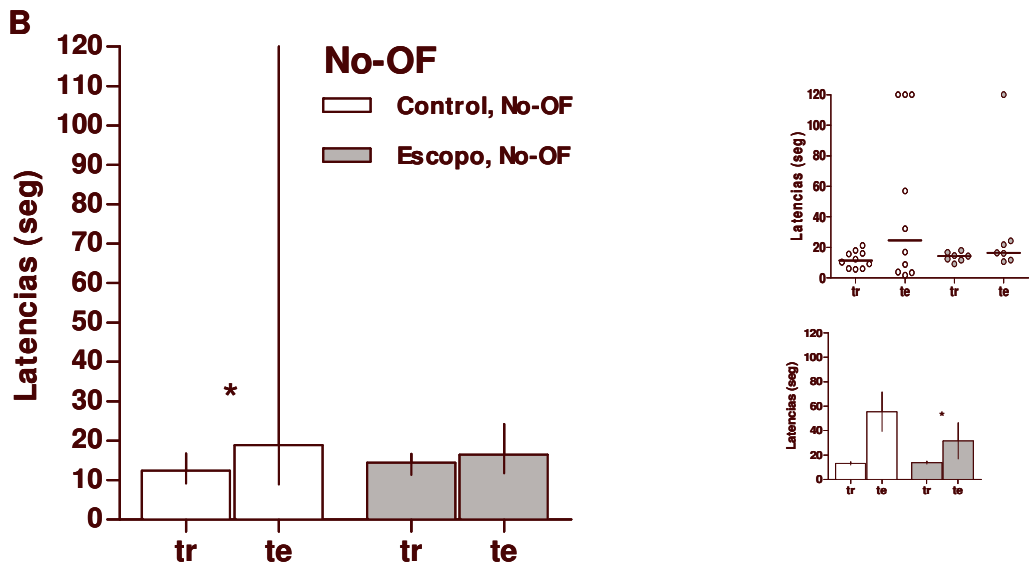
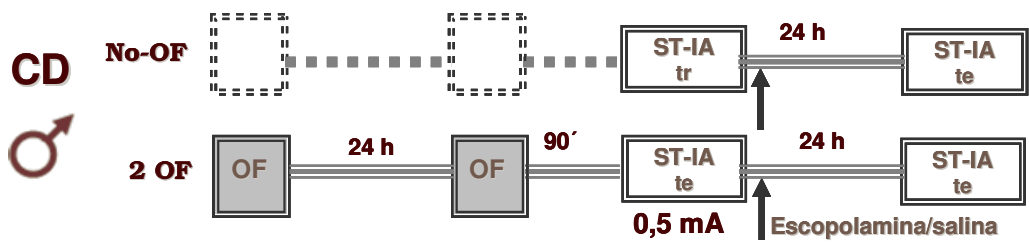


Fig 4.7: Efecto del campo abierto sobre la amnesia por escopolamina administrada intrahipocampo en la consolidación de la memoria de SD-IA, en ratas entrenadas durante su periodo de sueño (mantenidas en ciclo luz/ oscuridad derecho).

Arriba: Esquema del diseño experimental para evaluar el efecto de la escopolamina intrahipocampo, cuando se expone a los animales al OF, sobre el desempeño en la prueba de SD-IA. Se entrenaron en SD-IA grupos de ratas macho, con el ciclo luz oscuridad derecho, con un choque de 0,5 mA. La flecha indica el momento en que se inyectó escopolamina o solución salina.

B y C: Las barras representan medianas de latencias en SD-IA de los grupos de animales expuestos a dos sesiones de campo abierto (grupo 2 OF, barras rayadas, **C**), y de los que no fueron expuestos (No-OF, barras vacías, **B**). En cada caso se los inyectó intrahipocampo con solución salina (control, barras blancas), o escopolamina 8 µg/µl (escopo, barras grises), inmediatamente del entrenamiento en SD-IA con 0,5 mA.

tr: latencia de entrenamiento; **te:** latencia de test.

Paneles laterales a la derecha: gráfico de *scatter dot* (arriba); y representación paramétrica de los datos (media y error estándar, abajo).

Grupos No-OF: control N=11 y tratado N=10. Grupos 2 OF: control N=11 y tratado N=11.

* Diferencias significativas entre entrenamiento y test; prueba para datos apareados de Wilcoxon (*p<0,05; ***p<0,01).

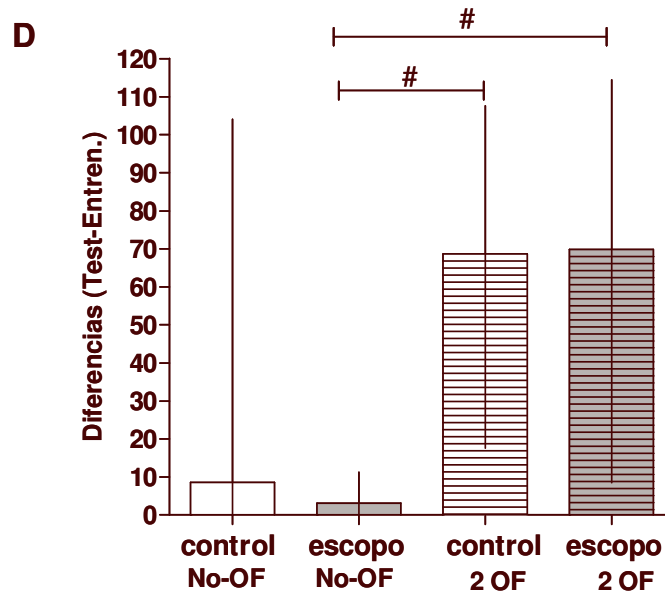


Fig 4.7 D: Efecto del campo abierto sobre la amnesia por escopolamina administrada intrahipocampo en la consolidación de la memoria de SD-IA, en ratas entrenadas durante su período de sueño (mantenidas en ciclo luz/ oscuridad derecho).

Comparación del desempeño en SD-IA de los grupos expuestos al **OF** y de aquellos sin exposición (**No-OF**), **inyectados con escopolamina** o con **salina**. Las barras representan las medianas de las diferencias de latencias (test-entrenamiento) con sus rangos intercuartiles (25; 75), obtenidas para los grupos de animales de la figura 4.7 **B y C**.

Diferencias significativas entre las diferencias de latencias, prueba de comparaciones múltiples de Dunns (post Kruskal Wallis ANOVA) (# p<0,05).

Tanto para los animales de los grupos control 2 OF y No-OF, como para el grupo tratado con escopolamina que fue expuesto previamente a 2 OF, las latencias de test fueron significativamente mayores que las del entrenamiento ($p < 0,05$ para el grupo control No-OF [N= 11]; $p < 0,001$ para el grupo control OF [N=11] y para el grupo tratado OF [N=11]; por prueba para muestras apareadas de Wilcoxon) (fig 4.7 B y C). En cambio, para el grupo de ratas inyectadas con escopolamina en hipocampo dorsal, que no fueron expuestas al campo abierto (No-OF), las latencias del test no fueron significativamente distintas de las del entrenamiento ($p > 0,05$; prueba para muestras apareadas de Wilcoxon; N=10) (fig 4.7 B). En otras palabras, tanto los animales del grupo control, como los animales del grupo tratado con escopolamina expuestos al OF, aprendieron la tarea, evidenciando LTM, mientras que los inyectados con escopolamina que no pasaron por el OF, no lo hicieron. Las diferencias de latencias (test-entrenamiento) mostraron que el grupo tratado con escopolamina no expuesto al campo abierto, fue aquel que tuvo el desempeño más pobre ($p < 0,05$; para la comparación de las diferencias de grupos con escopolamina No-OF vs. 2 OF; $p < 0,005$ para la comparación de diferencias del grupo con escopolamina No-OF vs. el grupo control 2 OF; por prueba para muestras no apareadas de Mann Whitney) (fig 4.7 D). (Aún cuando el grupo tratado No-OF, no fue significativamente diferente con respecto al grupo control No-OF, el valor de p fue cercano al valor de significación [$p = 0,0649$]).

Comparación del desempeño en SD-IA, de ratas mantenidas en CI vs. CD. Efecto de la previa exposición al OF sobre la amnesia de SD-IA producida por escopolamina.

Se comparó el desempeño en SD-IA de los grupos de animales criados en CI vs. aquellos criados en CD (comparación de los datos correspondientes a las fig 4.3 A, C y D vs. fig 4.7 B-D). Las latencias durante la sesión de entrenamiento fueron significativamente distintas entre los animales CD y CI, siendo mayores los valores de latencias para los grupos de animales CD ($p < 0,001$; por prueba de Kruskal Wallis, ANOVA de una vía).

En la figura 4.7 E y F se compararon las diferencias de latencias (test-entrenamiento) para los distintos grupos de animales con igual protocolo experimental, mantenidos en CD vs. los mantenidos en CI.

El grupo control de animales en CD, expuestos a 2 OF, tuvo un mejor desempeño comparado con el grupo control de animales en CI también expuestos a 2 OF ($p < 0,05$; por prueba para muestras no apareadas de Mann Whitney). Algo similar ocurrió en la comparación de los grupos de animales tratados con escopolamina, expuestos previamente a 2 OF: también se evidenció un mejor desempeño de los animales CD respecto de los CI ($p < 0,05$; por prueba para muestras no apareadas de Mann Whitney).

Los grupos control CD y CI, de animales no expuestos al OF, no fueron significativamente distintos ($p > 0,05$; por prueba para muestras no apareadas de Mann Whitney). Tampoco hubo diferencias entre los grupos CD y CI tratados con escopolamina, que no fueron expuestos al OF ($p > 0,05$; prueba para muestras no apareadas de Mann Whitney).

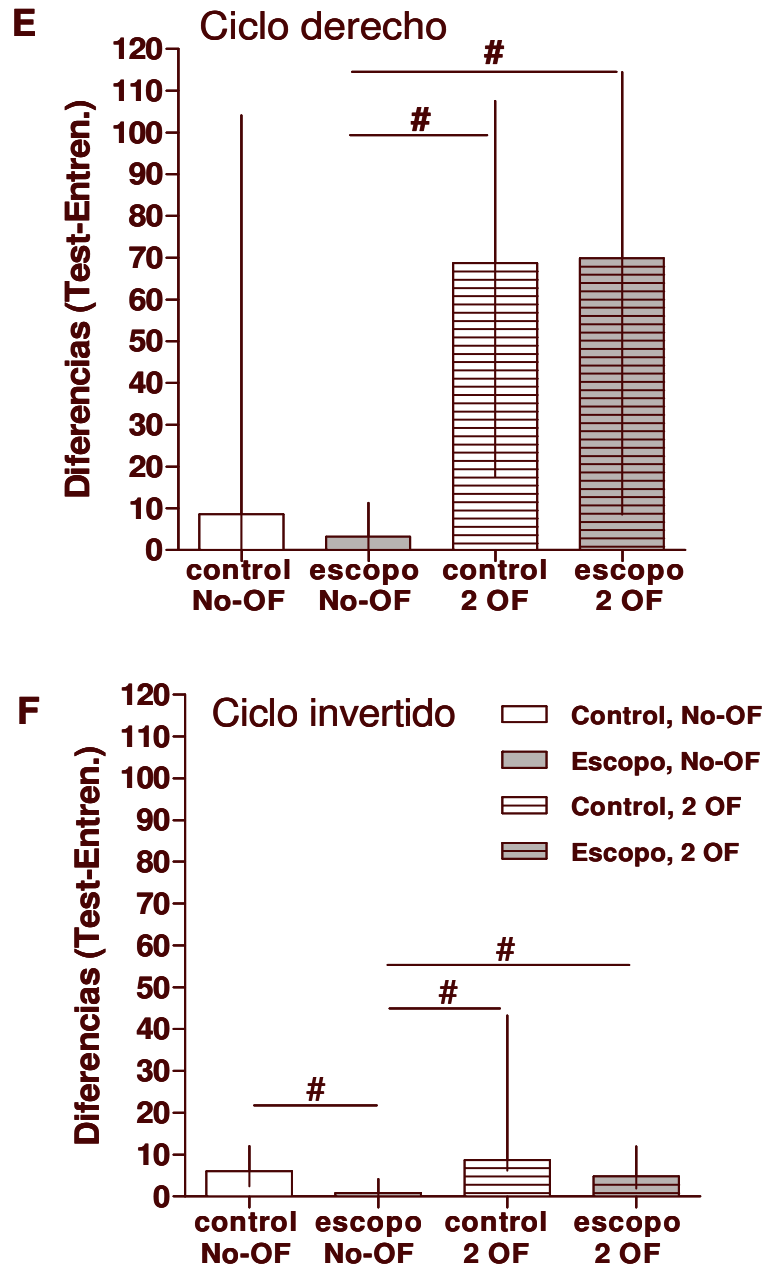


Fig 4.7 E y F: Comparación del desempeño en SD-IA, de ratas mantenidas en CI vs. CD. Comparación del efecto de la previa exposición al OF sobre la amnesia producida por escopolamina.

Diagrama de barras: se representan las medianas y sus rangos intercuartiles de las diferencias de latencias (test-entrenamiento) obtenidas para los animales de las **figuras 4.7 B y C, 4.3 A y B** inyectados con escopolamina o con solución salina, que fueron expuestos o no a dos sesiones en el OF.

Diferencias significativas entre grupos por prueba de Mann Whitney (# $p < 0,05$).

Como los animales mantenidos en CD tuvieron latencias más elevadas en el entrenamiento que los animales mantenidos en CI (fig 4.7 E y F), no sería lícito comparar sus diferencias de latencias porque estos grupos no habrían sido similares durante la adquisición. Pero las latencias del test

fueron suficientemente mas elevadas como para que las diferencias mostraran un mejor desempeño en las ratas en CD con 2 OF previos. Además se manifestó claramente que, tanto los grupos de animales mantenidos en CD, como los criados en CI, evidenciaron la superación de la amnesia instigada por escopolamina inyectada en hipocampo inmediatamente luego de entrenamiento en la tarea de SD-IA, por exposición previa al OF.

Comparación del desempeño en el OF de ratas criadas con ciclo luz/oscuridad derecho (CD) vs. aquellas con ciclo invertido (CI).

(Ratas que se encontraban en su fase de sueño vs. aquellas que se encontraban despiertas, respectivamente).

Nos propusimos evaluar si los animales criados en CI, que se encontraban despiertos durante las manipulaciones, se diferenciaban de aquellos criados en CD que se encontraban en su fase de sueño a las mismas horas del día objetivo, en su desempeño en el campo abierto.

Las medias del número de cruces para las ratas en CD fueron menores a las obtenidas para los animales en CI, tanto durante la primera como durante la segunda sesión en el OF. En cambio, el número de elevaciones sobre los miembros posteriores fue mayor para los animales en CD que para aquellos en CI (ver tabla 4.7).

Tabla 4.7: Comparación del desempeño en el OF entre ratas criadas con ciclo de luz/oscuridad derecho (CD) vs. aquellas criadas con ciclo invertido (CI) (o que se encuentran en su fase de sueño vs. aquellas que se encuentran despiertas).

Parámetro (numero)	1ra sesión	2da sesión
CRUCES	**CI>CD	*CI>CD
ELEVACIONES	NS	*CI<CD
ACICALAMIENTOS	*CI>CD	NS

*Grado de significación estadística obtenido por test de T para comparar el desempeño de los grupos criados en CD vs. CI, durante la misma sesión (primera o segunda), para cada uno de los tres parámetros analizados: cruces, elevaciones y acicalamientos. Se indica el grupo (CD o CI) con un valor de media significativamente mayor .
NS: diferencias no significativas.

* Diferencias significativas del parámetro entre CD vs CI por test de t (*p<0,05; **p<0,01).

En la segunda sesión de OF hubo una disminución significativa en el número de elevaciones de los animales en CI (p<0,01, prueba de t para datos apareados) y un aumento significativo en las medias de los acicalamientos (p<0,05, prueba de t para datos apareados). En cambio, para los animales en CD hubo una disminución significativa en las medias de los cruces (p<0,05, prueba pareada de T).

De manera consistente con lo descrito en el Capítulo III (tabla 3.4, pagina 101), para el desempeño en el campo abierto, la diferencia más sobresaliente entre los animales CD y los CI en el OF es la menor actividad exploratoria horizontal y una mayor actividad exploratoria vertical.

Si bien se aplicaron iguales protocolos experimentales a los animales mantenidos en CI y en CD, debe tenerse en cuenta que los experimentos se llevaron a cabo en laboratorios distintos, con animales provenientes de bioterios distintos, de la misma edad pero de distinto peso siendo mayor el peso de los animales mantenidos en CD; ello daría lugar a que la densidad de corriente en dichos animales CD haya sido menor, por lo que el entrenamiento habría sido más suave que para los animales en CI. Sin embargo, sus latencias de test fueron similares e incluso mayores para los animales expuestos a 2 OF. Por ello consideramos que las comparaciones eran pertinentes.

IV. 5. MODULACIÓN DE LA MEMORIA DE SD-IA POR EXPOSICIÓN AL OF. PARTICIPACIÓN DEL RECEPTOR GLUTAMATÉRGICO NMDA DEL HIPOCAMPO. Efecto de antagonistas NMDA administrados en hipocampo dorsal durante la consolidación de la memoria de SD-IA.

En esta serie de experimentos nuestro objetivo fue investigar si el receptor NMDA, que se considera desde hace mas de 20 años que está involucrado en la consolidación memorias de larga duración de distintas tareas comportamentales, principalmente asociativas y con componentes espaciales [385], particularmente en la consolidación temprana de SD-IA [114], participaba de alguna manera en los efectos encontrados de modulación del establecimiento de la memoria de dicha tarea.

Efecto de MK-801 administrado intrahipocampo sobre la consolidación de la memoria de SD-IA.

Teniendo en cuenta los datos de la literatura, de diferencias en los efectos de MK-801 en hembras y machos [386], ratas hembra por un lado, y machos por otro, fueron entrenadas en la tarea de SD-IA con un estímulo suave de 0,5 mA. Los animales fueron inyectados en hipocampo dorsal con MK-801, antagonista específico del receptor NMDA, no selectivo por subtipos, o con el correspondiente vehículo (solución salina, barras blancas), inmediatamente después del entrenamiento.

Algunas hembras fueron inyectadas con 0,5 µg/µl de MK-801 (barras gris claro), y otras, con 2 µg/µl de MK-801 (barras gris oscuro), en un volumen final de 1 µl/hipocampo. Como es habitual en estos ensayos, a las 24 h se realizó el test, registrándose la latencia de descenso sin aplicarse choque eléctrico.

En la figura 4.8 se muestran gráficos de barras, que representan las latencias de descenso de la plataforma, la latencia de entrenamiento a la izquierda, y la del test a la derecha.

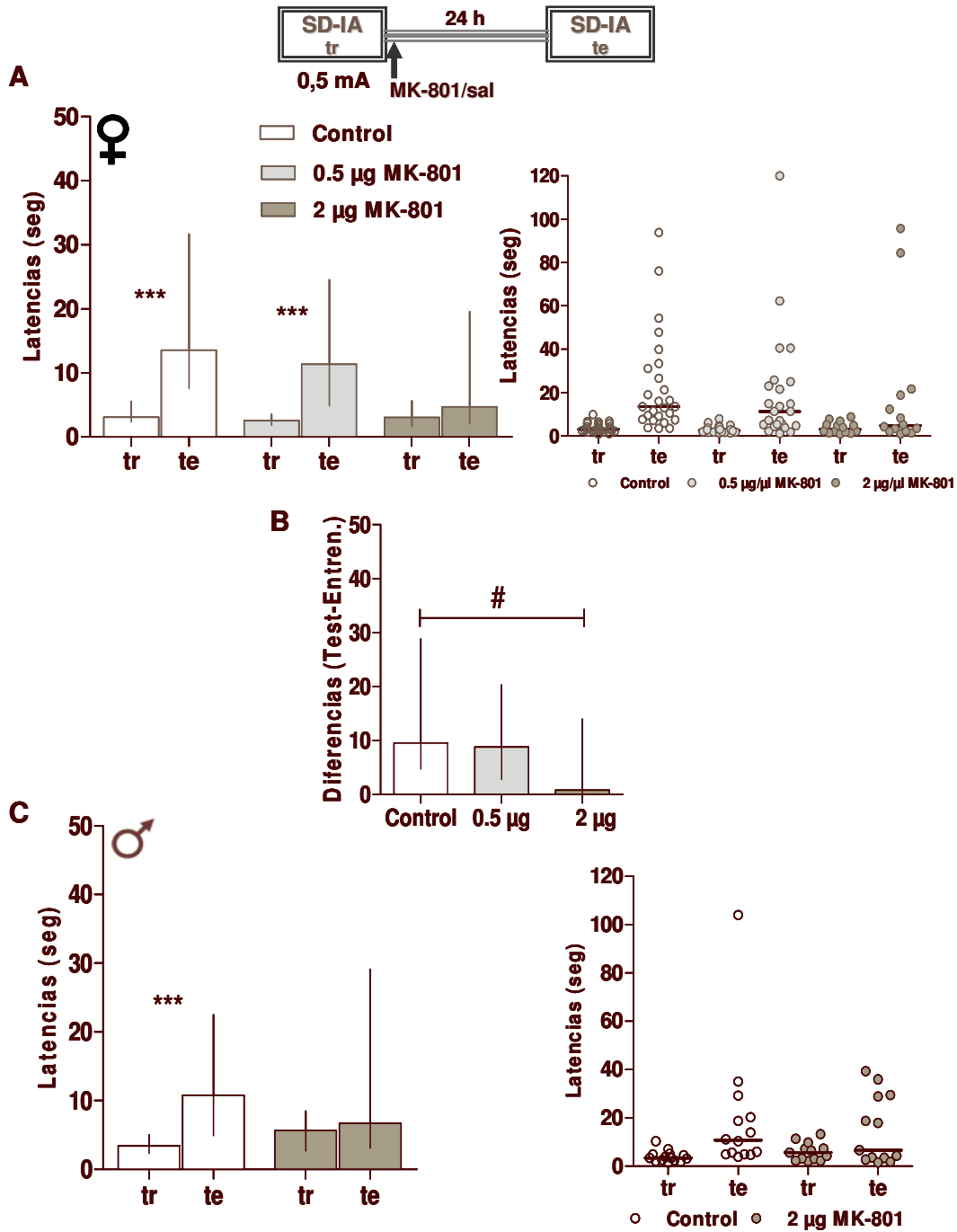


Fig 4.8: Efecto de MK-801 administrado intrahipocampo sobre la consolidación de la memoria de SD-IA.

Arriba: Esquema del diseño experimental para evaluar el efecto de MK-801 intrahipocampo sobre SD-IA. La flecha indica la inyección de MK-801 o solución salina.

A y C: Las barras representan medianas y rangos intercuartiles (25; 75) de las latencias de descenso de ratas hembras (**A**) y machos (**C**), entrenadas con choque de 0,5 mA. Las hembras (**A**) tratadas fueron inyectadas intrahipocampo luego del entrenamiento, con 1 ul de 0,5 o 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de MK-801 (N=24 y 17 respectivamente, barras grises). Los machos (**C**), con 1 ul de 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de MK-801 (barras grises, N=9). Los controles fueron inyectados con solución salina (barras blancas, N hembras=27; N machos=14).

Paneles laterales (derecha): gráficos de *scatter*

tr: latencia de entrenamiento; **te:** latencia de test.

*Diferencias significativas por prueba para muestras apareadas de Wilcoxon (***) $p < 0,001$.

B: Diferencias de latencias (test-entrenamiento) con sus rangos intercuartiles (25; 75) tanto de los grupos inyectados con MK-801, y de los grupos control de la parte A de la figura.

Diferencias significativas entre las diferencias de latencias por prueba no pareada de Mann Whitney. (# $p < 0,05$).

Las figuras 4.8 A y B corresponden a las ratas hembras. En los animales inyectados con vehículo y en los tratados con MK-801 en la dosis más baja (0,5 $\mu\text{g}/\text{lado}$), las latencias del test fueron significativamente mayores que las del entrenamiento ($p < 0,001$, para el grupo MK-801 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ [N=24], y para el grupo control [N=27], prueba para muestras apareadas de Wilcoxon). En cambio, no hubo diferencias significativas entre las latencias de entrenamiento y las de test, para los grupos de animales inyectados con 2 μg de MK-801 por lado ($p > 0,05$, por prueba para muestras apareadas de Wilcoxon, N=17). Es decir que no hubo expresión adecuada de la memoria que demostrara la formación de LTM.

La diferencia de latencias (test – entrenamiento, fig 4.8 B) del grupo tratado con 2 μg de MK-801 fue significativamente menor que la del grupo control ($p < 0,05$, por prueba de Mann Whitney). En cambio la diferencia de latencias del grupo o tratado con 0,5 μg de MK-801, no fue significativamente distinta del control ($p > 0,05$, por prueba Mann Whitney).

Los resultados mostraron que 2 μg de MK-801, administrados en el hipocampo dorsal luego de entrenamiento en la tarea de evitación inhibitoria con un choque suave, tuvieron efecto amnésico en hembras, actuando en el período de consolidación temprana de la memoria, corroborando trabajos previos.

Al comprobar que la dosis de 2 μg resultó amnésica en las hembras, se utilizó la misma en machos (fig 4.8 C). Las latencias del grupo control (barras blancas), y las de los grupos de ratas tratadas con MK-801 (barras grises) están representadas como medianas en los diagramas de barras.

Las latencias del test fueron significativamente mayores que las del entrenamiento para el grupo control ($p < 0,001$, por prueba para muestras apareadas de Wilcoxon, N=14, fig 4.8 C). Los animales inyectados con 2 $\mu\text{g}/\text{hipocampo}$ de MK-801, no evidenciaron recordar la tarea ya que las latencias de test no fueron estadísticamente diferentes de las del entrenamiento ($p > 0,05$, por prueba para muestras apareadas de Wilcoxon, N=9, fig 4.8 C).

Estos resultados muestran un efecto amnésico de MK-801 en dosis de 2 µg/lado, administrados en el hipocampo luego de un entrenamiento suave en la tarea de evitación inhibitoria, tal como ocurrió con las ratas hembra (fig 4.8 A), corroborando entonces que el bloqueo de los receptores NMDA del hipocampo dorsal interfiere con la consolidación de la memoria de SD-IA, tanto en ratas machos como en hembras.

Efecto de MK-801 administrado intrahipocampo sobre la consolidación de la memoria de SD-IA: Modulación por el campo abierto

Teniendo en cuenta que la exploración del campo abierto impidió que se manifestara la amnesia causada por escopolamina intrahipocampo en la tarea de SD-IA, tanto en hembras como en machos (ver figuras fig 4.2; 4.3 y 4.7), se decidió evaluar si el campo abierto ejercía algún efecto sobre la amnesia causada por MK-801 inyectado en hipocampo dorsal inmediatamente luego del entrenamiento en SD-IA.

La mitad de un lote de animales fueron expuestos a 2 sesiones de 3 minutos cada una en el campo abierto; una sesión tuvo lugar 24 h antes y la otra, 1 h 30 min antes del entrenamiento en SD-IA (grupos OF). En la segunda sesión en el campo abierto hubo disminución significativa de las elevaciones sobre los miembros posteriores ($p < 0,001$, por prueba de T para datos apareados, ver pie de figura 4.9), por lo que se puede considerar que las ratas reconocieron el OF.

Se evaluó el desempeño de machos entrenados en SD-IA con choque suave (0,5 mA), a los que se inyectó intrahipocampo inmediatamente luego del entrenamiento, con 2 µg de MK-801, 1 µl/lado, o con solución salina como control. A las 24 h se realizó el test.

La figura 4.9 corresponde al desempeño en SD-IA de los distintos grupos. El gráfico de barras representa medianas de las latencias de descenso de una plataforma aislada, para los animales que fueron expuestos previamente a las 2 sesiones en el campo abierto (grupo 2 OF, barras rayadas, fig 4.9 B), y para los que no lo fueron (grupo No-OF, barras vacías, fig 4.9 A), y de los grupos tratados con MK-801 intrahipocampo (barras grises), y los respectivos controles inyectados con solución salina (barras blancas).

Tanto para los grupos control 2 OF y No-OF, como para el grupo tratado con MK-801 expuesto previamente al campo abierto (2 OF), las latencias del test fueron significativamente mayores que las del entrenamiento ($p < 0,01$ para grupo tratado 2 OF [N=17], $p < 0,001$ para grupo control 2 OF [N=13] y para grupo control No-OF [N=17]; por prueba para muestras apareadas de Wilcoxon, fig 4.9 A y B). En cambio, para el grupo inyectado con MK-801 que no fue previamente expuesto al campo abierto (No-OF), las latencias del test no fueron distintas de las del entrenamiento ($p > 0,05$, por prueba para muestras apareadas de Wilcoxon, N=13) (fig 4.9 A).

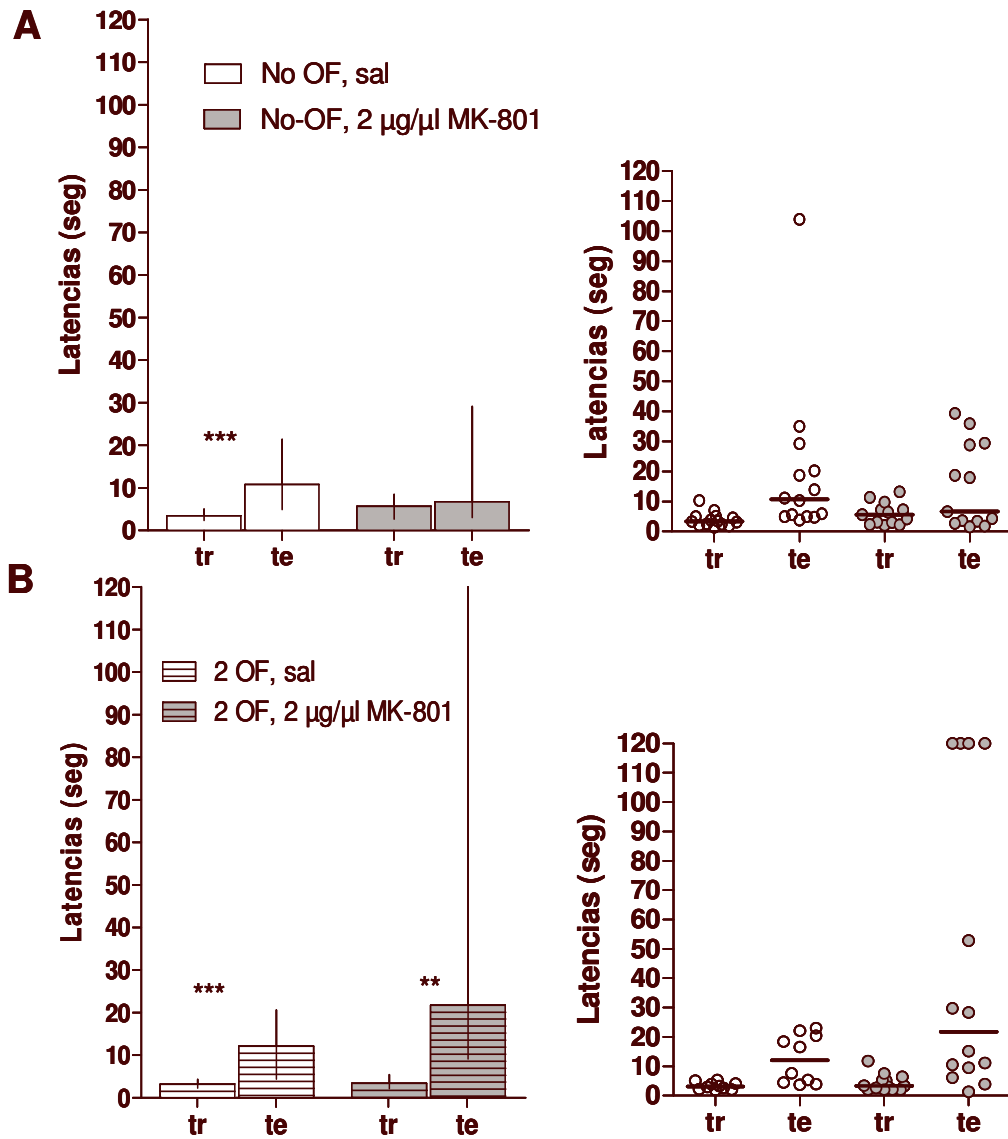
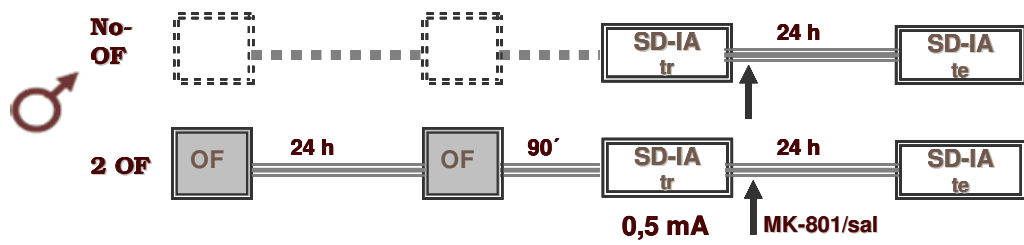


Fig 4.9: Efecto del MK-801 administrado intrahipocampo sobre la consolidación de la memoria de SD-IA con estímulo umbral: Modulación por el campo abierto.

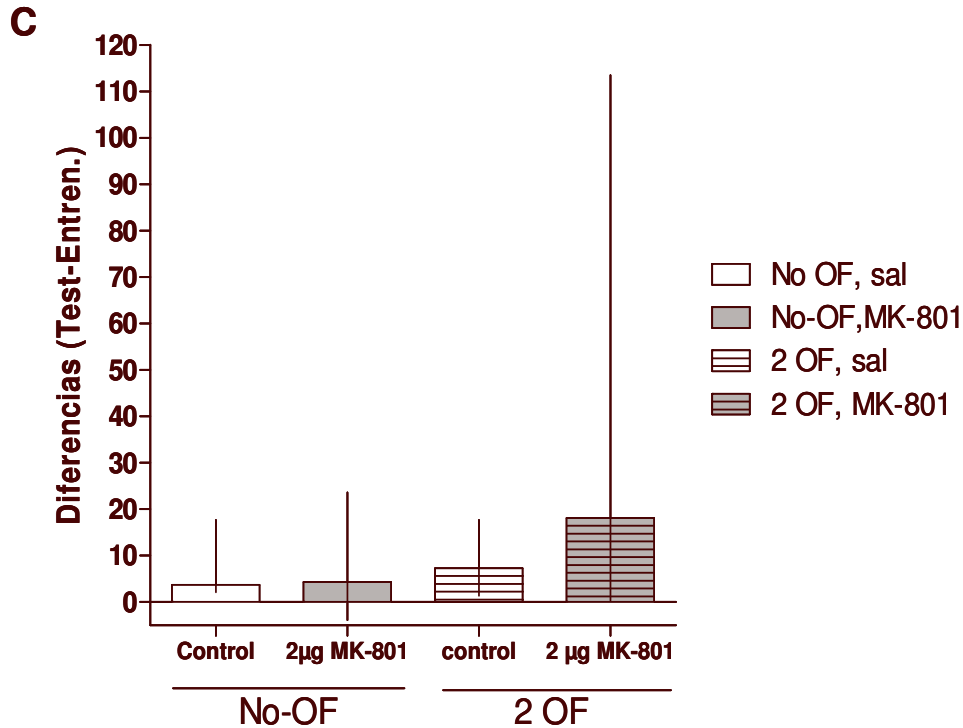


Fig 4.9: Efecto del MK-801 intrahipocampo sobre la consolidación de la memoria de SD-IA con estímulo umbral: Modulación por el campo abierto.

Arriba: Esquema del diseño experimental para evaluar el efecto de MK-801 intrahipocampo sobre el desempeño en la SD-IA cuando los animales se expusieron previamente o no al OF. Grupos de ratas macho fueron entrenadas con un choque de 0,5 mA. La flecha indica el momento en que se inyectó intrahipocampo solución salina; o 2 µg/µl MK-801.

A y B: Las barras representan medianas de latencias con sus rangos intercuartiles (25; 75) de grupos de animales expuestos a dos sesiones de campo abierto (grupo 2 OF, barras rayadas, **B**) y de grupos que no fueron expuestos al OF (grupo No-OF, barras vacías, **A**), cuando fueron inyectados con MK-801 (barras grises) o con solución salina (control, barras blancas)

tr: latencia de entrenamiento; **te:** latencia de test.

Paneles laterales a la derecha: gráfico de *scatter*.

Campo abierto: el número de elevaciones fue significativamente menor en la segunda sesión de OF (media elevaciones: 1ra sesión 20,16 + 1,26; 2 da sesión 15,11 + 0,80)

C: Diferencias de latencias (test-entrenamiento) con sus rangos intercuartiles (25; 75) de los grupos inyectados con MK-801 y con solución salina de la parte A de la figura.

Grupos No-OF: control N=17 y tratado N=13. Grupos OF: control N=13 y tratado N=17.

*Diferencias significativas entre entrenamiento y test; prueba para datos apareados de Wilcoxon (**p<0,01, ***p<0,001).

En la figura 4.9 C se muestran las diferencias de latencias. Los grupos tuvieron un desempeño similar, no hubo diferencias significativas ninguna de las comparaciones entre los distintos grupos (p>0,05, para la comparación de las diferencias de latencias [test-entrenamiento], por prueba para muestras no apareadas de Mann Whitney).

Estos resultados corroboraron el efecto de amnesia retrógrada por MK-801, al menos aparente, cuando es administrado intrahipocampo luego de entrenamiento en la tarea de SD-IA. Dicha amnesia se revirtió cuando los animales fueron expuestos, a 2 sesiones en el campo abierto antes del entrenamiento en SD-IA. Por lo tanto, el bloqueo de los receptores NMDA de hipocampo dorsal no permitió que se consolidara o evidenciar la formación de LTM; mientras que, a semejanza de lo que ocurrió con las ratas inyectadas con escopolamina, los animales previamente expuestos al campo abierto formaron una LTM de la tarea, expresando un rendimiento adecuado en el test, a pesar del bloqueo de los receptores NMDA durante la consolidación temprana.

Se realizaron estudios preliminares en los que grupos de ratas macho fueron inyectados con 2 µg de MK-801, o con solución salina, en el hipocampo dorsal inmediatamente luego del entrenamiento en SD-IA con una intensidad de choque fuerte (0,75 mA). Tanto los grupos tratados como control habían sido previamente expuestos a las dos sesiones de campo abierto. En este caso tanto el grupo tratado como el control tuvieron un perfil de aprendizaje semejante, ambos evidenciaron formar una LTM. No se observó efecto amnésico de MK-801.

Algo similar se observó con grupos de ratas macho inyectados via i.p. con 0,07 mg/kg de MK-801 o bien con solución salina, 20 min antes del entrenamiento en SD-IA con choque fuerte. En este caso ninguno de los grupos había sido expuesto previamente al OF. Ambos grupos evidenciaron formar una LTM de esta tarea. Tampoco se observó efecto amnésico de MK-801. La intensidad del estímulo pudo haber impedido que se manifestara el efecto (ya sea sobre la consolidación, como durante la adquisición) amnésico de MK-801.

Se ha reportado que cuando se entrena en ST-IA con una intensidad de choque muy elevada (6 o 9 mA), no se evidencia efecto amnésico de escopolamina i.p., aun cuando se inyectan dosis elevadas (8 o 12 mg/kg) que instigan amnesia cuando se entrena con una menor intensidad de choque (3 mA). Es decir, que cuando se aplica un exceso de refuerzo no se evidencia la amnesia por escopolamina [376; 377; 387; 388; 389]. Por otra parte, Quiroz y col [390] demostraron en ratas que la lesión en el hipocampo afecta el desempeño en la tarea de ST-IA sólo cuando se aplica un choque “moderado” durante la sesión de entrenamiento (0,8 mA). Cuando se aplicó un choque eléctrico más fuerte (1mA) no se observó efecto de la lesión.

IV.6 PARTICIPACIÓN DE SUBTIPOS DEL RECEPTOR NMDA DE HIPOCAMPO EN LA CONSOLIDACIÓN DE SD-IA

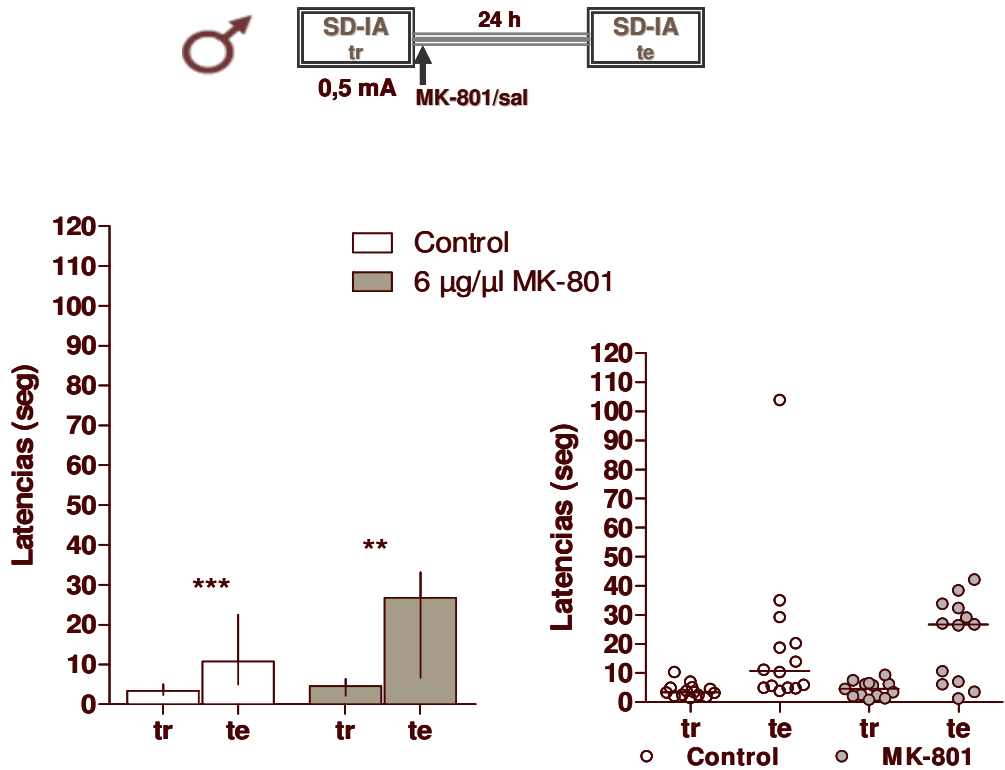
Se entrenaron machos en SD-IA, a los que se inyectó en el hipocampo dorsal, inmediatamente luego del entrenamiento, 6 µg de MK-801 en 1 µl, es decir, la máxima dosis utilizada, o bien solución salina como control. Durante la prueba, los animales recibieron un choque eléctrico umbral de 0,5 mA al descender de la plataforma aislada a la grilla con sus cuatro patas. A las 24 h se realizó el test.

La figura 4.10 muestra las latencias de descenso desde la plataforma. Las barras corresponden a las medianas de latencias de los grupos de ratas tratadas con MK-801 intrahipocampo (barras grises) y a los respectivos controles inyectados con solución salina (barras blancas). No hubo diferencias significativas entre las latencias de entrenamiento de los distintos grupos ($p > 0,05$; prueba para muestras no apareadas de Mann Whitney).

Las latencias del test fueron significativamente mayores que las del entrenamiento tanto para los animales del grupo control, como –asombrosamente– para aquellos del grupo tratado con MK-801 ($p < 0,01$ para grupo tratado [N=13]; $p < 0,001$ para grupo control [N=14]; prueba para muestras apareadas de Wilcoxon). Es decir que tanto los animales control, como el grupo inyectado con 6 µg de MK-801, expresaron memoria de larga duración (LTM) de la tarea. Las diferencias de latencias (test - entrenamiento) no resultaron estadísticamente distintas entre ambos grupos ($p < 0,05$, por prueba para muestras no apareadas de Mann Whitney).

En el gráfico de *scatter* se puede ver que en el grupo tratado con MK-801 hubo una mayor proporción de animales con latencias de test que superan el valor de la mediana, comparado con el grupo control, lo que llamó nuestra atención.

En síntesis, cuando se administró en el hipocampo una dosis alta de MK-801 inmediatamente luego de entrenamiento en la tarea de SD-IA, no se evidenció efecto amnésico alguno, y pareció haber una tendencia a un mejor desempeño en esta tarea. Una interpretación posible para estos resultados sería la de una participación diferencial de subtipos de receptores NMDA, que serían bloqueados recién con las concentraciones más altas del antagonista.



Efecto del antagonista ifenprodil selectivo para receptores NMDA conteniendo NR2B sobre la consolidación de la memoria de SD-IA con entrenamiento suave.

Teniendo en cuenta los resultados relatados en la sección anterior y los datos de la bibliografía sobre una posible participación diferencial de los subtipos de receptores NMDA del hipocampo en el procesamiento de la memoria, decidimos ensayar el antagonista selectivo ifenprodil para receptores conteniendo NR2B, en similares condiciones.

En ensayos previos del mismo laboratorio LaNyN, se evaluó el efecto del bloqueo selectivo por ifenprodil en hipocampo dorsal, sobre la consolidación de la memoria de SD-IA. Ratas hembra mantenidas en ciclo de luz/oscuridad oscuridad derecho (CD) fueron inyectadas con ifenprodil en el hipocampo dorsal inmediatamente después de entrenamiento en SD-IA con choque de 0,5 mA. Se administraron dos dosis de 0,1 y 1 µg de ifenprodil por hipocampo en 1 µl de volumen final o igual volumen de vehículo.

Tanto los grupos inyectados con ifenprodil, como los animales control evidenciaron haber formado una LTM, ya que las latencias del test fueron significativamente mayores a las del entrenamiento ($p < 0,01$, por prueba para muestras apareadas de Wilcoxon, datos no mostrados). Los tres grupos tuvieron un desempeño similar ($p > 0,05$ para la comparación de las diferencias de latencias [test-entrenamiento] entre los grupos control y tratados con 0,1 y 1 µg/µl de ifenprodil, por Kruskal Wallis ANOVA, datos no mostrados). Ifenprodil en las dosis indicadas, no tuvo efecto evidente alguno cuando fue administrado inmediatamente después del entrenamiento en SD-IA con choque de 0,5 mA. Además, observamos que más de la mitad de los animales tratados no descendieron de la plataforma durante los 120 s del test, tiempo máximo considerado para la prueba, sin evidenciar “congelamiento” (*freezing*) o alteraciones de la motricidad o del comportamiento exploratorio, denotando así una memoria robusta de la tarea. Entonces se decidió realizar un experimento similar, pero se entrenó con una intensidad de choque subumbral (0,3 mA). De este modo se trató de poner en evidencia un eventual efecto promotor de la memoria por administración de ifenprodil.

Las ratas fueron inyectadas con el antagonista selectivo NR2B ifenprodil: 0,1; 1,0 o 6,0 µg en 1 µl por hipocampo, inmediatamente después del entrenamiento. Los controles fueron inyectados con igual volumen de solución salina. A las 24 h se realizó el test en ausencia de choque. La figura 4.11 (tomada de Tesis doctoral de Cheli V, Fac Fcia Y Bqca, 2006 [391]) muestra un gráfico de barras que representan las medianas de las latencias (entrenamiento a la izquierda, test a la derecha) para el grupo control (barras blancas), y para los grupos tratados con ifenprodil (barras grises).

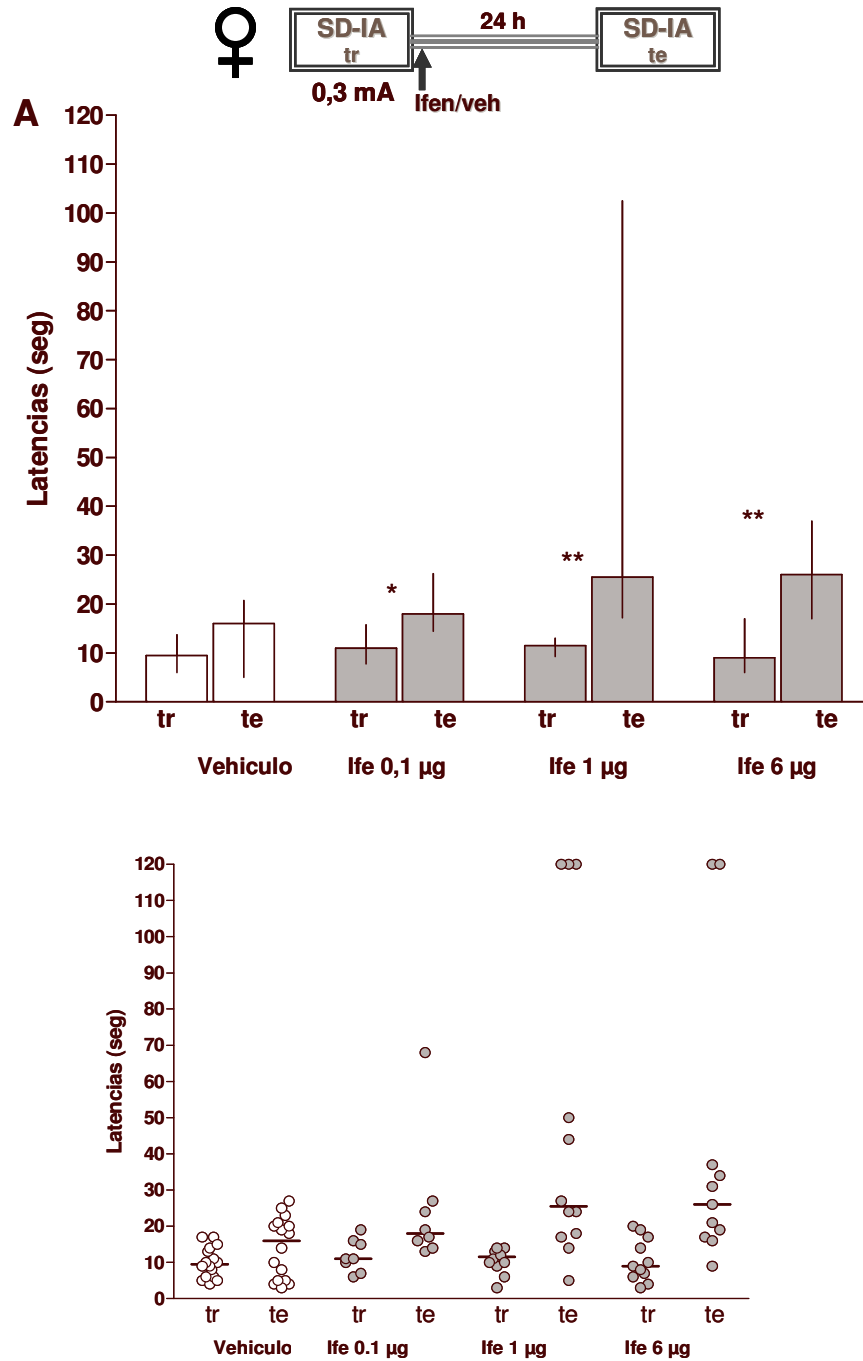


Fig 4.11: Efecto del antagonista ifenprodil selectivo para receptores NMDA-NR2B sobre la consolidación de la memoria de SD-IA con entrenamiento subumbral (0,3 mA).

Arriba: Esquema del diseño experimental para evaluar el efecto de ifenprodil intrahipocampo sobre el desempeño en la prueba de SD-IA. La flecha indica el momento en que se inyectó ifenprodil o vehículo.

A: Latencias de descenso de hembras entrenadas con choque subumbral de 0,3 mA. Los grupos tratados fueron inyectados luego del entrenamiento con ifenprodil intrahipocampo, en dosis de 0,1; 1 y 6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (N=9, 12 y 11 respectivamente, barras grises). Los grupos de animales control fueron inyectados con solución salina (barras blancas, N= 16). Las barras representan medianas con rangos intercuartiles (25; 75).

tr: latencia de entrenamiento; **te:** latencia de test.

Panel inferior: gráfico de *scatter*.

Diferencias significativas entre entrenamiento y test; prueba para datos apareados de Wilcoxon ($p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

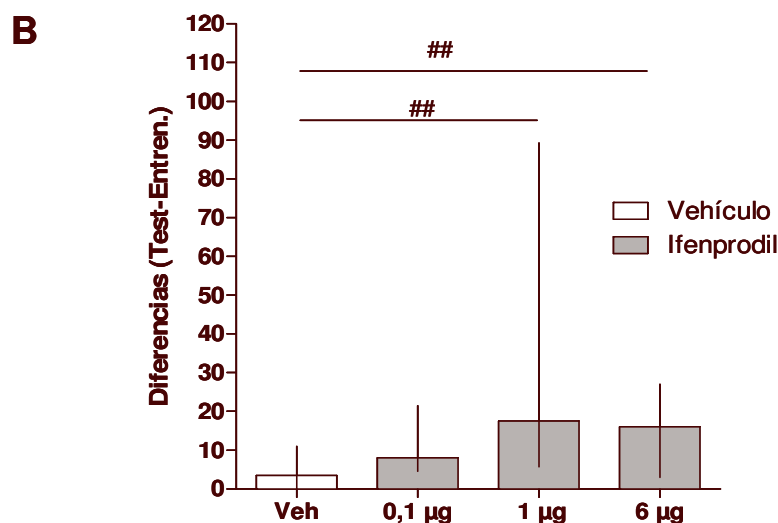


Fig 4.11: Efecto del antagonista ifenprodil selectivo para receptores NMDA-NR2B sobre la consolidación de la memoria de SD-IA con entrenamiento subumbral (0,3 mA).

B: Diferencias de latencias (test-entrenamiento) con sus rangos intercuartiles (25; 75) de los grupos inyectados con ifenprodil y con vehículo de la parte A de la figura.

Diferencias significativas entre las diferencias de latencias por prueba de comparaciones múltiples de Dunns (## $p < 0,01$).

Tomado de Tesis doctoral de Verónica Cheli, 2006.

Las latencias del test no fueron significativamente mayores que las del entrenamiento para los animales del grupo control, dado que fueron entrenados con una intensidad de choque subumbral ($p > 0,05$; por prueba para muestras apareadas de Wilcoxon, N=16). En cambio, los grupos inyectados con ifenprodil en el hipocampo dorsal evidenciaron haber formado una traza de memoria de larga duración de la tarea, para todas las dosis analizadas, ya que las latencias del test fueron significativamente mayores que las del entrenamiento ($p < 0,05$ para 0,1 $\mu\text{g}/\text{hipocampo}$ [N=9]; $p < 0,01$ para 1 y 6 $\mu\text{g}/\text{hipocampo}$ [N=12 y N=11, respectivamente]; prueba para muestras apareadas de Wilcoxon) (fig 4.11).

En otras palabras, los animales control no parecieron haber formado una LTM de la tarea, pero cuando se los inyectó con ifenprodil en las dos dosis ensayadas, la expresión de la memoria durante la sesión de test fue adecuada y puso en evidencia la formación de LTM. Las diferencias de latencias (test - entrenamiento) de los grupos inyectados con 1 o 6 μg /hipocampo, fueron significativamente mayores que las del grupo control ($p < 0,01$ por prueba para muestras no apareadas de Mann Whitney) (Fig. 4.11 B).

Se concluyó que el bloqueo de los receptores NMDA del hipocampo dorsal conteniendo la subunidad NR2B, pareció ejercer un claro efecto promotor sobre la consolidación de la memoria de SD-IA, cuando se entrenaron las ratas con estímulo subumbral.

Efecto de MK-801 administrado intrahipocampo sobre la consolidación de la memoria de ST-IA.

Como el bloqueo de los receptores NMDA del hipocampo dorsal interfirió con la consolidación de la memoria de SD-IA (fig 4.8 A y C), decidimos estudiar el efecto de este bloqueo en la tarea de ST-IA, para investigar si hay una participación equivalente de dichos receptores en la consolidación de otra tarea de evitación con componente aversivo.

En cuatro grupos de hembras se las entrenó en la tarea de evitación inhibitoria por pasaje de compartimiento en un paso (*Step Through*) con un choque de 0,5 mA. A las 24 h se realizó el test. Los animales fueron inyectados inmediatamente después del entrenamiento, con 2 o 6 μg /hipocampo de MK-801 en un volumen de 1 μl o con igual volumen de solución salina.

La figura 4.12 muestra un gráfico de barras que representa las latencias de ingreso al compartimiento oscuro (entrenamiento a la izquierda, y test a la derecha) del grupo control (barras blancas) y de los grupos inyectados con MK-801 (barras grises).

Las latencias del test fueron significativamente mayores a las del entrenamiento en todos los grupos, tanto controles como tratados ($p < 0,01$ para grupo control de aquellos animales inyectados con 6 μg [N=12]; $p < 0,001$ para grupo tratado con 2 μg [N=12], para su respectivo grupo control [N=13] y para el grupo tratado con 6 μg [N=13]; por prueba para muestras apareadas de Wilcoxon); esto significa que todos aprendieron la tarea, evidenciando LTM. Los grupos control tuvieron un desempeño similar ya que las diferencias de latencias no fueron significativamente distintas entre ellos (test-entrenamiento) ($p > 0,05$, por prueba para muestras no apareadas de Mann Whitney).

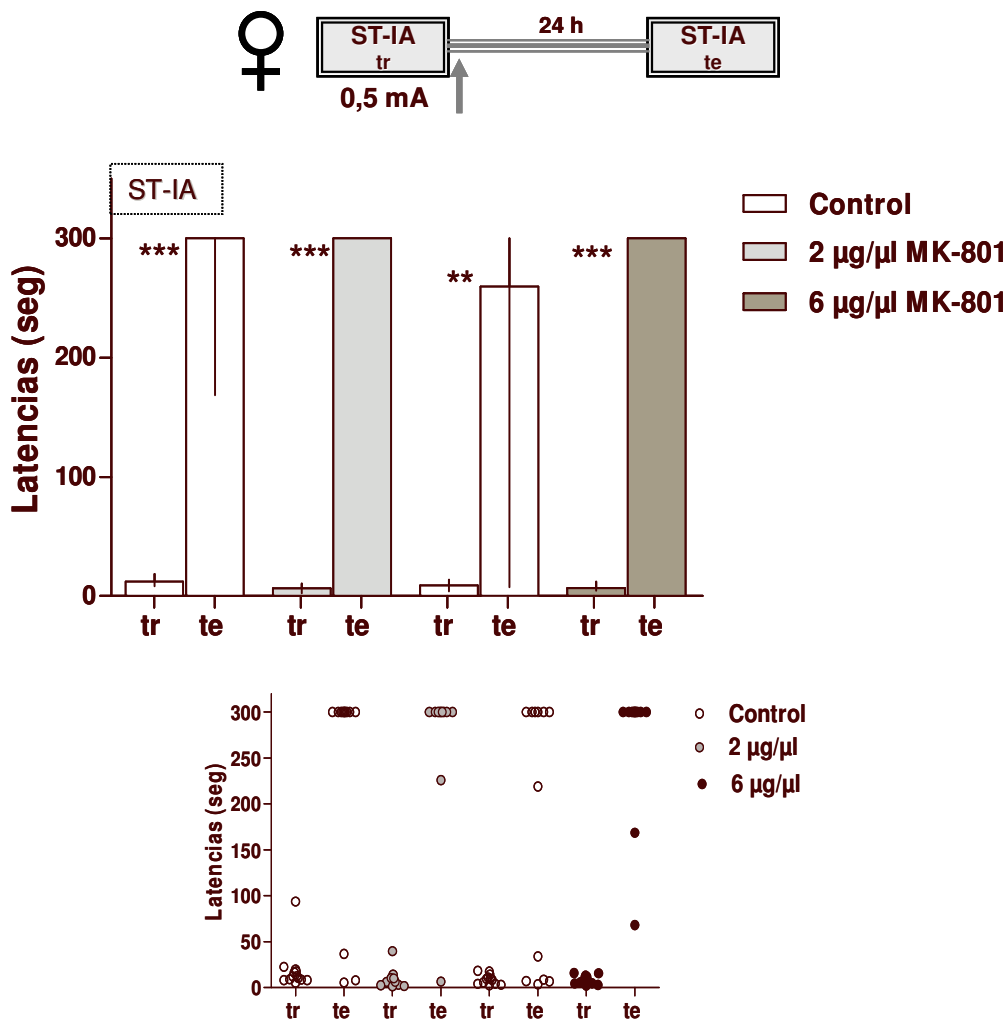


Fig 4.12: Efecto de la MK-801 intrahipocampo sobre la consolidación de la memoria de ST-IA con entrenamiento de 0,5 mA.

Arriba: Esquema del diseño experimental para evaluar el efecto de la MK-801 intrahipocampo, sobre el desempeño en ST-IA. La flecha indica el momento en que se inyectó intrahipocampo solución salina; o MK-801.

Diagrama de barras: Los gráficos de barras corresponden a las medianas de latencias con sus rangos intercuartiles (25; 75) obtenidas por los grupos de hembras entrenadas con choque de 0,5 mA. Las ratas de los grupos tratados fueron inyectadas luego del entrenamiento con de 2 y 6 µg/µl de la MK-801 intrahipocampo (barras grises, N=12 y 13 respectivamente). Las ratas de los grupos control fueron inyectadas con solución salina (barras blancas, N=13 y 12 respectivamente).

tr: latencia de entrenamiento; **te:** latencia de test.

Panel inferior: gráfico de *scatter*.

*Diferencias significativas entre entrenamiento y test; prueba para muestras apareadas de Wilcoxon (**p<0,01;***p<0,001).

Tampoco fueron significativas las diferencias de los grupos tratados con las distintas dosis del antagonista, comparadas con las diferencias de sus respectivos controles ($p > 0,05$, por prueba para muestras no apareadas de Mann Whitney). Las medianas de las latencias durante el test fueron muy elevadas y cercanas al techo fijado, tanto para el control como para los grupos tratados con MK-801 (300 seg).

Por esta razón se procedió a evaluar el efecto del MK-801, inyectado en el hipocampo dorsal, sobre la consolidación de ST-IA, cuando se entrena con una intensidad de choque más suave, con el que se obtendrían valores de medianas de latencias de test más bajos. Estas condiciones de entrenamiento permitirían observar la posible modulación positiva sobre el comportamiento de esta droga en esta tarea.

Se entrenaron ratas hembra con una intensidad de choque de 0,4 mA en ST-IA. A las 24 h se realizó el test (en ausencia de choque). Los animales fueron inyectados inmediatamente después del entrenamiento con vehículo o con 6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de MK-801, en 1 μl /hipocampo.

La figura 4.13 muestra un gráfico de barras que representa las latencias de ingreso al compartimiento oscuro de; los grupos control (barras blancas), y de los grupos tratados con MK-801 (barras grises) (entrenamiento a la izquierda y test a la derecha). Las latencias durante el test fueron significativamente mayores a las obtenidas durante el entrenamiento tanto para el grupo control como para el inyectado con MK-801 ($p < 0,05$ para el grupo tratado [N=26]; $p < 0,01$ para el grupo control [N=28]; por prueba para muestras apareadas de Wilcoxon). El grupo tratado tuvo un desempeño similar al del grupo control, ya que las diferencias de latencias (test-entrenamiento) no resultaron significativamente distintas ($p > 0,05$; por prueba para muestras no apareadas de Mann Whitney). Estos resultados muestran que la administración de una dosis alta de MK-801 post-entrenamiento no tuvo efecto evidente sobre la consolidación de la memoria de ST-IA, aún con un choque que se puede considerar suave para esta tarea (0.4 mA de intensidad).

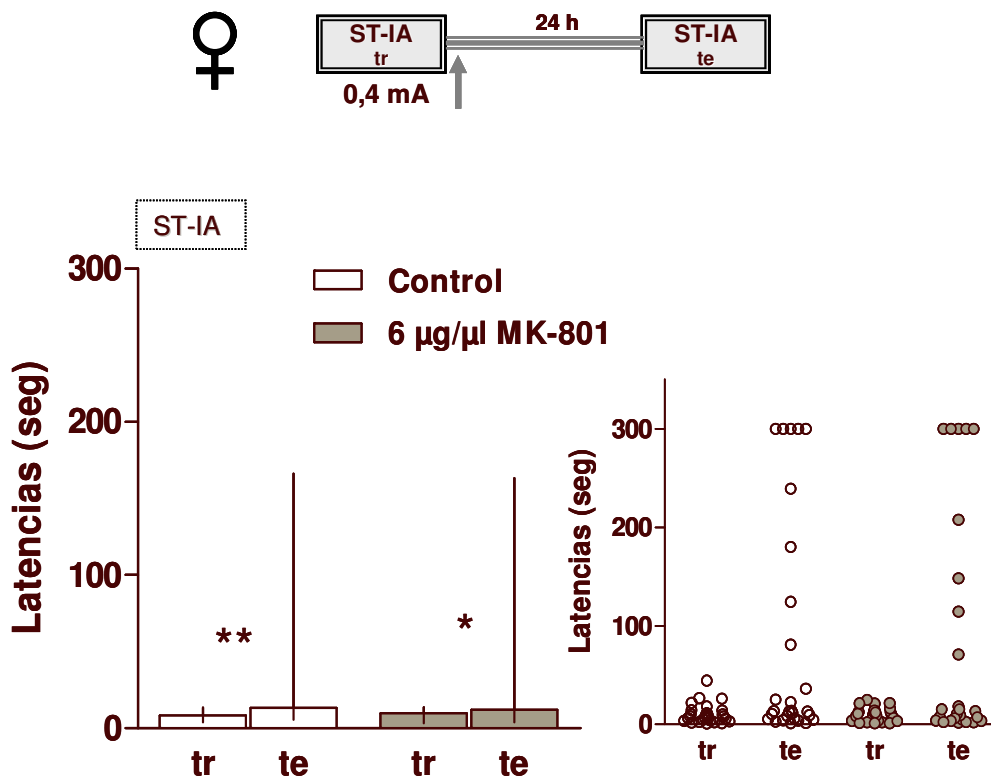


Fig 4.13: Efecto de la MK-801 intrahipocampo sobre la consolidación de la memoria de ST-IA con entrenamiento suave (0,4 mA).

Arriba: Esquema del diseño experimental para evaluar el efecto de la MK-801 intrahipocampo, sobre el desempeño en ST-IA. La flecha indica el momento en que se inyectó intrahipocampo solución salina; o 6 µg/µl de MK-801.

Diagrama de barras: Los gráficos de barras corresponden a las medianas de latencias con sus rangos intercuartiles (25; 75) obtenidas por los grupos de hembras entrenadas con choque umbral de 0,4 mA. Las ratas del grupo tratado fueron inyectadas luego del entrenamiento con 6 µg/µl de la MK-801 intrahipocampo (barras grises, N=26). Las ratas del grupo control fueron inyectadas con solución salina (barras blancas, N=28).

tr: latencia de entrenamiento; **te:** latencia de test.

Paneles inferiores: gráfico de *scatter*.

*Diferencias significativa entre entrenamiento y test, prueba para muestras apareadas de Wilcoxon (*p<0,05; **p<0,01).

Efecto de la administración del antagonista selectivo por NR2B ifenprodil en hipocampo dorsal sobre la consolidación de la memoria de ST-IA.

Se decidió evaluar el efecto del bloqueo por ifenprodil, de los receptores NMDA conteniendo la subunidad NR2B en el hipocampo dorsal. Recordemos aquí que ifenprodil había evidenciado un efecto promotor en la tarea de SD-IA (fig 4.11) con un choque subumbral (0,3 mA).

Se entrenaron 2 grupos de hembras con un choque suave de 0,4 mA en ST-IA. A las 24 h se realizó el test. Los animales fueron inyectados inmediatamente después del entrenamiento con vehículo o con 4 µg/µl de ifenprodil, en un volumen final de 1 µl.

La figura 4.14 muestra un gráfico de barras que representa las latencias de ingreso al compartimiento oscuro para los grupos control (barras blancas) y para los tratados con ifenprodil (barras grises).

Las latencias del test fueron significativamente mayores a las del entrenamiento, tanto para el grupo control como para el tratado ($p < 0,001$ para el grupo tratado [N=13]; $p < 0,01$ para el grupo control [N=8]; por prueba para muestras apareadas de Wilcoxon). El grupo con ifenprodil mostró un mejor rendimiento que el grupo control: las diferencias de latencias (test-entrenamiento) resultaron significativamente distintas ($p < 0,05$; por prueba para muestras no apareadas de Mann Whitney).

Estos resultados muestran que ifenprodil administrado en hipocampo luego del entrenamiento, ejerció un evidente efecto facilitador o promotor sobre la consolidación de la memoria de la tarea de ST-IA.

Se comparó el desempeño en ST IA de los datos de los ensayos con ratas correspondientes a la figura 4.13, que fueron inyectadas con $6 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ de MK-801, con las de la figura 4.14, inyectadas con $4 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ de ifenprodil. Estas ratas fueron entrenadas con intensidad de choque de 0,4 mA. Los grupos control de ambos experimentos evidenciaron un desempeño similar en ST-IA, ya que no hubo diferencias significativas entre las diferencias de latencias (test-entrenamiento) ($p > 0,05$, por prueba para muestras no apareadas de Mann Whitney). En cambio, la comparación de las diferencias de latencias (test-entrenamiento) de los cuatro grupos tratados y controles, reveló que el grupo tratado con ifenprodil tuvo un mejor desempeño, significativamente diferente del resto de los grupos ($p < 0,05$ para el grupo tratado con ifenprodil vs su respectivo grupo control, y $p < 0,01$, para el grupo tratado con ifenprodil vs. grupos control y tratado con MK-801; por prueba para muestras no apareadas de Mann Whitney), lo que demuestra que ifenprodil tuvo un efecto positivo sobre la consolidación de la memoria (fig.4.14 D).

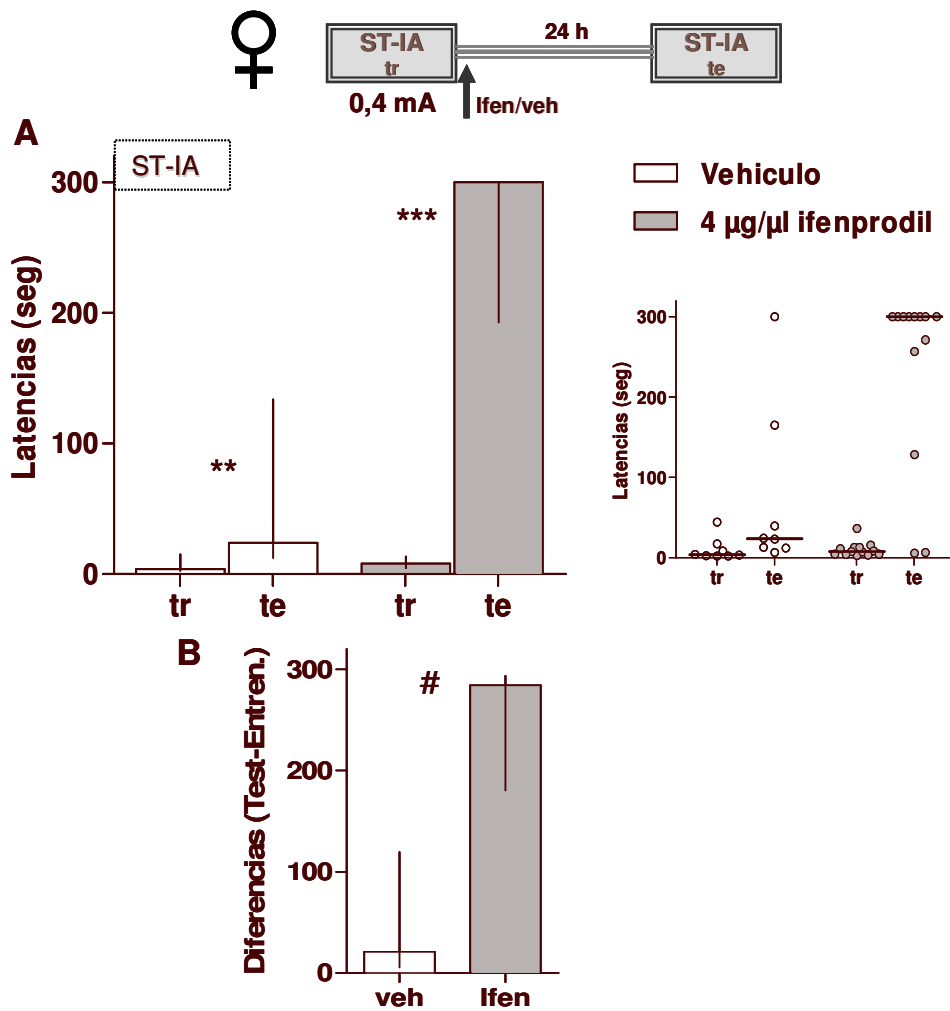


Fig 4.14: Efecto del antagonista selectivo NMDAR-NR2B ifenprodil intrahipocampo sobre la consolidación de la memoria de ST-IA con entrenamiento suave (0,4 mA).

Arriba: Esquema del diseño experimental para evaluar el efecto de ifenprodil intrahipocampo, sobre el desempeño en ST-IA. La flecha indica el momento en que se inyectó intrahipocampo vehículo; o 4 µg/µl de ifenprodil.

A: Los gráficos de barras corresponden a las medianas de latencias con sus rangos intercuartiles (25; 75) obtenidas por los grupos de ratas hembra entrenadas con choque de 0,4 mA. Las ratas del grupo tratado fueron inyectadas luego del entrenamiento con 4 µg/µl ifenprodil intrahipocampo (barras grises, N=13). Las ratas del grupo control fueron inyectadas con vehículo (DMSO en solución salina, barras blancas, N=8).

tr: latencia de entrenamiento; **te:** latencia de test.

Panel lateral: gráfico de *scatter*.

B: Diferencias de latencias (test-entrenamiento) con sus rangos intercuartiles (25; 75) de los grupos inyectados con ifenprodil y con vehículo de la parte A de la figura.

*Diferencias significativas entre entrenamiento y test por prueba para muestras apareadas de Wilcoxon (**p<0,01,***p<0,001).

Diferencias significativas entre las diferencias de latencias, prueba para muestras no apareadas de Mann Whitney (# p<0,05).

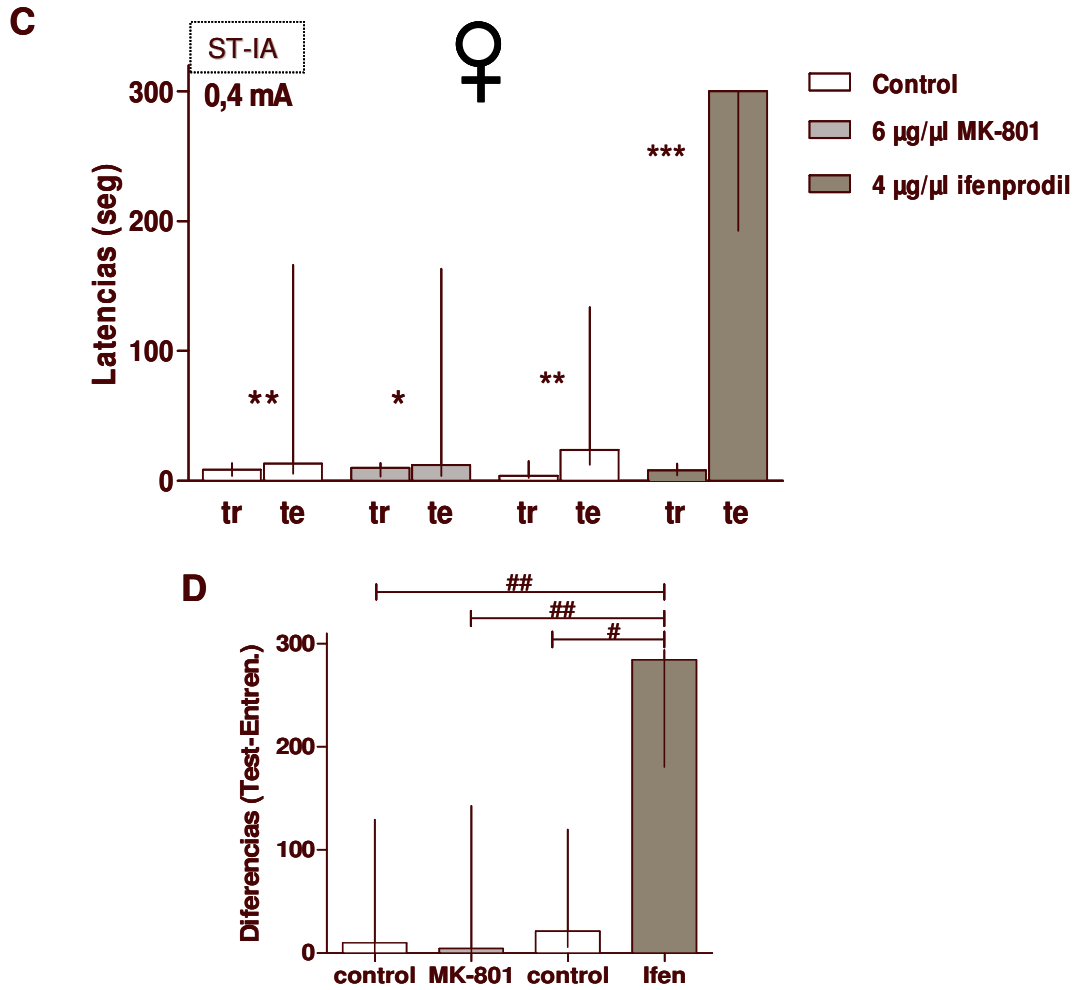


Fig 4.14 C y D: Comparación de desempeño en ST-IA entre grupos de ratas hembras inyectadas intra-hipocampo con MK-801 en alta dosis y las inyectadas con ifenprodil.

C: Las barras corresponden a las medianas y sus rangos intercuartiles de las latencias ingreso a un compartimiento oscuro de los grupos de ratas inyectadas con MK-801 (4 µg/µl, barras gris claro, grupo de la fig 4.13) o con ifenprodil (6 µg/µl; barras gris oscuro, grupo de la fig 4.14), o bien con su respectivo vehículo (barras blancas). En todos los casos, las ratas fueron entrenadas en de ST-IA con una intensidad de choque de 0,4 mA.

tr: latencia de entrenamiento; te: latencia de test.

D: Las barras corresponden a las diferencias de latencias (test-entrenamiento) con sus rangos intercuartiles (25; 75) de los distintos grupos de la parte A de la figura.

Diferencias significativas entre entrenamiento y test, prueba para muestras apareadas de Wilcoxon ($p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Diferencias significativas entre las diferencias de latencias, prueba de comparaciones múltiples de Dunns (post Kruskal Wallis, ANOVA). (# $p < 0,05$; ## $p < 0,01$)

Discusión

CAPÍTULO V

PARTE I

RELEVANCIA DE CIERTAS CONDICIONES BIOLÓGICAS Y EXPERIMENTALES SOBRE LA MEMORIA DE EVITACIÓN INHIBITORIA.

Teniendo en cuenta las dificultades que se presentan al comparar trabajos realizados en los distintos laboratorios, con roedores de diferentes bioterios, aun los pertenecientes a una misma cepa, en la primera parte de esta Tesis se analizaron los posibles efectos de varias condiciones ambientales y biológicas sobre la memoria de una tarea de evitación inhibitoria en un paso. La prueba de evitación inhibitoria de un choque eléctrico en las patas que el animal recibe al descender de una plataforma aislada, donde debe permanecer para evitarlo, constituye un aprendizaje asociativo que involucra la formación de una memoria de relativamente larga duración, con contenidos espaciales y aversivos.

Utilizando ratas Wistar adultas de nuestro propio bioterio (ver Mat y métodos pág 53), a partir de reproductores obtenidos del bioterio de la Facultad de Farmacia. y Bioquímica de la Universidad de La Plata, analizamos el efecto de la intensidad del estímulo, de la manipulación sistemática de las ratas desde el destete, las posibles variaciones por sexo, por el ritmo circadiano, por la exposición y reconocimiento de otro ambiente, distinto tanto de las jaulas de alojamiento como de la caja de entrenamiento, sobre la memoria de una tarea de evitación inhibitoria en dos versiones: por evitación del descenso desde una plataforma aislada (SD-IA) y por evitación del pasaje a un compartimiento oscuro (ST-IA).

Las ratas de nuestro bioterio recibieron una manipulación sistemática desde el destete, de tres veces por semana. Son mantenidas en un ciclo de luz oscuridad invertido (las luces se encienden de 20:00 a 8:00) de forma tal que al momento de realizar los experimentos de comportamiento se encuentren en su fase de mayor actividad (despiertas).

Efecto de la intensidad del estímulo y del sexo sobre la memoria de la prueba de SD-IA.

En relación con la intensidad del estímulo con que se entrenaron los animales en SD-IA, hubo coherencia entre el aumento de la intensidad y un incremento en las latencias de permanencia sobre la plataforma. De hecho, los machos evidenciaron una correlación entre la intensidad de estímulo aplicado y las latencias de descenso. El desempeño fue significativamente mejor para los grupos de animales que recibieron un entrenamiento “fuerte”, comparados con los entrenados con choque umbral o más suave. Sin embargo, es evidente que dentro de cada grupo, no todos los animales evidenciaron haber aprendido para cada una de las intensidades de choque utilizadas. Esto se puede atribuir a las características propias de la tarea (por ej., densidad de corriente para cada animal en función de cómo esté apoyado en la grilla), así como a las variaciones individuales (por ej., peso corporal, estrategias utilizadas por cada animal). Por eso, una de las representaciones elegidas que permite poner en evidencia cuántos animales aprendieron y cómo –cuánto tiempo permanecieron

sobre la plataforma-, fue el *scatter dot plot*. El gráfico de *scatter* para los machos (fig. 3.2) muestra que, recién a partir de intensidades de choque de 0,6 mA, algunos animales alcanzaron la latencia máxima de 120 seg durante la sesión de test.

Ha sido reportado que las ratas machos y hembras tienen **distintos umbrales de reacción** a las situaciones de estrés [263; 264; 265; 266] y frente a éstas exhiben diferente movilidad [267].

Según los primeros trabajos registrados al respecto, la reactividad a un choque eléctrico parecía estar vinculada con el género [392; 393; 394; 395], con el peso corporal y con la edad [395]. Estas diferencias en la reactividad al choque que se utiliza como estímulo aversivo en distintas tareas de aprendizaje, podrían llegar a afectar la retención de la memoria en la respuesta de evitación a un choque eléctrico en las patas.

Como se ilustra en la tabla 6.1, varios autores han reportado diferencias en el desempeño de roedores machos y hembras en evitación inhibitoria (ST-IA) (e.g. [297; 298; 299; 303; 304]) y en SD-IA [396], mientras que otros reportaron la ausencia de diferencias en SD-IA [397; 398].

En la rata [302] trabajando en un paradigma de evitación activa, observó que las hembras evidenciaron un mayor nivel de evitación que los machos. Sin embargo, Drago y col. (1980) ; Van Oyen y col. (1979) y Heinsbroeck y col. (1988).reportaron también en ratas adultas, que las hembras mostraron un desempeño más pobre **en la evitación inhibitoria (ST-IA)** [297; 303; 304]. En cambio, en otro trabajo se reportó que ratas macho evidenciaron una STM y una LTM más robusta respecto a ratas hembra de la tarea de SD-IA con choque fuerte [396].

Las fluctuaciones del **ciclo estral** en las hembras tienen una influencia notable sobre el hipocampo [241; 243; 248; 249], por eso las hembras que se utilicen deben estar en una misma sala del bioterio [399] donde haya también machos cuyas feromonas posibiliten la sincronización del ciclo. A este fenómeno se le da el nombre de efecto Whitten [400; 401]. Warren y Juraska [253] reportaron el mejor desempeño en la tarea espacial de MWM de las hembras durante el ciclo estral, que a su vez fue significativamente más pobre que el desempeño de machos [251]. Se sabe que el umbral al dolor cambia durante el ciclo estral, entonces se ha propuesto que durante el proestro las hembras son más sensibles a un choque eléctrico [295]; a ello se debería la facilitación en la adquisición de una respuesta condicionada comparadas con hembras que se encuentran en otras etapas del ciclo estral [296]. El proestro está asociado a un aumento de los niveles circulantes de estradiol, lo que se asoció a una facilitación de la respuesta de evitación; en cambio, diestro y estro se asocian con bajos niveles de estradiol, lo que se relacionó con una reducción en la respuesta de evitación [295]. Nosotros evaluamos el comportamiento de ratas adultas de ambos sexos en las distintas condiciones experimentales arriba explicitadas (Capítulo III) y también, ante el bloqueo farmacológico de receptores muscarínicos o NMDA (Capítulo IV). Cuando se compararon las diferencias de latencias (test-entrenamiento) entre los grupos de machos y hembras entrenados con igual intensidad de choque, no se encontraron diferencias significativas para ninguno de los choques utilizados. Por lo tanto, se puede concluir que los machos y las hembras -que fueron manipulados tres veces por semana desde el destete-, entrenados con igual intensidad de choque,

mostraron un desempeño similar en SD-IA. Para las intensidades de choque de 0,4 y 0,6 mA las hembras evidenciaron una tendencia a un mejor desempeño (mayores valores de medianas de latencias) respecto a los machos. En cambio, con un choque de 1 mA, fueron los machos quienes evidenciaron tendencia a un mejor desempeño.

Aunque, como se mencionó más arriba, los machos no alcanzaron el criterio de aprendizaje cuando se entrenaron con un choque de 0,4 mA, mientras que las hembras sí lo hicieron, no hubo diferencias significativas entre las diferencias de latencias para animales de ambos sexos.

Autores		Desempeño	Tarea	Shock	Modelo	Observaciones
Monleon y col. (2002)	LTM	♂ < ♀	ST-IA	0,5 mA?	ratón	Bajo efecto de fluoxetina y amitrilina
Hwang y col. (2010)	LTM	♂ = ♀	SD-IA	0,5 mA	ratón	
Everss y col. (2005)	LTM	♂	ST-IA	0,7 mA	ratón	Piracetram superó el deterioro en ST-IA causado por amitriptilina crónica
Podhorna y col. (2002)	LTM	♂ = ♀	SD-IA	0,6 mA	ratón	
Warren y Juraska(1997)	STM	♀ _{estro} > ♀ _{proestro}	MWM		Rata (120-150 DPN)	Versión espacial
Frye y col. (1995)		♂ > ♀	MWM		rata	
Myslivecek y col. (1991)	LTM STM	♂ > ♀	SD-IA	1,1-1,9 mA	Rata (60-90 DPN)	
Heinsbroeck y col. 1988	LTM?	♂ > ♀	ST-IA		Rata	
Bauer y col. (1978)		♂ < ♀	Evitación activa		Ratas (90 DPN)	
Drago y col. 1980	LTM STM	♂ > ♀ ♂ = ♀	ST-IA	0,5; 0,75 y 1 mA	Ratas adultas	
Van Oyen y col. (1979)		♂ > ♀	ST-IA		Ratas (140 DPN)	

Tabla 6.1: Resumen de los antecedentes bibliográficos que comparan el desempeño de machos y hembras en distintas tareas comportamentales.

DPN: día post natal.

Por eso, considerando toda la muestra de animales utilizados, el estímulo umbral para el aprendizaje de la tarea, para el registro de la traza y la formación de LTM, estaría entre 0,4 y 0,5 mA, para las ratas de entre 75-90 días de edad y de entre 250-300 g de peso corporal. Sin embargo, como las hembras son casi siempre algo más pequeñas que los machos de la misma edad, especialmente las correspondientes a la misma camada, por lo que sería esperable que la densidad

de corriente eléctrica a través del cuerpo fuera algo mayor para ellas, por lo que el umbral será consecuentemente menor.

Efecto de la manipulación de los animales sobre el desempeño en la prueba de SD-IA.

La manipulación sistemática parecería ejercer efectos diferentes dependiendo de las condiciones ambientales en que son criados los animales, y de la cepa con la que se trabaja.

Como vimos, los trabajos sobre manipulación sistemática están enfocados, en su gran mayoría, al período neonatal y a sus efectos posteriores. En cambio son relativamente escasos los trabajos analizando posibles efectos de la manipulación sistemática iniciada luego del destete. La tabla 6.2 resume algunos de los antecedentes de la bibliografía de aquellos trabajos en que se estudia el efecto de la manipulación sistemática iniciada después del destete.

La tabla evidencia que la práctica de manipulación sistemática tiene un efecto sobre el desempeño en distintos paradigmas comportamentales. En líneas generales, esta manipulación pareciera tener un efecto de activación comportamental.

Para evaluar la posible influencia de la manipulación sistemática que se realiza de rutina en nuestro bioterio, analizamos el desempeño de ratas macho y hembra que no la recibieron. En este caso sólo tuvieron una manipulación de rutina que se realiza también periódicamente, al cambiar la viruta de la jaula durante la limpieza (3 veces/semana) cuando las ratas son cambiadas de jaula para luego regresarlas a su jaula limpia, además de cuando se las pesa cada 15 días -este procedimiento dura menos de 5 segundos-.

Si bien el grupo de machos, que habían recibido manipulación sistemática desde el destete, entrenados con 1 mA en SD-IA, mostró una LTM más robusta, en las condiciones de nuestros ensayos, con intensidades de choque menores de 1 mA, dicha manipulación no produjo un efecto estadísticamente significativo sobre la memoria (tabla 3.1). Además, no hubo coherencia de las respuestas de evocación en relación con la intensidad del choque (no hubo correlación) en los grupos de machos que no recibieron manipulación sistemática. Los grupos entrenados con distintas intensidades de choque parecen haber tenido un desempeño similar (o no diferenciable, ya que hubo una mayor dispersión de los datos). Sin embargo, los grupos de animales que recibieron esta manipulación sistemática tuvieron valores de medianas de latencias más elevados cuando fueron entrenados con choque de 0,6; 0,75 mA, evidenciando una tendencia a un mejor desempeño respecto de aquellos animales que no recibieron esta manipulación.

En el gráfico de *scatter* se pueden observar proporciones similares de animales con latencias semejantes cuando se comparan los grupos de ratas con y sin manipulación periódica, entrenadas con igual intensidad de choque (fig 3.2 y fig 3.3). Sin embargo, entre aquellos que no fueron manipulados de manera sistemática, hubo algunos que alcanzaron valores de latencias máximos de 120 segundos durante el test sin mostrar un congelamiento (*freezing*) franco, cuando fueron entrenados con choque suave; mientras que los animales con manipulación previa tuvieron un

comportamiento relativamente más homogéneo con entrenamiento suave (ver scatter de fig 3.2 y fig 3.3).

Pero en la tarea de ST-IA, la manipulación sistemática desde el destete tuvo un efecto facilitador sobre el desempeño de las hembras entrenadas con choque de 0,5 mA (fig 3.12 B). En cambio, en los machos, esta manipulación no evidenció efecto significativo (al menos en las condiciones de estos ensayos) (fig 3.12 C).

Es posible que la manipulación necesaria para pasar a las ratas desde una jaula a otra durante la limpieza o para pesarlas, sea suficiente para “familiarizar” o habituar a los animales a esa operación y disminuir o anular –o enmascarar- la posible incidencia de la manipulación sistemática sobre la SD-IA.

En síntesis, la manipulación pareció tener efecto facilitador en SD-IA con entrenamiento fuerte, y en ST-IA aún con entrenamiento suave. Si bien dicha manipulación sistemática desde el destete no pareció tener efecto significativo sobre la SD-IA en los machos, con entrenamiento suave, la experiencia de los entrenadores permitió concluir que simplificó y facilitó la necesaria manipulación de las ratas durante los ensayos: los animales estaban más relajados, eran más dóciles, notablemente menos agresivos respecto de los que no la recibieron, de modo que esos animales podían considerarse habituados a la manipulación humana [402; 403]. Por esa razón, todos los ensayos que siguen fueron efectuados con animales que recibieron manipulación sistemática desde el destete.

Inicio de manipulación	Género	Cepa	Frec. semanal	Duración	Edad	Tarea	Observaciones	Autores
Post destete	Machos	Albino Black y brown hooded	4 veces	1 min	3 y 6 meses	Campo abierto	Aumenta act exploratoria	Reboucas, 1997 [404]
Post destete	Hembras	Black Hooded	7 veces	1 min	4 meses	Campo abierto	Aumenta act exploratoria	[405]
3 semanas pre ensayo	Machos	Wistar	2 veces	5 min	3 meses	Campo abierto	Disminuye exploración parte central de la arena	Hirsjarvi, 1995, [402]
Post destete	Machos y hembras	Wistar	7 veces	5 min	3 meses	Campo abierto	Disminuye exploración parte central de la arena	Cannizzaro, 2001, [406]
5 días pre ensayo							Sin efecto	
Post destete	Machos	Wistar	3 veces	5 seg	3 meses	Inhibición al pre-pulso	Recupera respuesta de alarma del efecto de aislamiento	Rosa, 2005, [407]
2 días pre ensayo	Machos	Ratones C57BL/6J	2 veces	5 min	2 meses	Reconocimiento de objetos novedosos	Aumenta la exploración de objetos	Powell, 2004, [403]

Tabla 6.2: Resumen de los antecedentes bibliográficos que comparan el efecto de la manipulación sistemática iniciada luego del destete de machos y hembras en distintas tareas comportamentales

INTERACCION ENTRE TAREAS DIFERENTES.

Efecto de la exposición al campo abierto sobre la memoria de SD-IA.

En nuestro laboratorio y en muchos otros, se suele colocar a los animales en una caja distinta de su vivienda habitual o, más comúnmente, en un campo abierto por ejemplo, en una o en dos oportunidades con la finalidad de habituarlos a la manipulación por el experimentador y al cambio de ambiente (ver Introducción, pag 44 y Mat. y métodos pag 54). De este modo se trata de reducir el efecto en general, y el estrés en particular, causados por la novedad tanto de ser manipulados por los experimentadores, como de ser colocados en una arena desconocida, para luego ser entrenados en una tarea con componentes claramente aversivos. Como el procesamiento de diversas memorias, en particular la de la evitación inhibitoria, depende, al menos en parte, de las mismas estructuras cerebrales que la habituación a un ambiente, nos interesaba investigar la posible interacción entre ellas. Como parecía claro que nuestros animales aprendían mejor las tareas con componentes aversivos luego de las exposiciones al campo abierto [408; 409], nos propusimos evaluar sistemáticamente esta observación. Además, por las contundentes evidencias acerca de la relevancia de la historia previa de las sinapsis para el establecimiento de la plasticidad sináptica que debe subyacer al procesamiento de información [165; 166; 172; 177] analizamos formalmente el posible efecto de la exposición previa al OF sobre la SD-IA.

Como se puede ver en la Tabla 6.3, la literatura muestra que la exposición a un ambiente o tarea novedosa antes o después de evitación inhibitoria, produjo distinto tipo de interacciones con esta tarea.

En resumen, se describieron interferencias o efectos de facilitación o de promoción del desempeño en tareas de evitación inhibitoria por exposición a una experiencia novel como la exploración de un nuevo ambiente. Se produjo interferencia sobre la SD-IA por la exposición a una sesión de dos minutos en el OF realizada 1 h después del entrenamiento en SD-IA (con choque de 0,4 o 1 mA). Como también hubo interferencia por la exposición a dos sesiones en el OF, de 2 min cada una, realizadas 5 min antes y 1 h después del entrenamiento [175], mientras que 2 h antes del entrenamiento ya no hubo efecto [169].

También hubo interferencia cuando la exposición se realizó 2 h luego [169] pero no 6 h después de entrenamiento en SD-IA [2]. En cambio hubo promoción de la formación de una LTM cuando se expuso a las ratas a una sesión de OF 1 h antes, 15 min o 1 h después de entrenamiento subumbral en SD-IA [170].

Teniendo en cuenta que: a) en muchos laboratorios, incluyendo el nuestro, se expone de rutina a los animales a un ambiente novedoso, distinto a la vivienda habitual en la que son mantenidos para su crianza hasta el momento del entrenamiento en las tareas de comportamiento; b) que el OF produjo facilitación 1 h antes del entrenamiento subumbral en SD-IA, pero que a las 2 h no parece haber ejercido efecto significativo alguno sobre la formación de una LTM de la tarea, y c) que habíamos observado un aparente mejor desempeño en SD-IA cuando exponíamos a las ratas a dos sesiones

en el OF antes del entrenamiento para habituarlas a esa manipulación por el experimentador y al cambio de ambiente, investigamos si la exposición a una sesión en el OF (experiencia novedosa) o a dos sesiones (habitación al ambiente nuevo), en un tiempo intermedio, de 1 h 30 min antes del entrenamiento, podía modificar la adquisición y/o la consolidación de la memoria de la SD-IA. La cercanía temporal entre la segunda sesión de OF y el entrenamiento en evitación inhibitoria podría dar lugar a solapamiento entre los fenómenos que subyacen a la evocación, con el posterior período de labilización de esa memoria de la experiencia en el OF y la adquisición de SD-IA. Por lo tanto, esto podría causar algún tipo de modulación sobre la adquisición y posterior rendimiento en SD-IA, ya sea de signo positivo facilitando la formación de la traza, o negativo, interfiriendo con su registro.

Efecto de una o dos sesiones en el campo abierto sobre el desempeño en SD-IA en animales entrenados con estímulo suave (0,5 mA).

Comprobamos que una sola exposición de 3 o de 5 minutos al campo abierto, una hora y media antes de un entrenamiento en SD-IA con estímulo suave cercano al umbral, no modificó de manera evidente el desempeño de grupos de machos en esta tarea [410; 411]. Posteriormente tuvimos resultados similares con las hembras. Por lo tanto, a esta altura del trabajo, se podía suponer que no había habido interferencia ni otro tipo de interacción con la formación de la memoria de SD-IA.

Se ha propuesto que la inducción de la LTP está asociada con la formación de una “etiqueta sináptica” en aquellas sinapsis que fueron activadas mediante la aplicación de un estímulo de tipo tetánico. Esta etiqueta tendría el rol de secuestrar proteínas vinculadas con plasticidad sináptica, que servirían para estabilizar aquellos cambios sinápticos transitorios, de manera que esos cambios extenderían su persistencia. Es decir, que una LTP temprana podría ser transformada en una LTP tardía dependiendo de la historia de activación de la neurona durante el período previo o posterior a su inducción (dentro de un intervalo de 2 horas aproximadamente) [177; 412]. Como la LTP es un proceso que se postula como mecanismo que subyace a los procesos de memoria y aprendizaje, esta posibilidad de modificar la persistencia de la LTP podría ser un proceso que permitiría extender la ventana temporal para la transformación de un STM en una LTM [177; 412].

Autores	Modelo	Tarea descripción	Tarea	Choque	Test	Intervalo entre OF o exposición a novedad respecto al entrenamiento en IA											Resultados				
						-2h	-1h	-30'	-15'	-5'	0'	15'	20'	1h	2h	3h		6h			
Izquierdo y McGaugh, 1985	Ratón macho	Caja c/techo de alambre tejido	ST-IA		24 h		X											Impide facilitación por naloxona			
Netto y col., 1985	Rata hembra	OF (2 min) c/ tono (+)	SD-IA	0,5 mA	22 h	X												Sin efecto			
														X				Interferencia –			
Izquierdo y Pereira, 1989	Rata hembra	OF (100 seg)	SD-IA	0,2 mA	6 h										X			Interferencia –			
Izquierdo y col., 1999	Rata macho	OF (2 min)	SD-IA	0,4 mA (1 mA)	0 h, 4h, 48h, 72h y 96 h (en cada animal)									X				Interferencia –			
																	X		Sin efecto		
										X(*)											Sin efecto
										X(*)					X						Interferencia –
Blake y col., 2011	Ratón macho	Hole board (≥60seg)	ST-IA	1,2 mA	24 h							X					Interferencia –				
Moncada y Viola. 2007	Rata macho	OF (5 min)	SD-IA	0,15 mA	24 h	X												Sin efecto			
							X											Promovió LTM			
								X											Sin efecto		
												X							Promovió LTM		
																X			Sin efecto		

Tabla 6.3: Resumen de los antecedentes bibliográficos que estudian el efecto de la exposición a una experiencia comportamental distinta (en muchos casos novedosa) a distintos tiempos respecto del entrenamiento en diferentes paradigmas comportamentales.

Nota: (X) Las cruces rojas señalan aquellos casos en que la exposición a la novedad o a la exposición al OF, evidenció tener efecto significativo.

(+) pasados los 2 min de exploración al OF se realizaron 20 presentaciones consecutivas de tonos de 70 dB de 5 seg de duración, con una frecuencia de 1 kHz, con un intervalo entre ellos que variaba aleatoriamente entre 10 y 30 seg.

(*) hay interferencia significativa si la duración de la primera sesión (realizada 5 min antes del entrenamiento en SD-IA) es de 2 min. Si esta exposición es de 5 min, no hay interferencia.

Ha sido reportado en ratas que, luego de un entrenamiento débil en SD-IA que no generaría una memoria de largo plazo, la exploración de un campo abierto dentro de un tiempo próximo al entrenamiento permitió evidenciar una LTM de la SD-IA. El efecto promotor del campo abierto sobre la memoria de SD-IA dependería de la activación de los receptores de dopamina D1/D5 y requeriría de la síntesis proteica del hipocampo dorsal. Entonces los autores propusieron haber evidenciado un proceso de “etiquetado comportamental”, en el que la exploración de un ambiente novedoso proveería de proteínas vinculadas con plasticidad sináptica, que estabilizarían la traza de memoria de la SD-IA [170]. La experiencia comportamental previa de un animal puede llegar a influir la dirección y probabilidad de una plasticidad de larga duración inducida en sinapsis activas. Montanis y Maroun (2010) estudiaron las alteraciones en la inducción de la LTP en la región CA1 del hipocampo de la rata, asociadas a la evocación de una memoria de miedo [172]. Cuando se realizó el test en el mismo contexto del condicionamiento 1 hora después del entrenamiento, se comprobó una inhibición en la inducción de LTP. En cambio, la exposición a un ambiente novedoso 1 hora después del mismo condicionamiento del miedo, estuvo asociada a un incremento de la magnitud de la LTP, con respecto a grupos que fueron entrenados al condicionamiento del miedo y que permanecieron en sus jaulas hasta el momento del registro electrofisiológico. A su vez, cuando se expuso a los animales a un ambiente novedoso 24 h después del condicionamiento, la expresión de la LTP se vio inhibida [172].

Teniendo en cuenta que en la “hipótesis del etiquetado sináptico” [177] y el requerimiento de síntesis proteica para el establecimiento de una LTM, los intervalos propuestos para que haya influencia detectable de una tarea sobre otra serían de alrededor de 60 minutos o menos [166; 169; 170; 172; 175; 177; 383], ensayamos un intervalo de 50 min, comparado con el usualmente utilizado de 90 min. Cuando la exposición al OF tuvo lugar 50 min antes del entrenamiento suave en SD-IA, no hubo diferencias significativas en el entrenamiento ni en el test de SD-IA respecto a cuando se realizó el OF 90 min antes (fig 3.4 B), ni con respecto a aquellos animales no expuestos al OF (animales entrenados con 0,5 mA de la fig 3.2). Es decir que el intervalo entre ambas tareas no pareció influir en la adquisición ni formación de la LTM de la SD-IA.

Recapitulando, cuando se entrenaron ratas macho con una intensidad de choque umbral en SD-IA, la exposición previa a una única sesión en el OF durante 3 o 5 min (fig 3.4 A), o bien a dos sesiones de 3 min (fig 3.6) que dieron lugar a habituación a la arena, no modificaron significativamente el desempeño en SD-IA, no habiendo diferencias durante el entrenamiento y expresándose una LTM equivalente en todos los casos. Y como se señaló en la sección anterior, tampoco la duración del intervalo entre ambas tareas (50-90 minutos) modificó la expresión de la memoria de SD-IA (fig 3.4 B). Las hembras tampoco manifestaron cambios evidentes en similares condiciones (fig 3.7 A). Sin embargo, recordemos que las hembras tuvieron un umbral levemente inferior, de 0.4 mA (fig 3.2) y que fueron en general más pequeñas que los machos de la misma

camada. Es posible entonces que el entrenamiento con 0,5 mA deba ser considerado más fuerte que para los machos (ver mas adelante, CI vs. CD, pags 92-96).

Por otra parte, el campo abierto no modificó significativamente las memorias de corta duración en SD-IA. Sin embargo se observó que la mediana de latencias de la evocación de la STM fue mayor que las de la LTM para las ratas que no tuvieron exposición al OF.

No hubo diferencias significativas, ni para STM ni para LTM de SD-IA con entrenamiento suave en los animales sin y con exposición previa al OF, al menos en las condiciones de estos ensayos.

Efecto del OF en animales entrenados en la prueba de SD-IA con choque fuerte.

Luego de dos sesiones en el OF hubo una notable modulación positiva sobre la memoria de SD-IA, cuando se entrenó a las ratas con un estímulo considerado fuerte.

En consecuencia, podemos decir que la exposición a dos sesiones de OF en dos días consecutivos, previamente al entrenamiento fuerte en SD-IA, dio lugar a una facilitación en el aprendizaje y/o en la consolidación, que se manifestó en la expresión de una memoria de larga duración más robusta de esta tarea.

En este punto debe señalarse que se trató de comparar exclusivamente los resultados dentro de ensayos realizados en simultaneidad con animales de una misma camada, o al menos dentro de la misma semana (por ejemplo, fig 3.8). Por ello, por la gran dificultad para controlar estrictamente todas las condiciones ambientales que podrían influir y por la enorme variabilidad individual, lo que lleva a una gran dispersión en las respuestas comportamentales, nosotros y otros investigadores consideramos que, en este tipo de experimentación, las comparaciones más válidas son las que se realizan intra-ensayo.

Dos breves exposiciones a un campo abierto, que constituirían una experiencia poco -o nada-aversiva, posibilitaron la habituación de las ratas a la arena, y generaron una notable facilitación sobre la memoria de larga duración de una tarea aversiva como es la evitación inhibitoria de un choque en las patas, cuando se trató de un entrenamiento “fuerte”. En cambio, este efecto “facilitatorio” del OF sobre la LTM de SD-IA no se evidenció en el caso de animales entrenados con un choque umbral. Sin embargo, estos grupos de animales expuestos a 2 OF mostraron una mayor proporción de individuos con valores de latencias muy elevadas o máximas durante el test, manifestando una tendencia aun cuando no resultó estadísticamente significativa (ver figs 3.7 B; 4.1; 4.2;4.3 4.4).

Además, estos resultados permiten concluir que el efecto del OF dependería del nivel de entrenamiento, lo que indica que podría depender de la relevancia comportamental del estímulo. Se puede especular que un choque más intenso (por lo tanto más doloroso y aversivo, representando entonces un estímulo muy relevante para el comportamiento) producirá una estimulación sensorial

mayor. Este reclutaría más circuitos neuronales de la misma región, y tal vez de otras áreas cerebrales involucradas, produciéndose la inducción concomitante de cambios plásticos en las sinapsis implicadas, de manera de establecer un registro muy robusto de esa memoria y de las respuestas acordes. Por otra parte, desde un enfoque evolutivo, podría representar menos costo el que una experiencia poco o nada aversiva (OF) se asociara (facilitando) fuertemente con una aversiva, sólo cuando esta última fuera comportamentalmente relevante (por ej., produciendo dolor fuerte o daño).

Izquierdo y col. (2001) habían reportado que la exposición al campo abierto por 5 min inmediatamente antes del test, o también 1 o 2 horas antes del test realizado 24 horas después de entrenamiento en SD-IA con un choque suave mejoró significativamente el desempeño de ratas [171]. Esta mejora dependió de la activación de MAPKinasas, y del RNMDA del hipocampo ya que su inhibición, 10 min antes de la exposición al ambiente novedoso, impidió que se manifestara el efecto del OF sobre la evocación de la SD-IA. En otro trabajo, la exposición de ratas Wistar durante 2 min al OF, 1 h después del entrenamiento en SD-IA (tanto con choque suave, como con choque fuerte) produjo interferencia sobre la evocación de SD-IA evaluada a las 24, 48, 72 y 96 h. Cuando las ratas fueron expuestas a dos sesiones de OF, realizadas 5 min antes (1ra sesión) y 1 hora después (2da sesión) del entrenamiento en SD-IA, evidenciaron formación de LTM si la duración de la primera sesión en el OF fue de 5 min (durante esta sesión se evidenciaba habituación al ambiente novedoso). En cambio si la duración de la primera sesión fue de 2 min (durante la cual no se evidenciaba habituación al ambiente novedoso) hubo interferencia sobre la evocación de SD-IA [175].

Luego se reportó que una sesión de 5 minutos en el OF 1 h antes del entrenamiento en SD-IA con un estímulo subumbral (0,15 mA) que no sería capaz de formar una LTM (o una LTM que se exprese en el test), resultó en una memoria evidente a las 24 h. [170]. En cambio no se evidenció este “efecto promotor” del OF sobre la memoria de SD-IA, cuando expusieron a las ratas a una sesión de 30 min en el OF el día anterior y volvieron a exponerlas a una segunda sesión de 5 min, 1 hora antes del entrenamiento en IA. De este modo las ratas estaban habituadas a la arena antes del entrenamiento en IA. En consecuencia, atribuyeron a la novedad de una única exposición breve en el OF el efecto de mejorar el desempeño y la expresión de una LTM de SD-IA [170].

En el modelo de memoria del cangrejo *Chasmagnathus granulatus*, el animal asocia el contexto del entrenamiento con un estímulo visual de peligro que le pasa por arriba. Luego de una presentación iterativa espaciada del estímulo visual, una fuerte respuesta de congelamiento (*freezing*) reemplaza la respuesta de escape inicial [413]. Smal y col. (2010) utilizando este modelo, reportaron que luego de un entrenamiento débil, que da lugar a una memoria que no se expresa en el largo plazo [414; 415], una única presentación del contexto junto con el refuerzo puede aumentar la expresión de dicha memoria [415]. El descubrimiento de que el comportamiento se sustenta en una traza diferente para una STM que para una LTM, es consistente con la idea de procesos paralelos en la

consolidación [416; 417]. Por un periodo corto luego de un aprendizaje débil, la respuesta más adaptativa podría ser expresar el comportamiento adquirido más recientemente (STM), mientras que durante la consolidación de LTM, una experiencia reciente continuaría siendo evaluada. Esto podría ser especialmente significativo cuando se trata de experiencias aversivas, ya que una sobreestimación de la relevancia de un estímulo peligroso resultaría menos costosa que la subestimación del mismo [415]

Hay abundante evidencia a través de todo el *Phylum* Cordados de que una memoria débil, mientras está siendo consolidada, puede ser reforzada por una experiencia de aprendizaje débil o por la evocación [418; 419]. Entonces, un entrenamiento que induzca STM pero no LTM, puede ser “fortalecido” por la presentación de un ensayo recordatorio, tanto durante la consolidación como durante el período de expresión de la STM [415; 420]. Sin embargo, la evocación durante la consolidación, cuando se evaluó STM, 40 minutos, o 1 h 30 min luego del entrenamiento no modificó la expresión de la LTM a las 24 h (Izquierdo y col, 1999 [2] y nuestros resultados, comparación entre fig.3.7A vs. fig 3.7 B pags 86 y 88). En cambio la exposición durante 90 seg al contexto de entrenamiento realizada inmediatamente antes de la sesión de test (evaluada 3 semanas después del entrenamiento), dio lugar a una facilitación en la evocación en un modelo de “olvido espontaneo”. En este modelo las ratas son entrenadas para discriminar entre seis unidades para obtener alimento de recompensa, y evidencian un severo déficit en la evocación evaluada a las 3 semanas [421].

En el caso de nuestros ensayos con dos exposiciones al OF, de 3 minutos previas a la IA, siempre se redujo al menos algún parámetro relacionado con el comportamiento exploratorio. El número de cruces y/o el de elevaciones sobre los miembros posteriores, disminuyeron significativamente en la segunda sesión en el OF, indicando habituación de las ratas a la arena. Entonces, en nuestro caso, el efecto facilitatorio del OF sobre la SD-IA con un choque fuerte, difícilmente podría atribuirse exclusivamente al factor novedad.

Por otra parte, en las condiciones de nuestros ensayos con entrenamiento débil de ratas criadas en ciclo invertido (ver siguiente sección) no se ha evidenciado modificación evidente en la memoria de SD-IA por la exposición a una única sesión previa en el OF, ya sea durante 3 o 5 min, ni por exposición a dos sesiones ni tampoco se evidenció modulación alguna cuando el intervalo entre el OF y el entrenamiento en IA fue de 50 o 90 min.

Es posible que estemos en presencia de un fenómeno diferente al menos en parte, al de promoción de una LTM por efecto de la novedad luego de entrenamiento subumbral, ya que cuando el choque fue cercano al umbral no se evidenciaron diferencias en la expresión de la LTM en estos animales. También en los ensayos de farmacología hubo evidencias de ello, como veremos más adelante. Además, la doble exposición al mismo ambiente, que dio lugar a habituación, produjo una notable facilitación en la LTM cuando se trató de un entrenamiento considerado “fuerte”.

INFLUENCIA DEL CICLO LUZ/OSCURIDAD SOBRE LA MEMORIA EN LA RATA.

La gran mayoría de los estudios de comportamiento realizados en roedores (principalmente rata/ratón) reportados en la literatura fueron realizados durante la fase luminosa del ciclo luz/oscuridad, siendo este momento del día el de menor actividad para animales de hábitos nocturnos (noche subjetiva).

Algunos de los resultados de la literatura indican que distintos procesos de aprendizaje fueron afectados diferencialmente con el momento del día en que ocurren. Por ejemplo, algunos trabajos han demostrado en ratas que la adquisición de una tarea de evitación. (*shuttle avoidance*) y del laberinto radial de 8 brazos, resultó mejor durante el período de oscuridad [349; 350]. Por el contrario, se evidenció en ratas que la adquisición de la evitación activa, ocurrió más rápido en animales durante momentos específicos en el día, comparados con otros momentos del día o de la noche [351; 422]. Mientras que otros grupos no evidenciaron diferencias, durante el día o la noche, en la adquisición de la tarea de evitación (*shuttle avoidance*) en los grupos de ratas control que no recibieron tratamiento [353; 354; 355]. No queda claro en la mayoría de los casos reportados, si los ensayos de comportamiento se realizaron en oscuridad absoluta, ya que debe tenerse en cuenta que la incidencia de la luz durante la fase nocturna podría haber afectado el desempeño del animal en la tarea [321].

En un paradigma de condicionamiento del miedo (contextual y con claves) en ratones (que recibieron manipulación sistemática 1 min diario durante la semana previa al experimento de comportamiento) se reportó que adquirieron más rápidamente el condicionamiento cuando fueron entrenados durante el día comparados con otro grupo entrenado durante la noche [321]. Además el grado de evocación del contexto y de un tono fue máximo durante el día (independientemente del momento en que se produjo la adquisición) al menos durante los 3 días posteriores al entrenamiento. Por otra parte, se observó que los animales entrenados durante la noche evidenciaron mayores niveles de extinción respecto de aquellos entrenados durante el día. En estas tres fases de la memoria (adquisición, evocación y extinción) se evidenció la existencia de un ritmo cuya fase se vio controlada por el ciclo luz/oscuridad (L/O). Cuando se revirtió la fase del ciclo L/O, la fase de estos ritmos también se vio revertida. Además estos tres ritmos continuaron aun en oscuridad constante, demostrándose así la naturaleza endógena y circadiana de los ritmos. Estos resultados evidencian un mejor desempeño de esta tarea durante el día, coincidiendo con el momento de menor actividad de los ratones. Los autores interpretaron que estas diferencias podrían deberse a que para los animales de hábitos nocturnos, el día es principalmente un período más “intimidante”, y ese estado de temor pudo haber ocasionado una mejora en el desempeño [321].

Lesiones en el núcleo supra-quiasmático de la rata [423] eliminaron las variaciones rítmicas (de 24 h) en el desempeño de la tarea de evitación pasiva.

Se ha demostrado que la LTP padece de variaciones a lo largo del día. Barnes et al. (1977) han demostrado que las respuestas sinápticas en las células granulares del hipocampo de la rata ante la estimulación de las fibras aferentes de la corteza entorrinal fluctúa con un período de 24 h [357]. Además reportaron, que la mayor actividad sináptica en las ratas se observó en la mitad de la fase oscura; mientras que la menor actividad se evidenció en la mitad de la fase luminosa.

Harris y Teyler [358] observaron que la LTP post tetánica fue más robusta en rodajas de la región CA1 del hipocampo obtenidas, durante el día, mientras que en las obtenidas durante la noche se evidenció una LTP posttetánica más robusta en el giro dentado. Del mismo modo, se registró una mayor amplitud de la LTP en las neuronas piramidales de la región CA1 cuando se obtuvieron las rodajas durante el día, respecto a rodajas obtenidas durante la noche [359].

En animales mantenidos en CD, cuando los ensayos de comportamiento se realizan durante el periodo de sueño del animal, de alguna manera se podría estar generando un efecto de privación de sueño. Esta privación, previa al entrenamiento podría tener incidencia sobre la consolidación de esa memoria. Se demostró que la privación de sueño previa al entrenamiento deterioró la codificación de la memoria de numerosas tareas [344; 345]. Por ejemplo, en la versión dependiente de hipocampo del laberinto acuático de Morris (con plataforma no visible), Guan y col. (2004) demostraron que 6 horas de completa privación de sueño, previamente al entrenamiento, generó un serio deterioro en la consolidación de la memoria (evaluada a las 24 h) [346].

La privación de sueño REM (REM viene de *rapid eye movement*; fase de sueño de movimiento rápido de ojos) tuvo efecto perjudicial en la consolidación de tareas dependientes de hipocampo, como aprendizaje de evitamiento (de uno o dos pasos: *one-way and two-way avoidance learning*), *aversión* a un gusto (*taste aversion*), y tareas de evitación pasiva de un choque (ver [344; 347]). Se ha reportado que lapsos de 5 h de privación de sueño REM en ratas, previos al entrenamiento en el aprendizaje de evitación de dos vías deterioró significativamente la consolidación de esta tarea, produciendo déficits que no pudieron superarse con práctica adicional durante el entrenamiento [348].

Ruskin y col. (2004) demostraron, en la versión contextual del condicionamiento del miedo (dependiente de hipocampo), que la privación previa al entrenamiento, principalmente de sueño REM, desmejoró notablemente la codificación de memoria contextual evaluada 24 h después [424]. La privación de sueño afectó negativamente la codificación de memorias declarativas en humanos, desencadenando un bajo nivel de retención evidenciado dos días más tarde. Este efecto negativo de la privación de sueño sobre la codificación tuvo mayor impacto sobre estímulos con connotación positiva. En menor medida afectó la codificación de estímulos emocionalmente neutros. Mientras que la codificación de los estímulos con connotación negativa fue la menos afectada por la privación de sueño [340].

Efecto del OF sobre el desempeño en la prueba de SD-IA en animales en CD entrenados con choque suave (0,5 mA) durante su período de sueño (mantenidos en ciclo luz/ oscuridad derecho).

Habiendo comprobado que el campo abierto ejerció un efecto facilitador sobre el desempeño en SD-IA en grupos de machos entrenados con una intensidad de choque fuerte (figura 3.8), se estudió este fenómeno en animales criados con ciclo luz/oscuridad derecho, teniendo en cuenta que casi todos los trabajos publicados han sido realizados con roedores originalmente de “hábitos nocturnos”, mantenidos en ciclo derecho y entrenados durante su periodo de “sueño subjetivo”.

Recordemos que nuestros resultados muestran que la exposición a una sesión de campo abierto (1 h 30 min antes del entrenamiento en SD-IA), mejoró significativamente el desempeño en SD-IA de ratas macho entrenadas durante su período de sueño con una intensidad de choque suave de 0,5 mA (fig. 3.9). En cambio, para los animales criados en ciclo invertido y entrenados en condiciones similares, pero durante la fase en que suelen estar despiertos, o sea durante el tiempo de mayor actividad, no hubo diferencias significativas entre las ratas machos expuestas a una, dos o ninguna sesión en el OF, aunque en algunos caso las medianas tendieron a ser más altas luego de exposición al OF (Fig. 3.7 B).

Debe tenerse en cuenta que los animales CD entrenados en su fase de sueño, demoraron más tiempo en descender de la plataforma durante el entrenamiento en SD-IA, es decir que tuvieron latencias de entrenamiento más prolongadas, con respecto a los grupos CI entrenados durante su fase de mayor actividad). En cuanto a la comparación de los test, en los grupos de animales expuestos a 1 sesión de OF se comprobó un mejor desempeño de aquellos en CD. Y también las diferencias de latencias de los grupos que fueron expuestos a dos sesiones de OF fueron significativamente mayores para aquellos animales mantenidos en CD, respecto de los mantenidos en CI (fig 3.9 C). Entonces la exposición previa al campo abierto, tanto a una como a dos sesiones, tuvo un efecto facilitatorio significativo en el desempeño en SD-IA, en machos entrenados durante su período de sueño, con una estimulación umbral.

Por lo tanto, podemos concluir que los animales en CD parecieron más sensibles al efecto del OF que los animales en CI, expresando una memoria de largo plazo más robusta de la SD-IA aun con un entrenamiento débil. Sin embargo, el hecho de que la motricidad aparezca algo disminuida en las ratas CD, debe ser tenida en cuenta: tanto en el OF, donde el número de cruzamientos fue menor en la primera o en una única sesión, como en el entrenamiento en la SD-IA, en que los animales tuvieron latencias significativamente mayores para descender de la plataforma. Una mayor latencia en el entrenamiento permitiría una ventana más amplia para el establecimiento de las necesarias asociaciones y para el condicionamiento.

También debe tenerse en cuenta el factor atención, ya que las ratas CD no expuestas al OF, parecieron explorar menos sobre la plataforma, a veces hasta dormirse por segundos sobre la

misma, mientras que las ratas que habían sido expuestas antes al OF, podrían haber estado más atentas y despiertas al ser manipuladas nuevamente al cabo de 90 minutos y ser colocadas en un ambiente diferente. No podemos descartar los posibles efectos de alerta o recordatorios que podría ejercer la segunda manipulación y exposición a un nuevo ambiente, pudiendo resultar en un mayor grado de atención durante el entrenamiento. También hay que tener en consideración las condiciones de iluminación en que se realizaron los experimentos. Con los animales criados en CI, los ensayos de comportamiento se realizaron en condiciones de oscuridad para la rata (con luz roja) para no interferir sobre el ciclo de luz/oscuridad de los animales. En cambio, los ensayos de comportamiento de los grupos criados en CD se realizaron con luz blanca (ya que se realizaron durante el período de luz del ciclo para estos animales). En las ratas la luz tiene un efecto de disminución locomotora [278; 279; 362; 363], y las condiciones de iluminación de los ensayos de comportamiento fueron distintas para los animales criados en CD respecto a los criados en CI. Esta diferencia en iluminación podría explicar en parte las diferencias de actividad locomotora.

Si bien lo consideramos poco probable no se puede descartar que estas diferencias en el desempeño en el desempeño de los animales mantenidos en CD respecto a los mantenidos en CI, podrían deberse a diferencias sensoriales, motrices o motivacionales, y no a diferencias en la memoria *per se* [321].

Efecto del OF sobre el desempeño en SD-IA en animales en CD entrenados con choque fuerte (de 0,75 mA) **durante su periodo de sueño** (en ratas mantenidas en ciclo luz/ oscuridad derecho).

Las ratas criadas en CD evidenciaron una mejora significativa en el desempeño en la tarea de SD-IA, con entrenamiento fuerte, por la doble exposición al OF (fig 3.10 B).

Cuando se comparó el desempeño en SD-IA con entrenamiento suave, de las ratas en CI versus aquellas en CD, luego de exposición a dos sesiones en el OF, se comprobó que las ratas CD parecieron formar una memoria más robusta que las CI y que las CD no expuestas al OF (fig 3.9 C). Cuando el entrenamiento fue fuerte, la expresión de la LTM de SD-IA, para las ratas criadas en CD o en CI (fig 3.10 C) luego de la doble exposición al OF fue más robusta y similar entre ambos grupos. Las posibles diferencias sensoriales, motrices o motivacionales de los animales en CD respecto a los animales en CI, podrían ser la causa por la cual los animales en CD requieran de un estímulo más suave para evidenciar el efecto del OF. Es decir, estímulos más suaves resultarían más salientes para los animales durante su fase de sueño, que durante el período de mayor actividad.

Una diferencia muy sobresaliente de los animales CD con respecto a los CI, fue la menor actividad locomotora de los primeros, que se manifestó en el campo abierto como una menor cantidad de número de cruces totales (tabla 3.4), y en la SD-IA se manifestó en los valores más elevados de las medianas de latencias durante el entrenamiento. Si bien los animales que se encontraban en su fase

de sueño evidenciaron una menor actividad locomotora, tuvieron un mayor número total de elevaciones sobre los miembros posteriores que los animales mantenidos en CI, indicando un cambio en el perfil comportamental de exploración. Nuestros resultados indican que los animales en CD (que fueron evaluados en SD-IA en su momento de menor actividad locomotora) tuvieron un mejor desempeño en esta tarea con respecto a los animales en CI (entrenados durante la fase de mayor actividad locomotora), se requeriría hacer otros ensayos para establecer una relación directa entre la locomoción y el mejor desempeño en SD-IA. Los ritmos circadianos de actividad locomotora a lo largo del día no parecen buenos predictores del momento óptimo para obtener un mejor desempeño en una tarea de memoria. Los ritmos circadianos de formación de memoria en especies nocturnas, diurnas y crepusculares no correlacionan visiblemente con su ritmo de actividad locomotora. Por ejemplo, el mejor desempeño en tareas que evalúan memoria ocurre durante la fase activa en especies diurnas como zebrafish [425] (*D. rerio*) y de la babosa de mar [322; 426], (*A. californica*), pero en la fase inactiva del ratón doméstico de hábito nocturno [321] (*M. musculus*) y de la mosca de la fruta de hábitos crepusculares [427] (*D. melanogaster*) Ello sugiere que los niveles de actividad no están directamente vinculados con los cambios a lo largo del día en la capacidad de formación de memoria, dado que hay una clara disociación entre el ritmo actividad/descanso y el desempeño cognitivo en distintos modelos cronobiológicos. Entonces, esto nos indica que otros factores por fuera del estado comportamental pueden estar involucrados, apoyando la teoría de que el ciclo, en el transcurso del día, de eventos moleculares y celulares específicos son los que determinan el aumento de la capacidad de memoria en determinados momentos en el día. Entre los procesos que se encontrarían involucrados se encuentran la transcripción y traducción de genes, fenómenos epigenéticos, liberación de neurotransmisores, excitabilidad sináptica, actividad neuronal y secreción hormonal. A su vez, cada uno de los procesos previamente mencionados, puede tener efectos diferentes en cada una de las fases de formación de memoria (adquisición, consolidación y evocación) [428].

En líneas generales, los animales en CD, evaluados en SD-IA en su momento de menor actividad, evidenciaron un mejor desempeño en esta tarea con respecto a los animales en CI, entrenados durante la fase de mayor actividad. Como ya se mencionó para los animales de hábitos nocturnos, el día es un momento más temible, lo que puede dar lugar a un mayor estado de atención, entre otras diferencias, lo que pudo dar lugar a una mejora en el desempeño [321]. En las condiciones en que se llevaron a cabo los ensayos comportamentales, la privación de sueño, previa al entrenamiento en SD-IA, no tuvo incidencia deletérea sobre la consolidación de la memoria de esta tarea.

Evitación inhibitoria por pasaje de compartimiento en un paso (*step through*).

Efecto de la intensidad del estímulo sobre la memoria de la prueba de ST-IA.

ST-IA: Desempeño según intensidad de choque y género

Desde hace más de 40 años, se sabe que la retención de la evitación pasiva en la rata, depende de la intensidad de choque, la duración del choque y del intervalo de aprendizaje-test de retención [429]. Como ya hemos visto, según algunos autores, la reactividad al choque eléctrico está vinculada con el género [392; 393; 394; 395], con el peso corporal y con la edad [395]. Estas diferencias en la reactividad al choque, que se utiliza como estímulo aversivo en distintas tareas de aprendizaje, podría llegar a afectar la retención de la memoria en la respuesta de evitación pasiva.

Ha sido reportado que cuando se realizó el test de retención 1 min después del entrenamiento en ST-IA con choque de 0,5 mA, los machos y las hembras (de la misma edad) tuvieron latencias máximas. En cambio, cuando el test de retención se realizó a los 30 min o 180 min las hembras tuvieron latencias menores respecto a los machos [303]. Varios trabajos reportaron que las ratas hembra evidenciaron un desempeño en evitación pasiva más pobre, cuando la retención no se midía inmediatamente luego del entrenamiento. [392; 430; 431; 432]. Y este dimorfismo pareció independiente de factores como el peso corporal, edad, y de la reactividad al choque eléctrico dependiente de la edad/ peso corporal [395].

En la tarea de ST-IA el entrenamiento de los machos con intensidad de choque de 0,4; 0,5, 0,6 o 0,75 mA dio lugar a la formación de un a LTM (fig 3.11 A). Hubo coherencia entre la intensidad del estímulo durante el entrenamiento en ST-IA y el incremento en las medianas de las latencias de permanencia en el compartimiento iluminado de los animales con manipulación sistemática (coeficiente de correlación de Spearman = 1). Luego, en base a esos resultados se entrenaron hembras con 0,4 o 0,5 mA. Las hembras también evidenciaron formación de una LTM para las dos intensidades de choque con las que fueron entrenadas (fig 3.11 B).

Los valores de las medianas de las latencias del test para las hembras, fueron más altos que aquellos obtenidos para los machos, pero cuando se aplicó la comparación de las diferencias de latencias (test-entrenamiento) para igual intensidad de choque no se encontraron diferencias significativas entre los grupos.

Es decir que el entrenamiento con choque de 0,4 mA dio lugar a la formación de un a LTM equivalente tanto en ratas macho como en ratas hembra. Por lo tanto el umbral de intensidad de choque para evidenciar aprendizaje en esta tarea se encuentra por debajo de los 0,4 mA, siendo menor que el umbral evidenciado para la SD-IA (de 0,4 mA para las hembras y de 0,5 mA para los machos). En el gráfico de *scatter* correspondiente al desempeño en ST-IA (fig. 3.11 A y B) se puede observar que algunos animales (machos y hembras) que expresaron valores de latencias máximos de 120 segundos durante el test cuando fueron entrenados con intensidad de choque mayor o igual a 0,5 mA. En la SD-IA esto ocurre a partir de los 0,6 mA (fig 3.1 y 3.2). Es decir que

se requieren intensidades de choque menores en ST-IA para evidenciar un perfil de aprendizaje similar al que se obtiene en SD-IA.

Se comparó el desempeño de ratones macho cuando se los entrenaba en una versión estándar de la SD-IA respecto de una versión “contextual” modificada en la que el ratón quedaba retenido en la plataforma durante el entrenamiento debido a la presencia de una puerta transparente. Esto le permitía al animal observar el contexto durante el tiempo en que se encontraba retenido. Las latencias obtenidas durante el test de SD-IA fueron significativamente más bajas para los ratones entrenados en la versión estándar, que aquellas obtenidas para los ratones entrenados en la versión del SD-IA contextual. Esto indicó que una exposición más prolongada al contexto mejoró el desempeño de memoria, es decir que en la versión contextual habrían formado un condicionamiento más fuerte al contexto [433].

El aprendizaje contextual requiere de la integración de muchos aspectos de diferentes modalidades en una única representación configuracional del contexto, que depende del procesamiento en el hipocampo. Fanselow [364] demostró que se requiere de tiempo para formar una representación coherente del contexto. En ambas versiones de la tarea de SD-IA, el tiempo que se pasa en el contexto resultó suficiente para la formación de una respuesta condicionada. Sin embargo, la comparación de ambas versiones muestra que los animales entrenados en la versión contextual tienen mayores latencias de test respecto de animales entrenados en la versión estándar.

Algo similar fue reportado por Frankland y col. [434] que demostraron que el tiempo que se pasa en el contexto influye el condicionamiento contextual; y que hay una mejor evocación de la memoria cuando el animal pasa más tiempo expuesto al contexto durante la adquisición. Estos resultados apoyan la idea de que al pasar más tiempo en el contexto se puede clasificar mayor cantidad de estímulos del ambiente y codificar una mejor representación del contexto [364].

Ennaceur y col. [435] demostraron que la exposición de ratas y otros modelos animales a ambientes abiertos produce ansiedad inducida por el miedo, mientras que la exposición a lugares cerrados produce un comportamiento de evitación inducido por el miedo [435].

Si se considera que la plataforma de SD-IA se asemeja a un espacio abierto, los animales que son expuestos a la plataforma podrían estar desarrollando mayores niveles de ansiedad. En cambio, la caja en donde se entrenan a los animales en la ST-IA se asemeja a un ambiente cerrado, entonces los animales podrían estar desarrollando un comportamiento de evitación, de acuerdo con lo observado por Ennaceur [436].

Efecto de la manipulación de los animales sobre el desempeño en la prueba de ST-IA.

Tanto los machos como las hembras entrenados con una intensidad de choque de 0,5 mA alcanzaron el criterio de aprendizaje, ya sea que hubieran recibido o no manipulación sistemática. Cuando se compararon las diferencias de latencias (test-entrenamiento) de machos y de hembras (ambos sin manipulación), no fueron estadísticamente distintas. No se encontraron diferencias

significativas entre las diferencias de los grupos de machos con manipulación periódica contra aquellos sin manipulación periódica (fig 3.12 C). En cambio, se encontraron diferencias significativas en la comparación de las diferencias de los grupos de hembras con y sin manipulación previa cuando fueron entrenadas con 0,5 mA (fig 3.12 A y B). En este caso los animales que recibieron manipulación periódica desde el destete mostraron un mejor desempeño en esta tarea.

La manipulación sistemática desde el destete mejoró el desempeño en ST-IA de ratas hembra entrenadas con choque de 0,5 mA. Siguiendo la misma línea de razonamiento que para SD-IA, 0,5 mA constituiría un estímulo supraumbral para esta tarea, ya que el umbral estaría cerca de los 0,3 mA (especialmente en las hembras que son un poco más pequeñas que los machos de igual camada); es posible entonces, que este constituya un estímulo relevante comportamentalmente; y de modo similar a lo que ocurrió en SD-IA con estímulo supraumbral, la manipulación sistemática previa facilite la memoria de la ST-IA.

Efecto de dos sesiones de campo abierto sobre el desempeño en ST-IA en animales entrenados con choque suave (0,5 mA).

En ratones no se observó efecto de interferencia sobre la STM de una tarea de ST-IA, cuando se realizaron dos sesiones de campo abierto (de 5 y 3 minutos cada una), inmediatamente antes o bien inmediatamente después del entrenamiento en ST-IA (con choque de 0,7 mA). En cambio, se observó una interferencia recíproca de la tarea de reconocimiento de localización de objetos sobre la expresión de la STM, cuando se realizó inmediatamente después del entrenamiento en ST-IA [437]. Es decir que durante la consolidación, especialmente la temprana, cuando la memoria sería labil o muy susceptible de ser “borrada o alterada”, se evidenció interferencia. En el mismo trabajo, dos sesiones de campo abierto realizadas inmediatamente antes del entrenamiento en ST-IA, no tuvieron efecto significativo, aunque pareció haber una tendencia a mejorar el desempeño durante el test, relizado a los 30 min del entrenamiento.

Nuestros resultados evidencian que las ratas expuestas previamente a las dos sesiones en el OF, así como aquellas que no lo fueron (No-OF), alcanzaron el criterio de aprendizaje de la tarea, expresando una LTM de la ST-IA (fig 3.13). A su vez, las diferencias de latencias (test-entrenamiento) de los grupos que fueron expuestos a 2 OF respecto de aquellos que no tuvieron esta exposición, tanto para el caso de los machos como de las hembras, no fueron estadísticamente diferentes, tanto para el caso de los machos como de las hembras. Es decir que la exposición a dos sesiones en el OF, previamente al entrenamiento con 0,5 mA en ST-IA, no produjo cambios significativos en la retención y formación de una LTM de esta tarea, en forma similar a lo evidenciado para la SD-IA (fig 3.6 y 3.7 A).

En síntesis, en ambas tareas de evitación las ratas evidenciaron mejor desempeño y una LTM más robusta cuanto más fuerte fue el estímulo. Machos y hembras entrenados con igual intensidad de

choque tuvieron un desempeño similar. La previa exposición al OF –con habituación- con intensidad de choque de 0,5 mA, no dio lugar a una modificación significativa en el desempeño en evitación.

Los diferentes resultados entre ambas tareas parecen indicar que los estímulos, aún de igual intensidad, podrían tener un valor comportamental diferente en cada tarea. Así como el umbral para el aprendizaje es aparentemente menor en ST que en SD, también es menor el estímulo que pone en evidencia una facilitación en ST por manipulación sistemática.

La manipulación sistemática tuvo un efecto facilitador sobre la memoria de SD-IA con entrenamiento fuerte (1 mA), y de ST-IA aún con entrenamiento moderado (0,5 mA).

Manipulación vs. OF

La simple manipulación por el experimentador produjo un aumento en los niveles de ACh del hipocampo de la rata, y disminuyó la actividad comportamental [15]. La manipulación por el experimentador, del mismo modo que la estimulación sensorial de las ratas (estimulación táctil, olfativa y de gravitación), el alerta o el estrés pueden excitar neuronas septohipocámpicas [213] y producir liberación de ACh [438; 439; 440; 441]. Sin embargo, este aumento de la liberación de ACh y la activación comportamental (aumento del número de elevaciones y mayor actividad locomotora) fueron significativamente más pronunciados cuando las ratas exploraron un campo abierto. Los autores interpretaron que la estimulación sensorial, el alerta y el estrés inducido por la manipulación del experimentador, no son suficientes para gatillar los mismos efectos producidos por la exploración de un campo abierto [15]. Nuestros resultados mostraron que, aunque en condiciones diferentes, tanto la manipulación sistemática como la exposición previa al campo abierto ejercieron una modulación positiva sobre el desempeño en la IA.

FARMACOLOGÍA DE LA MEMORIA

PARTE II

PARTICIPACION DE LA TRANSMISIÓN MUSCARÍNICA EN LA MEMORIA DE EVITACIÓN INHIBITORIA.

Efectos del antagonista muscarínico escopolamina.

Ha sido reportado que en el hipocampo de ratas macho aumenta la liberación de acetilcolina durante el desempeño en distintas tareas con componentes espaciales. Este aumento en la liberación de acetilcolina correlaciona positivamente con un mejor desempeño con la novedad, actividad exploratoria y la habituación (campo abierto,[15]), con una tarea que involucra memoria espacial (laberinto radial, [365]), o bien con fenómenos cognitivos y atencionales que subyacen a procesos de motivación (laberinto radial con recompensa [366]). Thiel y col (1998) han reportado en ratas Wistar macho que la exploración a un OF incrementa la liberación de acetilcolina en el hipocampo, no sólo cuando el OF le resulta novedoso, sino que también durante la habituación a este ambiente [15].

La SD-IA es un tipo de aprendizaje asociativo que se adquiere en una sola sesión de entrenamiento por medio de la activación de varias estructuras cerebrales tales como la amígdala, el hipocampo y distintas estructuras corticales; estas se activan en respuesta a diversos estímulos sensoriales, entre los que se encuentran percepciones visuales y espaciales, dolor y miedo [23; 29]. El aprendizaje o adquisición de la evitación inhibitoria depende de la activación del sistema colinérgico. La administración de antagonistas muscarínicos antes o después del entrenamiento en evitación inhibitoria, causó un deterioro en el desempeño en esta tarea en ratas [2; 16; 368], mientras que la administración de agonistas dió lugar a un mejor desempeño en la evitación inhibitoria, evaluada por la expresión de la LTM en ratas [16; 369] y en ratones [199].

La exploración y la habituación a un campo abierto están íntimamente relacionadas con el hipocampo y su aferencia colinérgica [16]. Estas tareas involucran varios procesos de comportamiento: respuesta a la novedad incluyendo alerta, emoción y factores relacionados con el estrés, pero también procesos cognitivos, porque la disminución de la respuesta comportamental por la familiarización con un ambiente, requiere de aprendizaje, consolidación, reconocimiento y evocación [442; 443]. Lesiones del hipocampo o bloqueo de la aferencia colinérgica –por ej., de los receptores muscarínicos- afectan dramáticamente el comportamiento exploratorio y la habituación [23; 367; 444]. También la liberación de ACh en hipocampo y corteza influye sobre la atención, el aprendizaje y la memoria de diversas tareas y se considera crítica para la plasticidad sináptica (LTP) en el hipocampo [192; 207].

Como ya hemos visto en capítulos anteriores, la exposición a dos sesiones en un campo abierto antes de un entrenamiento fuerte en SD-IA, ejerció un efecto facilitador significativo en la memoria de largo plazo, como se evidenció durante la evocación 24 horas más tarde. Sin embargo, ese

efecto no se manifestó con un entrenamiento suave, al menos en las ratas criadas en ciclo luz/oscuridad invertido (CI), aunque sí pudo observarse en las ratas criadas en CD (ver capítulo III, sección 3, página 92) (ver Cap. VI, discusión *naïve*, pag 193).

En la primera serie de experimentos farmacológicos nuestro objetivo general fue profundizar en la evaluación del efecto de la transmisión colinérgica muscarínica sobre la memoria de la evitación inhibitoria. Para comprender mejor la naturaleza de la amnesia causada por bloqueo de los receptores muscarínicos e intentar arrojar luz sobre la participación del sistema colinérgico en esta tarea, particularmente en la interacción con la exposición previa al OF, comenzamos tratando a las ratas con escopolamina intraperitoneal luego de exposición al OF y antes del entrenamiento suave en SD-IA.

Cabe aclarar aquí que los ensayos se realizaron con machos o hembras, por separado, para su comparación. Cuando no encontramos diferencias significativas entre ambos sexos en el desempeño en SD-IA y en el OF, utilizamos solamente machos o hembras según se especifica. Los animales pertenecían casi siempre a las mismas camadas, por lo que utilizamos siempre primero los machos, ya que eran más grandes. Pero aún una o dos semanas después, cuando se entrenaban las hembras, estas seguían siendo algo más pequeñas que los machos (peso corporal de machos $289,14 \pm 7,51$ gr; hembras: $265,08 \pm 9,03$ gr). Ya había sido reportado que el peso promedio de las ratas Wistar hembra adultas, de 6 meses de edad, es aproximadamente un 40% menor que el de los machos de la misma edad [445; 446].

Efecto del campo abierto sobre la consolidación de la memoria de SD-IA.

Efecto sobre la amnesia por escopolamina administrada pre-entrenamiento via i.p.

Recordemos que las ratas hembra inyectadas i.p. con vehículo antes del entrenamiento en SD-IA, con y sin exposición previa al campo abierto, se comportaron de manera similar en el test, expresando una LTM equivalente. Es relevante tener en cuenta que en la segunda sesión de OF se observó disminución significativa del número de elevaciones sobre los miembros posteriores (tabla 4.1), lo que denota habituación por reconocimiento de la arena. En otras palabras, los animales reconocieron el OF donde habían sido colocados el día anterior, formaron una memoria de larga duración del OF y también de la SD-IA. El grupo inyectado con escopolamina i.p. antes del entrenamiento, que no fue expuesto al OF, fue amnésico para la SD-IA, no evidenciando LTM, mientras que el grupo inyectado con escopolamina, de ratas que sí fueran expuestas antes a una o dos sesiones en el OF, evidenciaron la formación de LTM. (fig 4.1).

Se ha reportado que la administración sistémica de escopolamina tuvo diversos efectos. Escopolamina tuvo efecto ansiogénico que se evidenció en el comportamiento de ratas en la caja “blanca y negra” [447; 448], además de afectar negativamente la discriminación de estímulos [449; 450], la atención [451; 452] y de modificar el comportamiento locomotor, ya sea por aumento o disminución en la actividad, o por no presentar cambio. Este efecto pareciera depender de diversos factores experimentales (como la cepa, tarea, tipo de refuerzo, dosis de la droga, etc). Se ha

reportado en ratas Wistar un aumento de la actividad locomotora con 1 mg/kg IP de escopolamina, y una disminución de esta actividad con 2 mg/kg [453]. Sin embargo, en el campo abierto, la administración 3 mg/kg de escopolamina i.p., incrementó la actividad locomotora de ratas Wistar [454]. En particular, en un ambiente familiar, escopolamina aumentó la actividad general de las hembras, mientras que la de los machos no se modificó. En cambio, en un ambiente novedoso, disminuyó la actividad general de los machos, mientras que la de las hembras no se vio afectada [447]. Los posibles efectos sobre la actividad locomotora deben ser considerados al momento de evaluar el efecto de la escopolamina sobre fenómenos cognitivos, en particular en aquellas pruebas en las que la actividad locomotora está muy emparentada con la variable dependiente principal [455]. Pero en nuestros ensayos claramente hubo un control interno del efecto de la droga, ya que tanto las ratas con previa exposición al OF como las sin exposición, recibieron igual dosis del antagonista, por la misma vía. A su vez, durante el entrenamiento, los grupos inyectados con solución salina y los inyectados con escopolamina tuvieron un comportamiento similar, ya que las medianas de latencias de esta sesión no fueron estadísticamente diferentes. La dosis utilizada fue la mínima dosis reportada como amnésica en la literatura y comprobada como amnésica en SD-IA con entrenamiento débil en el mismo laboratorio, ya que dosis mayores podrían comprometer la actividad locomotora [374; 375; 455].

En síntesis, tanto los animales del grupo control, como los animales del grupo tratado con escopolamina, que fueron expuestos previamente, a una o dos veces al campo abierto, aprendieron la tarea y formaron LTM, mientras que los inyectados con la misma dosis de escopolamina, que no pasaron por el campo abierto, sufrieron amnesia. Podemos concluir que la previa exposición con habituación al campo abierto, previno o impidió que se manifestara la amnesia instigada por escopolamina (fig 4.1).

Entonces nuestros resultados corroboran el efecto amnésico aparente de la escopolamina cuando es administrada i.p. antes de entrenamiento suave en la tarea de SD-IA. Y demuestran que dicha amnesia pudo revertirse cuando los animales fueron expuestos previamente al campo abierto, ya que mostraron una LTM robusta a las 24 h del entrenamiento.

Hemos observado que cuando se entrena a las ratas con intensidades de choque más elevadas (0,75 mA), y se las ha expuesto previamente a dos sesiones de OF, el nivel de retención evidenciado por los animales es muy elevado, cercano al tope utilizado para SD-IA. En estas condiciones la inyección intrahipocampo de escopolamina o de MK-801 (en dosis que deterioran el aprendizaje con un entrenamiento suave) no tuvo un efecto observable sobre el desempeño en esta tarea. El entrenamiento con choque fuerte y la exposición al OF, protegerían del efecto amnésico de ambas drogas. También se ha reportado en ratas un fenómeno similar cuando se inyecta cicloheximida 30 min antes o inmediatamente después del entrenamiento en ST-IA: se observa un efecto protector de la amnesia instigada por cicloheximida, cuando se entrena con intensidades de choque muy elevadas (consideradas sobre-refuerzo) [456].

En este caso, la escopolamina pudo haber afectado la adquisición y/o la consolidación ya que fue administrada antes del entrenamiento en SD-IA, por lo que la exposición al OF que permitió superar la amnesia, podría haber ejercido su efecto desde antes y/o durante la adquisición y/o durante la consolidación de la memoria de la SD-IA. En roedores, se ha reportado que se requieren bajas dosis de escopolamina intraperitoneal para deteriorar la retención evaluada a las 24 h de la tarea de evitación inhibitoria (ST-IA) cuando se la administra antes de la sesión de aprendizaje [219; 384]. Se reportó que el entrenamiento en ST-IA con choque de intensidad muy elevada (considerado un sobre-refuerzo) protegió del efecto de la amnesia instigada por la inyección sistémica de escopolamina 5 min antes [377; 387] o 5 min después [376; 388; 389] del entrenamiento con intensidades de choque más moderadas.

También se ha reportado que se necesitan mayores dosis para lograr un deterioro cuando se la administra después del entrenamiento [379]; sugiriendo un mayor efecto de esta droga sobre la adquisición y una menor influencia sobre la consolidación [380]. Sin embargo, queremos señalar al respecto que la amnesia causada por escopolamina i.p. antes del entrenamiento en SD-IA, también fue revertida por administración de AJ23 (antagonista de receptores de adenosina A1) durante la consolidación, lo que sugiere fuertemente que el efecto del antagonista muscarínico se habría ejercido y contrarrestado durante la consolidación [457].

Teniendo en cuenta que la escopolamina fue administrada i.p., es difícil saber qué estructuras podrían estar involucradas, especialmente en la superación del efecto amnésico; ya que bien podrían intervenir distintas estructuras reclutadas por el OF, contribuyendo luego a superar la amnesia en SD-IA.

Efecto del campo abierto sobre la amnesia producida por escopolamina intrahipocampo durante la consolidación de la memoria de la SD-IA.

El tratamiento post-entrenamiento provee un método de diferenciación en cuanto al efecto de la droga sobre los factores mnésicos que pudieran tener influencia en la memoria de la tarea. Varias drogas y hormonas afectan la memoria en forma tiempo-dependiente, perdiendo efectividad a medida que el intervalo entre el entrenamiento y la administración de las mismas aumenta. Esta dependencia de tiempo sugirió que los efectos producidos en la retención inmediatamente después del entrenamiento, no se deben a efectos de la droga sobre la motivación, la atención, o sobre procesos motores o sensoriales que podrían alterar el propio entrenamiento y la adquisición en sí (ver [65; 66; 67]). Con esta estrategia, los efectos serían directamente atribuibles a modificaciones en los mecanismos que llevan a la consolidación de las diferentes memorias, ya que la administración post-entrenamiento no afecta la adquisición.

La ACh liberada en los terminales septo-hipocámpicos juega un importante rol sobre los procesos cognitivos a nivel hipocámpal. El principal efecto de la transmisión colinérgica mediada por receptores muscarínicos sobre la formación de una memoria pareciera ser de carácter modulador

[458]. Dado que la ACh contribuye a la generación del ritmo *theta* en el hipocampo, ha sido propuesto que aquellas alteraciones del aprendizaje causadas por antagonismo a nivel de receptores colinérgicos muscarínicos, podrían involucrar disrupciones en dicho ritmo.

Los efectos del bloqueo de los receptores muscarínicos con escopolamina (2µg) [16] y de los receptores NMDA con AP5 (5µg) en el hipocampo sobre la consolidación de SD-IA [16; 114; 459], así como sobre la habituación a un ambiente novedoso [16], han sido previamente estudiados en ratas Wistar. Tanto escopolamina como AP5 evidenciaron un efecto amnésico sobre el desempeño de ambas tareas. El efecto amnésico de AP5 también se evidenció cuando se lo inyectó en amígdala o en las cortezas entorrinal, parietal y cingulada [16; 114; 123]. Por otra parte, la inyección en el hipocampo inmediatamente luego del entrenamiento de los agonistas glutamato u oxotremorina dio lugar a una facilitación para ambas tareas [16; 114].

Por esos y otros numerosos y conspicuos antecedentes (ver [23]), es claro que la consolidación temprana de SD-IA requiere del normal funcionamiento del hipocampo, en particular de los receptores muscarínicos y glutamatérgicos, así como de otros neuroreceptores.

Entonces, para comenzar a dilucidar si la transmisión muscarínica en esta estructura está involucrada en el efecto de exposición al OF y si el mismo se ejercería sobre el proceso de adquisición o sobre la consolidación, se hicieron ensayos administrando escopolamina intrahipocampo durante la consolidación temprana de la memoria de SD-IA, en ratas previamente expuestas al campo abierto.

¿Qué ocurre cuando se afecta la consolidación?

Nuestros resultados corroboraron el ya reportado efecto de **amnesia retrograda** provocado por la escopolamina cuando es administrada intrahipocampo inmediatamente luego de entrenamiento suave en la tarea de SD-IA, es decir durante la consolidación temprana. Pero notablemente demuestran que dicho efecto amnésico fue superado por exposición previa a dos sesiones en el OF, de 3 minutos cada una (fig. 4.2; 4.3 y 4.6)

Es suficiente una exposición breve al OF?

Cuando se expusieron las ratas a una única sesión de OF, antes de entrenamiento en SD-IA y luego se inyectaron con escopolamina intrahipocampo, las latencias del test fueron significativamente mayores que las del entrenamiento, mostrando que esos animales fueron capaces de formar una **LTM** de la tarea. Además, la comparación entre el grupo de animales tratados con escopolamina expuestos a 1 OF y los no expuestos, mostró que las diferencias de latencias de ambos fueron estadísticamente distintas, lo que indica que la exposición a una única sesión de OF realizada una hora y media antes del entrenamiento en SD-IA, estaría contribuyendo a superar la amnesia instigada por la escopolamina (fig 4.3). Estos resultados muestran que la amnesia retrógrada por escopolamina inyectada intrahipocampo luego del entrenamiento en SD-IA –durante la consolidación-, pudo prevenirse o superarse por la exposición a una o dos sesiones en el OF de 3 minutos cada una, 24 h y 1 h 30 min antes del entrenamiento en SD-IA, promoviendo la formación de una traza que, de otro modo, se podría suponer que hubiera estado ausente.

Teniendo en cuenta que tanto la amnesia por administración de escopolamina i.p. antes del entrenamiento en SD-IA, como por su infusión intrahipocampo después del entrenamiento, fue superada por la previa experiencia de exploración de un campo abierto, es probable que el efecto del OF se haya producido facilitando procesos de consolidación de la memoria en, o partir del hipocampo; aunque también puede interpretarse que los cambios producidos por el OF en el hipocampo y estructuras directamente relacionadas, podrían promover la formación de una traza más robusta desde el propio proceso de adquisición, «disminuyendo el umbral» para la inducción de la plasticidad necesaria. Por otra parte, el hecho de que las ratas mostraran habituación al OF en la segunda exploración, nos permite sugerir que el aspecto relevante que pudo haber influido sobre la memoria de SD-IA, en este caso no tuvo que ver, al menos exclusivamente, con lo novedoso de la experiencia. Podría, en cambio, tener relación con otros aspectos y funciones, como por ejemplo, el establecimiento de otra LTM en la misma estructura o con el hecho de haberse modificado el estado de atención? Pero también podría haber sido diferente el estado de atención durante la adquisición?

La exploración de un campo abierto y la habituación dependen del hipocampo y de su aferencia colinérgica [16] desde el *septum* medial. Como ya se mencionó, se sabe que dicho comportamiento exploratorio está asociado a la actividad *theta* del hipocampo que depende de la aferencia colinérgica [17]. Thiel y colaboradores (1998) han reportado que la exposición de ratas a un nuevo ambiente da lugar a un muy notable aumento (>250 %) de los niveles extracelulares de ACh del hipocampo, que correlacionan positivamente con el comportamiento exploratorio en la primera exposición. Esta activación colinérgica fue mucho mayor que en los controles, que habían sido manipulados de la misma manera pero no expuestos al OF. Además, observaron que los niveles de ACh de los controles no correlacionaron con el comportamiento exploratorio en el OF. Cuando los animales fueron re-expuestos, el comportamiento exploratorio y la actividad locomotora disminuyó indicando habituación, pero no disminuyó la activación colinérgica que se elevó aún más (> 280 %). Luego de 10 minutos, la activación colinérgica continuaba aumentada. La magnitud del aumento fue significativamente mayor durante y luego de la re-exposición, persistiendo por más tiempo (40 min después). Por lo tanto, los niveles extracelulares de ACh se elevan en el hipocampo no solamente en respuesta a la novedad, sino también durante la segunda exposición al mismo ambiente, cuando se evidencia habituación comportamental [15] o durante “la evocación de una experiencia?”. Nuestros resultados indican que el efecto de la superación o prevención de la amnesia por escopolamina, así como el efecto facilitatorio sobre el desempeño en SD-IA cuando se entrena con choque fuerte, resultan significativos luego de dos exposiciones en el OF. El efecto de la superación o prevención de la amnesia por escopolamina, podría deberse, al menos en parte, al aumento de la liberación de ACh mencionado previamente [15].

Efecto de la exposición al campo abierto antes del entrenamiento en SD-IA, sobre la amnesia instigada por escopolamina intrahipocampo: evaluación de STM y LTM

El hipocampo y las cortezas parietal y entorrinal son cruciales para la STM y la LTM. William James en 1890 y Jim McGaugh en 1966, expresaron: “*if an experiment shows suppression of STM (or WM) but did not affect LTM, both should be viewed as independent processes.*” [65; 460]. En 1993 Emptage y Carew encontraron que el bloqueo farmacológico de receptores 5HT impedía la facilitación a corto plazo (2/6 min) pero no la facilitación de larga duración (24 h) de la respuesta monosináptica inducida por 5HT en *Aplysia* [461]. Esta constituyó la primera demostración de una separación mecánica entre formas de plasticidad de corta y de larga duración. Pero la facilitación de una respuesta mono sináptica *per se* no es un buen ejemplo de memoria. Entonces, Izquierdo y col. (1999) extendieron esto a las memorias de corta (STM) y de larga duración (LTM) de SD-IA en ratas [2]. Existirían dos diferencias principales comportamentales entre STM y LTM: una es la falta de extinción de STM [65; 371; 460; 462; 463]; lo que significa que las latencias de test no cambian en sesiones de test repetidas en el mismo animal hasta 6 h luego del entrenamiento, es decir, por el tiempo de duración de la STM. En cambio, si los animales se testean después, por ejemplo a las 9, 24, o 96 horas, si hay extinción, cuando ya se trata de una traza de larga duración [2]. El otro efecto comportamental diferencial que reportaron es que la STM no fue susceptible a la interferencia debida a la exposición a un ambiente novedoso 1 h luego del entrenamiento, como si lo fue la LTM [2].

Entonces, la exposición a un nuevo ambiente 1 o 2 h pero no 6 h postentrenamiento o 5 min antes, dificultó/deterioró la expresión de LTM [21; 29; 169; 464; 465]. Y también inhibió la expresión de LTP en CA1 [166; 466]. Esto fue atribuido al reajuste de mecanismos dependientes de receptores NMDA y de CaMKII en CA1, en las fases tempranas de la consolidación de SD-IA [171]. Entonces, aun cuando el retest de los animales podría alterar la LTM por extinción [465] o por efecto recordatorio (*reminder*) [467; 468], los autores descartaron que ello ocurriera dentro de las primeras horas al menos por tres razones: 1) no hubo diferencias significativas en el desempeño de STM y LTM ; 2) todos los tratamientos ensayados afectaron la retención de LTM del modo esperable, hubiera habido o no test previo para STM; y 3) el testeado repetido durante las primeras 6 h luego del entrenamiento no dio lugar a extinción, mientras que con test repetidos entre las 9 y 96 h hubo extinción.

En síntesis, la medición de la memoria de trabajo (WM) y/o de la STM no afectó la LTM, ni modificó la acción de gran número de tratamientos postentrenamiento sobre la LTM [171; 469]. (Se considera que la WM para la SD-IA ya fue superada luego de 4 minutos [5; 470]).

En CA1 y corteza entorrinal, antagonistas como AP5, CNQX, MCPG, escopolamina, muscimol y el inhibidor de la protein quinasa A (PKA), KT5720, administrados luego del entrenamiento en SD-IA, bloquearon tanto STM como LTM [2]. Por lo que se concluyó que tanto STM como LTM son dependientes de la integridad de receptores de glutamato AMPA, NMDA y metabotrópicos, y

también de receptores muscarínicos, así como de la modulación por receptores β -adrenérgicos adrenérgicos y GABAA en el hipocampo, inmediatamente luego del entrenamiento. Entonces ello sugirió una importante relación entre ambas formas de memoria a nivel de dichos receptores y de la PKA en CA1, inmediatamente luego de entrenamiento. Sin embargo, como ya se mencionó más arriba, varios experimentos han demostrado que hay tratamientos que afectan STP o STM sin alterar LTP o LTM [2; 171; 371; 461] y, por lo tanto, STM y LTM, como así también WM [5], deben ser consideradas como sistemas de memoria separados, aunque ligados (ver [370]). STM y LTM pertenecen a y son reguladas por subsistemas separados en el cerebro, a veces de la misma y otras veces de diferentes estructuras.

Se ha reportado que la administración periférica de escopolamina en ratas interfirió sobre la STM de la tareas de reconocimiento de objetos y en la de alternancia espacial [471; 472; 473]. Por otra parte, la inyección de ratas a nivel sistémico de escopolamina afectó la memoria de trabajo espacial en un laberinto radial [451; 474]. Barros y col. (2002), inyectando escopolamina en amígdala comprobaron que la STM estaba preservada aún cuando la LTM dejara de expresarse, sugiriendo fuertemente que el procesamiento en el hipocampo es diferente [369]. Por otra parte, Botton y col. (2010) inyectando ratones con escopolamina i.p. antes o después del entrenamiento en SD-IA, comprobaron que se afectaban tanto la STM como la LTM. Pero cuando se inyectó antes del entrenamiento, el tratamiento previo con cafeína preservó la STM aunque no la LTM [373]. En cambio, la administración postentrenamiento de escopolamina permitió que el tratamiento previo con cafeína preservara ambas memorias, sugiriendo que la adquisición y la consolidación dependen de manera diferente de la transmisión muscarínica, y a la vez, corroborando diferencias en los mecanismos subyacentes entre STM y LTM. Es importante señalar que estos autores tampoco vieron afectada la motricidad de los ratones inyectados i.p. con 2mg/kg de escopolamina. Entonces la escopolamina inyectada en forma sistémica en ratones 15 min antes del entrenamiento [373] o bien en el hipocampo en ratas, inmediatamente luego del entrenamiento, afectó negativamente la memoria de corta duración de SD-IA [2].

La exposición al OF fue siempre previa al entrenamiento en SD-IA, es decir a la adquisición, por lo que no podemos saber si el efecto ocurre durante la misma o luego de la adquisición. Sin embargo, hay dos hechos que nos llevan a conjeturar que podría deberse, al menos en parte, a un efecto de “rescate” durante la consolidación temprana: 1) la amnesia por escopolamina i.p. administrada antes de la adquisición, pudo ser revertida por bloqueo de receptores A1 durante la consolidación, indicando que la traza efectivamente se formó, aun cuando los receptores muscarínicos se encontraban bloqueados durante la adquisición [457]; 2) la amnesia retrogróda por bloqueo de receptores muscarínicos del hipocampo durante la consolidación temprana, tanto sobre la STM como sobre la LTM, también fue prevenida o superada por el OF.

¿Qué ocurrió con la STM en nuestros ensayos?

Corroboramos que la escopolamina i.p. antes del entrenamiento en SD-IA, ejerció un efecto amnésico ya que no hubo evidencia de retención a los 40 minutos del entrenamiento y, a diferencia

de lo que ya habíamos comprobado que ocurría con la LTM (ver fig. 4.1), la amnesia de STM no fue superada o prevenida por la exposición previa a dos sesiones en el OF, incluso cuando se realizaron los tests en los mismos animales.

Cuando se restringió la inyección al hipocampo dorsal, corroboramos que la escopolamina inmediatamente después del entrenamiento, también ejerció un efecto amnésico, ya que no hubo evidencia de retención a los 40 minutos del entrenamiento, pero a diferencia de lo que ocurrió cuando inyectamos escopolamina i.p., la amnesia de STM fue superada por la exposición previa a las dos sesiones en el OF (fig 4.3 D).

Estos resultados corroboran que a ambos tipos de memoria subyacen algunos mecanismos comunes y otros diferentes: la transmisión muscarínica sería requerida posiblemente durante la adquisición y, con seguridad, durante la consolidación de la LTM de SD-IA, como así también para la STM. Pero la exploración y habituación a un ambiente diferente, previamente al bloqueo de la transmisión muscarínica (durante la adquisición y la consolidación de SD-IA), posibilita la “superación de dicho requerimiento” para la formación de una LTM. En cambio, para el caso de la STM, la previa exploración y habituación a un ambiente diferente, condujo a la superación del efecto del bloqueo muscarínico solamente cuando este se restringió al hipocampo dorsal durante la consolidación, pero no cuando el bloqueo fue más generalizado y desde antes del entrenamiento. El aumento en la liberación de ACh en el hipocampo, promovida por la previa exploración al campo abierto [15], podría estar interfiriendo sobre el efecto del posterior bloqueo de los receptores muscarínicos durante la consolidación de la memoria de evitación inhibitoria. En cambio, cuando los receptores muscarínicos estuvieron bloqueados de manera generalizada durante la adquisición de SD-IA, el aumento de ACh en hipocampo [15] y corteza [475], asociado a la exploración previa del campo abierto, no habría sido suficiente para superar el efecto de este bloqueo y permitir la expresión de una STM. Pero por otra parte, el OF si fue suficiente para prevenir o revertir la amnesia de una traza de larga duración (LTM) en los mismos animales.

Como ya se mencionó, ha sido reportado que la dosis de escopolamina utilizada (1 mg/kg) podría afectar la actividad locomotora de la rata [374; 375]. Por este motivo se realizó un ensayo en el que se evaluó la actividad locomotora y exploratoria en un OF, 60 min después de la inyección de 1 mg/kg de escopolamina i.p. No hubo diferencias significativas en la actividad locomotora ni exploratoria, evaluadas por el número de cruces y de elevaciones sobre los miembros posteriores en el OF, así como (número y tiempo) de acicalamientos, entre los animales tratados con escopolamina y los respectivos controles inyectados con salina. De esta manera se descartó la posibilidad de que las diferencias encontradas en el desempeño, en el test realizado 40 min después del entrenamiento en SD-IA (60 min después de la inyección de escopolamina i. p.), hayan estado influenciadas por alteraciones en la actividad locomotora.

Efecto de escopolamina intrahipocampo sobre la consolidación de memoria de ST-IA.

Habiendo observado que en la versión ST-IA se obtuvo un mejor desempeño comparado al obtenido en SD-IA para igual intensidad de choque. Se estudió el efecto de la administración de escopolamina en el hipocampo dorsal inmediatamente luego del entrenamiento con choque de 0,5 mA en ST-IA.

Recordemos que el grupo control alcanzó el criterio de aprendizaje de la ST-IA con un estímulo de 0.5 mA, mientras que en el grupo tratado con escopolamina (8 µg/µl), se expresó una memoria “débil” (Fig. 4.6), lo que podría interpretarse como una amnesia parcial.

Efecto del campo abierto sobre la consolidación de la memoria de ST-IA.

Efecto sobre la amnesia por escopolamina administrada intrahipocampo luego del entrenamiento

También se evaluó si la previa exposición al OF tenía algún efecto visible sobre el desempeño de animales entrenados con 0,5 mA en ST-IA, cuando estos recibieron escopolamina intrahipocampo. El grupo de animales control previamente expuestos a dos sesiones en el OF, tuvo una mediana de latencias del test similar a la del grupo de animales control, que no fue expuesto al OF. En el caso de las ratas inyectadas con escopolamina, si bien la exposición a 2 OF dio lugar a la formación de una muy robusta LTM de la ST-IA, no fue significativamente distinta a la LTM del grupo inyectado con escopolamina que no fue expuesto previamente al OF (No hubo diferencias significativas, tal vez debido a la considerable dispersión de los datos; Fig. 4.6, Tabla 4.6). Recordemos que un entrenamiento más fuerte en SD-IA no permitió evidenciar un efecto amnésico claro con escopolamina; el entrenamiento con choque de 0,5 mA en ST-IA no puede considerarse umbral ni “débil”, ya que en esas condiciones, se formó una LTM robusta y además, los animales aprendieron la tarea con estímulos menores, como 0,4 mA (ver Capítulo III, fig 3.11; pag 104 Cap. IV, fig 4.6, pag 148). Sin embargo, el OF no tuvo un efecto facilitatorio en los controles, como ocurrió en SD-IA con entrenamiento fuerte o aún con entrenamiento débil en animales criados en CD. Esos resultados muestran que, aunque similares, estas tareas son diferentes en varios aspectos, posiblemente a nivel de: la relevancia comportamental del estímulo aversivo en diferentes situaciones, del espacio para la evitación (estrecha plataforma elevada vs. espacio iluminado a nivel) y de la posibilidad de asociación con ventanas temporales distintas. Y, en consecuencia, la “fuerza” de la traza, de las modificaciones plásticas subyacentes y su dependencia de los sistemas de neurotransmisión en juego, pueden ser muy diferentes [433; 436].

Neuronas colinérgicas que inervan hipocampo y corteza detectan estímulos comportamentales relevantes

La inervación colinérgica de la corteza cerebral y del hipocampo se originan en gran parte, de un grupo de neuronas magnocelulares en la base del cerebro anterior, delimitadas anteriormente por el núcleo septal medial y, caudalmente, por el núcleo basalis [476; 477];

Lesiones que afectan estas neuronas causan deterioros en la memoria de la rata [178; 478] y en la atención en distintos modelos animales como la rata y el mono [479; 480; 481].

La neurotransmisión colinérgica juega un rol crítico en los procesos que subyacen a la atención, alerta, aprendizaje y memoria [438; 439; 440]. Como ya hemos mencionado, Thiel y colaboradores (1998) han reportado, en ratas Wistar, que la exploración a un OF incrementa la liberación de acetilcolina en el hipocampo, y que este incremento de ACh fue más pronunciado cuando el animal fue re-expuesto al OF [15].

Desde la década del 70, varios estudios han sugerido una relación estrecha entre mediciones de alerta en la corteza e hipocampo, y la actividad de las neuronas del núcleo basal magnocelular y del núcleo septal medial [482; 483; 484; 485], así como una relación directa con incrementos en la liberación de ACh en la corteza y en el hipocampo [486; 487]. Hace más de 30 años se reportó que incrementos en la liberación de ACh en la corteza y el hipocampo están asociados con alerta comportamental [375; 438; 488] (y con la presentación del estímulo sensorial [438; 439]). En base a esos y otros estudios, se ha sugerido que los aumentos en la liberación de ACh en el hipocampo y la corteza juegan un rol en el estado de alerta y/o de atención. Inglis y Fibiger (1995) mostraron que un estímulo sensorial incondicionado incrementó la liberación de acetilcolina de la corteza frontal (estímulo táctil, auditivo y olfativo) y del hipocampo (estímulo táctil, visual, auditivo) de ratas [439]. Aquas y colaboradores (1996) reportaron que el estímulo condicionado -en un paradigma de condicionamiento del miedo en rata- fue capaz de incrementar la liberación de acetilcolina en la corteza frontal y el hipocampo. Comprobaron que dichas neuronas colinérgicas de la base del cerebro anterior, son activadas por aquellos estímulos condicionados e incondicionados que producen alerta comportamental en las ratas (por ej., novedad o miedo condicionado). Sus resultados son consistentes con un amplio cuerpo de evidencias que indican que la liberación de ACh en la corteza y en el hipocampo es efectivamente activada por estímulos comportamentales relevantes. También sustentan la hipótesis de que las neuronas colinérgicas de la base del cerebro anterior están involucradas en procesos de atención y/o alerta. Por otra parte, la liberación de ACh en el hipocampo y la corteza que observaron estaría positivamente relacionada con el estado de alerta comportamental, pero dissociada de la actividad locomotora. Por ejemplo, el 90 % de las ratas sometidas al paradigma de condicionamiento del miedo, que respondieron con un comportamiento de congelamiento (*freezing*) o inmovilidad de alerta, mostraron un aumento significativo en la liberación de ACh de la corteza y del hipocampo [375; 488]. Así mismo, se observó que la presentación de un estímulo novedoso también aumento la liberación de ACh en esas regiones [489]. De esta manera, pusieron en evidencia una clara disociación entre la actividad locomotora y el aumento de la actividad colinérgica en ambas regiones cerebrales [489]. Nuestros resultados con el antagonista colinérgico escopolamina también indican tal disociación.

A su vez, la activación del sistema de catecolaminas antes del test para evaluar LTM, fue capaz de revertir la amnesia provocada por inhibidores de la síntesis proteica (anisomicina y cicloheximida) o por el bloqueo muscarínico por escopolamina [490]. Se ha propuesto que las catecolaminas

modularían la consolidación de forma tal que facilitarían la expresión de una memoria modulando su “fuerza” [370]. Algunos de estos neurotransmisores también podrían estar involucrados en la superación de la amnesia por la exposición al OF.

Hipocampo de roedores, LTP y novedad

La actividad sincronizada de la red del hipocampo, juega un rol esencial en formación de memorias. Las oscilaciones gama (20-80 Hz), que constituyen parte de dicha actividad, pueden ser inducidas por el agonista colinérgico carbacol. Los receptores dopaminérgicos D1/D5 estarían involucrados en la modulación de la liberación de ACh en el hipocampo [491]. En registros de campo e intracelulares en la región CA3, en rebanadas de hipocampo de rata, la activación de receptores dopaminérgicos D1 desencadena una fuerte depresión de las oscilaciones gama colinérgicas. Este efecto pareciera estar mediado por un deterioro en la actividad de las interneuronas involucradas en generar y mantener el ritmo de estas oscilaciones de la red hipocámpal [492]. Se ha reportado que la activación de los receptores D1/D5 del hipocampo ejerce un efecto de modulación positiva sobre la consolidación tardía (3 a 6 h después de la adquisición) de la memoria de la evitación inhibitoria en ratas [493].

El hipocampo, además de tener un rol en la formación de memorias, también actúa como detector de novedad, posiblemente identificando la no coincidencia entre la información entrante y la información almacenada [161; 162; 494].

Li y col (2003) observaron que una exposición de 5 min a un ambiente novedoso, disminuía el umbral para la inducción de LTP. Este efecto facilitador se expresaba dentro de una ventana temporal breve, con un protocolo débil de condicionamiento aplicado 5 min después, (pero no 5 min antes) de la exposición a la novedad (durante 5 min), y no se evidenció en aquellos grupos de animales familiarizados con el ambiente. Esto sugiere que un ambiente novedoso desencadenaría un estado del hipocampo que favorece el almacenamiento de información nueva, facilitando la inducción de plasticidad sináptica (LTP). Además, esta facilitación fue dependiente de la activación de receptores dopaminérgicos D1/D5. A raíz de estos hallazgos, se le pudo atribuir un rol relevante a la plasticidad sináptica regulada por dopamina en CA1, en el almacenamiento de información novedosa [165]. Estos resultados muestran que una breve exposición a información nueva puede preparar (*priming*) a la región CA1 para desencadenar aumentos persistentes en la “fuerza sináptica” (un aumento en la probabilidad de disparo), cuando la novedad ya fue activamente explorada y reemplazada por información conocida. Los períodos de quiescencia que continúan a la exploración podrían generar condiciones favorables para la inducción fisiológica de dicho fortalecimiento sináptico en el hipocampo (por ej., LTP), necesario para la formación de una traza de memoria [495].

Los resultados de Li y colaboradores (2003) revelaron cómo la exposición a la novedad podría controlar el aprendizaje a través de la activación de neuronas dopaminérgicas mesolímbicas. Un cambio saliente en el entorno puede desencadenar un estado transitorio que dependería de

liberación de dopamina en el hipocampo, lo que favorecería el almacenamiento de memorias de eventos recientemente ocurridos. Li et al (2003) reportaron que la exposición a un ambiente novedoso dio lugar a una facilitación en la inducción de LTP; pero antes se había reportado que la exploración de novedad producía una reversión de la LTP previamente establecida (depotenciación) [166; 167; 330]. Estos dos fenómenos se complementarían entre sí, dependiendo de las condiciones experimentales, las que finalmente determinarán cuál de los dos efectos predominará. Entre los factores que controlan la dominancia, ya sea de la facilitación de la inducción de la LTP, o bien la reversión de la expresión de la LTP, se encuentran: la secuencia de exposición a la novedad/estímulo condicionado, la fuerza del estímulo de condicionamiento [166] y el tiempo de exposición a la novedad [165] (ver tabla 6.4). La facilitación de inducción de LTP requiere, según Li y col., que la exposición a la novedad sea breve (≤ 5 min) y sea realizada antes del estímulo condicionado subumbral (de alta frecuencia, débil). La reversión de la expresión de la LTP [166], requirió que una exposición prolongada a la novedad se realizara luego (1 h después) de un estímulo de condicionamiento máximo (de alta frecuencia, fuerte). Por otra parte, la inducción de LTP no se facilitó si la exposición a la novedad fue prolongada (25 min) o si se la presentó 5 minutos después del estímulo condicionado. La LTP no se revirtió si la novedad fue breve (≤ 10 min) o se presentó antes (5 min) de la estimulación de alta frecuencia fuerte [166].

Variable experimental		Efecto de la exposición a la novedad sobre la LTP	
		Inducción de la LTP	Expresión de la LTP
Secuencia novedad-estímulo condicionado	1° HFS	Sin efecto (5 min antes de la novedad)	Reversión (1 h antes de la novedad)
	1° Novedad	Facilitación (10 min antes del HFS)	Sin efecto (5 min antes de HFS)
Fuerza del estímulo condicionado	HFS débil (10 trenes de 10 pulsos de 100 Hz)	Facilitación	No se evaluó (no hay inducción de LTP por HFS débil sin novedad)
	HFS fuerte (10 trenes de 20 pulsos de 200 Hz)	Sin efecto (LTP máximo)	Reversión
Duración de la exposición a la novedad	Breve	Facilitación (5 min)	Sin efecto (10 min)
	Prolongada	Sin efecto (25 min)	Reversión (20 min)

Tabla 6.4: Resumen de las variables experimentales que determinan el efecto de la exposición a la novedad sobre la inducción de la LTP en la región CA1 del hipocampo de la rata (tomado de Li et al. 2002, basado en ese trabajo y en el trabajo de Xu et al. 1998).

HFS: del inglés “*High frequency conditioning stimulation*”, estimulación de alta frecuencia.

Por todo lo antedicho se puede afirmar que las limitaciones temporales de estos fenómenos de plasticidad sináptica, que podrían resultar complementarios, son distintas, sugiriendo la existencia de mecanismos diferentes. Esto resulta consistente con la idea de que, a pesar de que la adquisición de información novedosa podría llevar a un debilitamiento extendido persistente de contactos sinápticos recientemente fortalecidos, ello ocurriría en tándem con un fortalecimiento dependiente

de actividad, selectivo para algunas redes sinápticas [166]. Se propuso que esta interacción favorecería la actualización / selección permanente de información importante, para luego ser transferida a otras regiones cerebrales como la corteza, para su posterior “almacenamiento” de largo plazo. También se ha especulado con que la ventana temporal para el efecto facilitatorio de la novedad sobre la inducción de LTP podría cambiar rápidamente, en la medida en que la relevancia comportamental de aprender la nueva información fluctúe. Esto sugiere que la interacción entre la liberación de dopamina debida a la detección de novedad y la subsecuente promoción de la codificación de información debería ser crítica para el normal funcionamiento del hipocampo.

Entonces, en concordancia con los resultados e interpretaciones de los distintos autores de gran parte de los trabajos mencionados, y a partir de los resultados obtenidos en nuestros ensayos, podemos decir que la exposición al OF fue suficientemente breve (<5 min) y fue presentada al menos 50 min antes del entrenamiento en IA, cuando el animal asociaría el contexto (EC): plataforma y grilla, con el choque en las patas (EI), por lo que es dable esperar que no haya reversión de STP/LTP y STM ocurridas o ya establecidas. Por otra parte, aunque breve (3 o 5 min), una única exposición al OF de las ratas criadas en CI, no produjo efecto facilitatorio evidenciable *per se* cuando el entrenamiento fue débil en los animales criados en CI y entrenados durante su etapa de mayor actividad. Pero en cambio, permitió superar la amnesia por escopolamina, tanto cuando fue administrada i.p. después de la segunda exposición al OF y antes del entrenamiento suave en SD-IA, como cuando fue administrada en el hipocampo dorsal postentrenamiento suave. Por otro lado, las dos exposiciones al OF, en que se comprobó habituación al ambiente, y luego de las cuales tampoco se evidenció facilitación de la memoria de larga duración de la SD-IA con entrenamiento suave, también permitieron superar dicha amnesia por escopolamina, formándose una LTM más robusta que luego de una sola exposición al OF.

Estos resultados favorecen la interpretación de que tanto la experiencia novedosa de exploración de un campo abierto, como la repetición de esa experiencia que da lugar al reconocimiento de la arena, .posibilitan la formación de una LTM de la SD-IA, a pesar del bloqueo de los receptores muscarínicos de CA1 del hipocampo o de un bloqueo más generalizado por vía i.p.; lo que podría deberse, entre otras posibilidades, a un incremento mayor y sostenido de la liberación de ACh (ver [15]) en el hipocampo o en otras regiones relacionadas (por ej., corteza cerebral), reclutadas por el OF y/o a la disminución del umbral para la inducción de cambios plásticos subyacentes a la formación de la traza y su consolidación en una LTM (un aumento de la estimulación de RChM del hipocampo conduciría a una mayor excitabilidad de las membranas a nivel de las sinapsis involucradas (ver [207])

Como ya hemos mencionado (ver discusión, pag 188), Frey y Morris (1997 y 1998) han propuesto que la inducción de la LTP está asociada con la formación de una “etiqueta sináptica” en aquellas sinapsis que fueron activadas, y esta tendría el rol de secuestrar proteínas vinculadas con plasticidad sináptica, que servirían para estabilizar aquellos cambios sinápticos transitorios, de manera que esos cambios extenderían su persistencia. Como la LTP se postula como uno de los

mecanismos que subyace a los procesos de memoria y aprendizaje, esta posibilidad de modificar la persistencia de la LTP podría permitir extender la ventana temporal para pasar de tener una STM a formar una LTM [177]. En este caso, posiblemente estarían interviniendo proteínas directamente vinculadas con plasticidad sináptica que habrían sido “reclutadas” durante el OF previo.

Efecto de la inhibición de la síntesis proteica sobre el desempeño en SD-IA

Como ya se mencionó, la inducción de plasticidad sináptica duradera estaría asociada con la formación de una “etiqueta sináptica” en aquellas sinapsis que fueron activadas. Esa “etiqueta” tendría el rol de secuestrar proteínas vinculadas con plasticidad sináptica, que servirían para estabilizar aquellos cambios sinápticos transitorios y, de esa manera, dichos cambios extenderían su persistencia [177]. Moncada y Viola (2007) demostraron que un entrenamiento débil en SD-IA, que normalmente no generaría una memoria de largo plazo, posibilitó la expresión de una LTM cuando se lo realizó en un tiempo próximo a la exploración de un campo abierto. Los autores postularon que el efecto promotor del campo abierto sobre la evitación inhibitoria estaría relacionado con la síntesis de proteínas vinculadas con plasticidad sináptica [170].

Debemos recordar que en nuestros ensayos el choque fue umbral (y no subumbral) y que los animales fueron expuestos a una o a dos sesiones breves en el OF. Como se formó una LTM de SD-IA luego de una o de dos sesiones en el OF, a pesar del bloqueo de los receptores muscarínicos del hipocampo con escopolamina, y como dicha LTM fue más robusta luego de un segundo OF, especulamos que esta segunda exposición –y no la primera sesión- podía ser más relevante para el efecto observado. Por eso elegimos inyectar anisomicina inmediatamente antes o después de la segunda exposición al OF. Debe tenerse en cuenta que ha sido reportado que el preentrenamiento (con choque suave de 0,4 mA) en SD-IA, 24 h antes del entrenamiento, previno el efecto amnésico de la inyección de AP5 o de anisomicina en el hipocampo dorsal luego del entrenamiento [467; 496].

En nuestros ensayos, la anisomicina tuvo efecto amnésico sobre la SD-IA cuando fue infundida en hipocampo tanto 90 como 120 minutos antes del entrenamiento en SD-IA, es decir que pudo haber afectado la adquisición y/o la consolidación de esta tarea. En ese sentido, debemos tener presente que el inhibidor de la síntesis proteica anisomicina, deterioró la retención de SD-IA en distintos modelos animales [496; 497; 498]; y ha sido propuesto que dicho deterioro se produjo porque el establecimiento de la asociación entre el contexto y el choque eléctrico requiere de síntesis proteica [434]. Quevedo y colaboradores (1999) observaron que anisomicina (80 µg) administrada en el hipocampo de ratas Wistar macho, 15 min antes, o 3 h después del entrenamiento en SD-IA con choque de 0,4 mA, afectó su desempeño en el test. Sin embargo, anisomicina no tuvo efecto sobre el desempeño de SD-IA cuando se administró inmediatamente o 6 h después del entrenamiento. A su vez, como se mencionó más arriba, este efecto amnésico de la anisomicina pudo prevenirse por preentrenamiento en la misma tarea, con una intensidad de choque más suave (0,2 mA) 24 h antes del entrenamiento [496]. Los autores interpretaron que un entrenamiento débil, que no es capaz de

expresar una modificación visible en el comportamiento, sería suficiente para producir una codificación duradera de la traza a nivel celular. También Monleon Verdu y col. (2008) observaron que anisomicina, administrada esta vez por vía subcutánea (150 mg/kg) en ratones, inmediatamente después del entrenamiento en ST-IA con choque de 0,5 mA, produjo un deterioro significativo de la memoria. Estos resultados, comparados con los aquí reportados, parecen indicar que la síntesis proteica sería requerida durante la consolidación temprana de la ST-IA. Por otra parte, los mismos autores no observaron diferencias de sexo en los efectos de la anisomicina [499]. Luego de un aprendizaje pareciera haber dos períodos sensibles a la interferencia por la inhibición de la síntesis proteica; es decir que el aprendizaje desencadenaría dos “olas de síntesis proteica”: una antes, cercana al momento del entrenamiento, y otra 3-6 h más tarde [496; 497; 500; 501; 502] (ver TABLA 6.5). Paralelamente, se ha demostrado en rata, que en la formación de una LTM de la SD-IA habría dos períodos de consolidación que requerirían de la síntesis *de novo* de ARNm. La expresión de genes en el hipocampo sería crítica durante dos ventanas temporales: cerca del momento del entrenamiento (15 min antes a inmediatamente después), y 3-6 h más tarde [503]. Estos períodos de transcripción coincidieron con las ventanas temporales de sensibilidad a la inhibición de la síntesis proteica por anisomicina descritas previamente. En base a la bibliografía mencionada, parece claro que la síntesis de proteínas es necesaria en el hipocampo durante la adquisición de IA, pero parece no ser necesaria en la consolidación muy temprana ni tardía, mientras que sería requerida en etapas intermedias (3-6 h luego del entrenamiento).

En nuestro caso, la anisomicina estuvo presente en el hipocampo durante el período en que podría haber tenido lugar un fenómeno de labilización y/o reconsolidación en el OF, o aún desde antes de dicha sesión de OF, con la intención de inhibir la síntesis proteica en hipocampo desde ese momento, para dilucidar si podía estar participando en el efecto del OF sobre la SD-IA. Aunque se administró 90 o 120 min antes de la adquisición de SD-IA, con la intención de evitar o disminuir su presencia durante la misma, en ambos casos resultó amnésica, por lo que se supone que la anisomicina siguió actuando en el hipocampo posiblemente durante la adquisición de la SD-IA. Ese efecto amnésico pareció revertirse, al menos parcialmente, en las ratas que habían sido expuestas previamente a dos sesiones en el campo abierto: algunas sí formaron y expresaron una discreta memoria de la SD-IA, ya que las latencias del test resultaron significativamente diferentes de las del entrenamiento. Los ensayos en los que se administró anisomicina intrahipocampo (30 minutos) antes de exposición al OF, mostraron que, aún en ese caso, la amnesia producida cuando la droga se administró el mismo tiempo (2 h) antes de entrenamiento en SD-IA sin exposición al OF, resultó superada o prevenida por esa sesión de OF. Ello sugiere fuertemente que no sería el hipocampo dorsal el lugar de síntesis hipotéticamente requerida de las proteínas de plasticidad inducidas por el OF.

En los ensayos correspondientes (fig. 4.5), la escopolamina inyectada en el hipocampo luego del entrenamiento afectó, como era de esperar, la consolidación de la memoria de SD-IA, evidenciándose su efecto amnésico. La reversión/prevenición de este efecto amnésico por

exposición previa al campo abierto pareciera ser plenamente efectiva, ya que el grupo correspondiente fue significativamente diferente del grupo de animales no expuestos al OF tratados con escopolamina.

En otras palabras, la inhibición de la síntesis proteica en el hipocampo dorsal por inyección de anisomicina 90 o 120 min antes de entrenamiento en SD-IA, impidió la formación de una LTM y su evocación consecuente, lo que no nos permitió discriminar luego si el efecto superador por exposición al OF de la amnesia provocada por escopolamina, dependería o no de síntesis proteica. La previa exposición a 2 sesiones en un mismo campo abierto previno, al menos en parte, el efecto amnésico de anisomicina inyectada intrahipocampo 90 min antes del entrenamiento en SD-IA, o permitió una recuperación de la memoria cuando se la inyectó 120 min antes del entrenamiento (recordemos que también había posibilitado recuperar la memoria luego de escopolamina o de MK-801). Cuando la escopolamina y la anisomicina, fueron administradas en un mismo animal, también la doble exposición al OF dio lugar a una memoria que no fue significativamente diferente de la memoria “recuperada” luego de escopolamina o de anisomicina administradas por separado.

Ya en un terreno especulativo, podemos interpretar que la administración de ambos fármacos luego de exposición a los 2 OF, habría resultado en una memoria aparentemente más débil que cuando los animales habían recibido sólo escopolamina. De comprobarse esto en trabajos futuros, podríamos discriminar entre los diferentes posibles escenarios para una interpretación que aquí sólo sugerimos: es posible que en la amnesia por escopolamina intervenga de manera directa sobre la consolidación y que la inhibición de la síntesis proteica intervenga sobre la adquisición y/luego sobre la consolidación para la formación de una LTM de SD-IA o que, en cambio, además de ese efecto de la anisomicina directamente sobre SD-IA, la inhibición de la síntesis proteica en el hipocampo también atenúe o impida la acción promotora de los OF. Recordemos el trabajo de Moncada y Viola (2007) en que demostraron que un entrenamiento subumbral de ratas en evitación inhibitoria, generó LTM cuando ocurrió en un tiempo próximo a la exploración de un campo abierto (ver gráfico siguiente). Estos autores reportaron que anisomicina (80 μ g) intrahipocampo, 5 min después de una exposición de 5 min a un campo abierto y entrenadas una hora después en SD-IA con choque subumbral, impidió que se evidenciara el efecto promotor del campo abierto sobre la SD-IA. El grupo inyectado con anisomicina, que había sido expuesto previamente al OF, tuvo un desempeño semejante al del grupo control inyectado con vehículo, que no había sido expuesto al OF, pero que había sido entrenado en SD-IA con igual intensidad de choque subumbral. Por eso, estos autores no observaron efecto directo de la anisomicina sobre la memoria de SD-IA, ya que esta fue inyectada una hora antes del entrenamiento con choque subumbral en SD-IA, con lo que no se evidenció formación de memoria alguna, como era de esperar, excepto por el efecto promotor del OF en el grupo de animales control expuestos a una sesión en el campo abierto. Por eso interpretaron que anisomicina no tuvo un efecto directo sobre SD-IA [170; 504]. En todos los casos en que inyectaron anisomicina, los animales habían sido expuestos previamente al OF, con lo cual no resulta claro si el “efecto” de anisomicina sería atribuible exclusivamente a la inhibición de

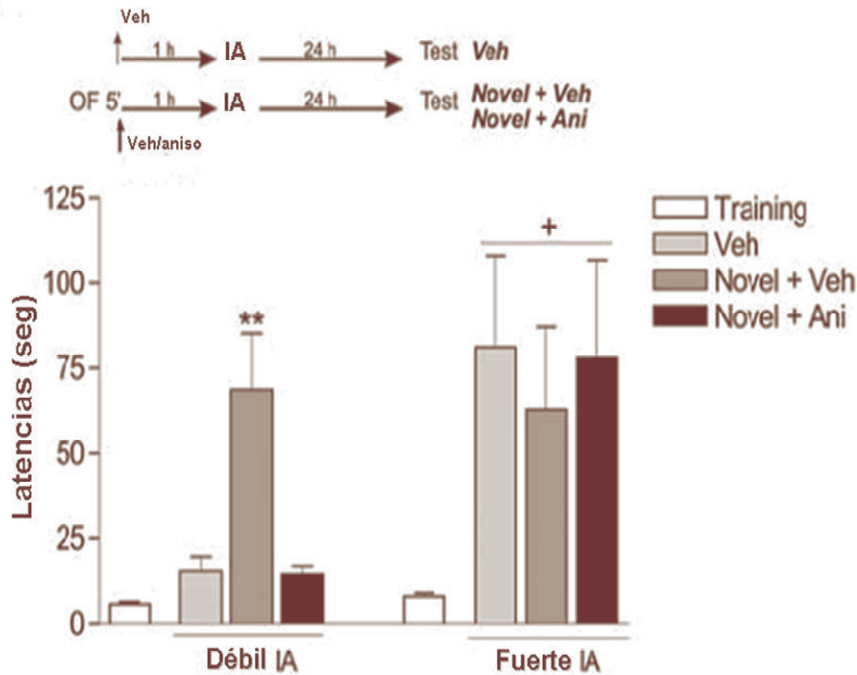


Figure. La inhibición de la síntesis proteica impide la formación de una LTM de la SD-IA inducida por la exposición a la novedad.

Arriba: Diagrama temporal del diseño experimental. Las ratas recibieron una infusión bilateral, en la región CA1, ya sea de vehículo (Novel_Veh) o anisomicina (Novel_Ani), inmediatamente después de la exposición a un OF novedoso. Una hora más tarde fueron entrenados en SD-IA con choque débil (0.15 mA, 2 s) o fuerte (0.4 mA, 2 s). Nótese que se ajustó la intensidad de choque del entrenamiento fuerte, de modo tal de obtener una LTM similar a aquella obtenida con un entrenamiento débil a causa del efecto promotor de la novedad. Las ratas control fueron inyectadas con vehículo 1 h antes del entrenamiento en SD-IA, y no fueron expuestas al OF (Veh). Las latencias fueron registradas 24 h después del entrenamiento en SD-IA.

** $p < 0.01$ vs. todos los grupos con entrenamiento débil (N=16);

+ $p < 0.05$ vs. entrenamiento (N=7); por análisis de Newman-Keuls, post-ANOVA de una vía.

Tomado y traducido de Viola y Moncada 2007

síntesis proteica debida al OF, ya que no se puede afirmar que anisomicina no afectó la adquisición de SD-IA. Por otra parte, en las condiciones de nuestros ensayos, anisomicina en igual dosis en el hipocampo, tuvo efecto amnésico, posiblemente deteriorando la adquisición de SD-IA, aún cuando fue inyectada 90 minutos antes del entrenamiento con choque suave. Cuando se inyectó 120 min antes el deterioro parece haber sido parcial, ya que el grupo alcanzó el criterio de aprendizaje pero durante la evocación el desempeño fue muy pobre, con latencias significativamente menores que los controles y que los inyectados con anisomicina y expuestos luego al OF. Claramente el OF previno o rescató de la amnesia la traza correspondiente a SD-IA, con anisomicina administrada en hipocampo antes o después de la segunda exposición al OF. Esto nos permite concluir que, para la LTM de SD-IA, se requeriría de síntesis de proteínas en hipocampo, al menos desde dos horas antes del entrenamiento. Y el OF rescató de o previno la amnesia aunque no se sintetizaran proteínas en esa estructura, lo que sugiere fuertemente que el etiquetado y la síntesis de proteínas de plasticidad necesarias estarían ocurriendo en una región o estructura diferente.

Autor	Modelo	Tarea	Choque	Test		Descripción	Tiempo respecto al entrenamiento										Observaciones			
							-2 h	-1h	-20'	-15'	-5	0'	10'	20'	30'	2h		3h	6h	
Quevedo y col., 1999	Rata macho	ST-IA	0,4 mA	24 h		80 µg/µl IH				X									Interferencia -	
																X				
Cammarota y col., 2004	Rata macho	SD-IA	0,4 mA 0,8 mA	24 h		80 µg/µl IH				X									Interferencia -	
Davis y col., 1981	Ratón macho	<i>Passive avoidance</i>		7 días		120 mg/kg i.p.			X										Interferencia -	
											X									
Quevedo y col., 2004	Rata macho	SD-IA	0,4 mA	90 min		80 µg/µl IH			X										Sin efecto	
				24 h						X										
Taubenfeld y col., 2001	Rata	ST-IA	0,6 mA	48 h		125 µg/µl IH					X								Interferencia -	
Canal y Gold, 2007	Rata macho	ST-IA	1 mA	4 h y 48 h		125 µg/µl IH / In-Am			X										Interferencia -	
				30 min		125 µg/µl IH			X											Sin efecto
				30 min		125 µg/µl In- Am			X											

Tabla 6.5: Resumen de los antecedentes bibliográficos que estudian el efecto de la inyección de anisomicina a distintos tiempos respecto del entrenamiento en diferentes paradigmas comportamentales.

Nota: (X) Las cruces rojas señalan aquellos casos en la inyección de anisomicina, evidenció tener efecto significativo.
IH:inyección intrahipocampo. In-Am: inyección intra-amígdala. i.p.: inyección intraperitoneal.

Animales con ciclo luz/oscuridad derecho

Efecto del campo abierto sobre la consolidación de la memoria en la prueba de SD-IA y sobre la amnesia instigada por escopolamina, en ratas entrenadas durante su periodo de sueño (mantenidas en ciclo luz/ oscuridad derecho: CD).

En forma similar a lo evidenciado con las ratas mantenidas con ciclo luz/oscuridad invertido (figs 4.2 y 4.3), en aquellas mantenidas con ciclo derecho, entrenadas durante su fase de sueño, se evidenció el efecto amnésico de escopolamina inyectada en el hipocampo dorsal, sobre la consolidación de la SD-IA con choque suave (0,5 mA). Esta amnesia también pudo ser superada por la previa exploración de un campo abierto (fig 4.7).

Los animales mantenidos en CD permanecieron por más tiempo sobre la plataforma durante el entrenamiento, comparados con los animales criados en CI (fig 4.7), aunque tuvieron un mejor desempeño en SD-IA (fig 4.7 E y F). Los animales mantenidos en CD que no pasaron por el OF y los tratados con escopolamina, expuestos previamente al OF, evidenciaron una tendencia hacia una mejor desempeño comparados con los animales mantenidos en CI. Tanto los grupos de animales en CD como aquellos en CI, evidenciaron la prevención o superación de la amnesia instigada por escopolamina intrahipocampo durante la consolidación de SD-IA, gracias a la previa exposición al OF.

Se ha evaluado la influencia del sueño y el estado comportamental sobre la consolidación de la memoria [340; 341; 342].

En ratones se observó que el momento óptimo para la adquisición y para la evocación se encuentra bajo control circadiano [321]. Algunas cepas de ratones (por ej., C3H y C57Bl/6J) mostraron un efecto significativo en el correlato entre el momento en el día y la capacidad de formar memoria en el paradigma de condicionamiento al miedo [321]. Estos animales tuvieron una capacidad de evocación óptima durante la fase inactiva (el período de luz), en el condicionamiento del miedo contextual y con claves. Se ha propuesto que el momento óptimo de la capacidad de evocación estaría determinado por el momento del día. Este sería independiente del momento en el que se realice el entrenamiento, y estaría regulado por el sistema circadiano endógeno. Estos ratones también evidenciaron tener un efecto de “momento del día” sobre la adquisición de una memoria [321].

Nuestros resultados parecieran estar reflejando un efecto de momento del día, que estaría afectando el desempeño en la SD-IA, y el efecto de la previa exposición al OF. Los animales en CD parecieran más sensibles al efecto del OF que los animales en CI, expresando una memoria de largo plazo más robusta de la SD-IA, aún con un entrenamiento débil. Sin embargo, la previa exposición al OF conduce a un perfil de superación de la amnesia instigada por escopolamina muy similar en los animales en CD y en CI. Esto sugiere que los mecanismos involucrados en dicha superación de la amnesia no parecieran verse afectados por el momento del día en que se realiza la sesión de SD-IA.

PARTICIPACIÓN DEL RECEPTOR GLUTAMATÉRGICO NMDA DEL HIPOCAMPO EN LA CONSOLIDACIÓN DE LA MEMORIA DE SD-IA.

Muchos trabajos previos muestran la relación del RNMDA y la memoria, como ya se mencionó en el Capítulo I: Introducción de esta Tesis (pags. 29-31). En nuestro laboratorio, se había demostrado que ocurrían cambios tempranos en el RNMDA de la formación hipocámpica, cuando las ratas eran entrenadas en el laberinto acuático de Morris (MWM) con claves espaciales, pero no si la tarea era SD-IA (Tesis y comunicaciones Alonso y col., 1999). Entonces se sugirió que la participación de los receptores glutamatérgicos ionotrópicos durante la adquisición y en las etapas tempranas de la consolidación de la memoria, dependería de la naturaleza de la tarea. En esos estudios, se comprobaron leves modificaciones en el RNMDA después de una sola sesión de entrenamiento en el MWM, lo que sugirió que el RNMDA podría ser particularmente sensible a la novedad. Por eso comenzamos a estudiar la posible relación entre dicho receptor en el hipocampo y la exposición del animal a un ambiente nuevo y su habituación al mismo.

Efecto de MK-801 intrahipocampo sobre la consolidación de la memoria en la prueba de SD-IA.

En cuanto a la participación del RNMDA en la memoria de SD-IA, en que el animal debe aprender a inhibir su comportamiento exploratorio espontáneo para evitar un estímulo aversivo, existen varios trabajos donde se ha demostrado que antagonistas del RNMDA producen amnesia; por ejemplo, AP5 administrado intrahipocampo, inmediatamente después del entrenamiento en SD-IA con 0,5 mA, causó amnesia retrógrada, interfiriendo con la consolidación [114]. La administración crónica intracerebroventricular de D,L-AP5 en ratas dio lugar a un deterioro del aprendizaje espacial en el MWM. El tratamiento con AP5 también impidió la inducción de la LTP en el hipocampo *in vivo*. Ya entonces, Morris y colaboradores (1986) interpretaron que los receptores NMDA estarían involucrados en el aprendizaje espacial y además, propusieron una relación directa entre LTP del hipocampo y el aprendizaje y la memoria espacial [115]. Por otro lado, Packard y Teather (1987) demostraron que la administración i.p. de MK801 post entrenamiento, deterioró la memoria del MWM, cuando fue administrado hasta dos horas después del entrenamiento, pero no más tarde; también la administración de MK 801 i.p. post entrenamiento interfirió con el proceso de almacenamiento de la memoria de IA [505]. Algo similar ocurrió con MK 801 administrado antes del entrenamiento en el MWM, ya que deterioró el desempeño en la versión espacial [130]. Por otra parte, no se afectó la memoria visual en ninguno de esos casos, ya que todas las ratas fueron capaces de nadar hacia una plataforma visible con latencias similares, sin importar el tratamiento.

En base a estos hallazgos, decidimos utilizar MK 801. Además, para esta elección fue determinante que cuando MK-801 fue aplicada intrahipocampo no produjo cambios apreciables en la actividad locomotora ni otros síntomas comportamentales como ataxia, lo cual ocurrió cuando se administró

por vía sistémica o intracerebroventricular [506]. Otra ventaja es su solubilidad en agua, lo que nos independizó de solventes orgánicos como DMSO.

La amnesia por MK-801 administrado intrahipocampo luego de entrenamiento suave confirma los reportes previos con el antagonista AP5, que fuera utilizado con un esquema experimental similar [114], y corrobora que el bloqueo de RNMDA del hipocampo dorsal interfiere con la consolidación de la memoria de SD-IA. Los resultados muestran que dicho efecto amnésico fue dosis-dependiente y que tuvo lugar tanto en machos (figura 4.8 A) como en hembras (figura 4.8B).

Sin embargo, cuando se administró en el hipocampo una dosis alta del antagonista no selectivo MK-801 de 6 μ g/lado (fig. 4.10) inmediatamente luego de entrenamiento en la tarea de SD-IA, no se evidenció efecto amnésico alguno (este punto se discutirá más adelante, pag 225).

Efecto de la exposición al campo abierto sobre la amnesia instigada por MK-801 intrahipocampo luego de entrenamiento en SD-IA.

El efecto amnésico -al menos aparente- de MK-801 (2 μ g) cuando fue administrado intrahipocampo luego de entrenamiento suave en SD-IA, no se evidenció o se revirtió cuando los animales fueron expuestos previamente a dos sesiones en el campo abierto (figura 4.9).

En otras palabras, tanto los animales control como los grupos tratados con MK-801 que fueron previamente expuestos al campo abierto, aprendieron la tarea y formaron una LTM.

Recordemos que algo similar ocurrió con la amnesia instigada por escopolamina administrada i.p. antes del entrenamiento, o intrahipocampo después de entrenamiento suave en SD-IA (figuras 4.1-4.3 y 4.7).

Por otra parte, las ratas que fueron expuestas a dos sesiones de OF antes de entrenamiento fuerte en SD-IA (con 0,6 o 0,75 mA), no evidenciaron efecto amnésico de MK-801 (2 μ g/hipocampo). Algo similar ocurrió con las ratas inyectadas con escopolamina (2 o 4 μ g/hipocampo), que habían recibido entrenamiento fuerte con 0,6 mA en SD-IA (ver tabla 4, pag 108).

Como hemos mencionado previamente, se ha reportado que un preentrenamiento suave (con choque de 0,2 mA) de ratas en SD-IA, 24 h antes del entrenamiento con choque de 0,4 mA, previno el efecto amnésico tanto del antagonista AP5 como de anisomicina, administrados en hipocampo dorsal luego del entrenamiento [467; 496]. El efecto amnésico de AP5 también pudo prevenirse por pre-exposición a la caja de SD-IA 24 h antes del entrenamiento [467]. Un fenómeno similar fue reportado para la versión espacial del MWM en ratas Lister macho [507]. El deterioro sobre el aprendizaje inducido por infusión intracerebroventricular (por minibombas) de AP5 (30 mM, 0,5 μ l/h), fue casi completamente superado cuando las ratas fueron entrenadas en un laberinto acuático distinto antes de infusión de la droga. Este fenómeno de superación del efecto de AP5 no ocurrió cuando se utilizó una tarea sin componentes espaciales antes de la administración de la droga. [507]. Los autores interpretaron que el MWM podría involucrar procesos cognitivos múltiples, con distintas propiedades farmacológicas. Si bien en parte requeriría de la participación del RNMDA

para algún componente del aprendizaje espacial, este receptor no sería indispensable por ejemplo, para la representación espacial de un ambiente específico.

Desde los trabajos de Morris y col. (1986) [115], existe abundante información acerca de la participación del RNMDA del hipocampo en memoria espacial, así como en la consolidación de otros tipos de memorias, basada tanto en lesiones, como en tratamientos farmacológicos y experimentación genética [46; 49; 119; 508; 509].

Sin embargo, a la luz de la literatura y de los resultados presentados en esta Tesis, tanto el bloqueo de los receptores muscarínicos como de los NMDA de hipocampo durante la consolidación temprana -que dan lugar a amnesia retrógrada-, o el bloqueo de receptores muscarínicos generalizado y la inhibición de la síntesis de proteínas en hipocampo, pero antes del entrenamiento, no impiden la formación de una LTM a condición de que haya habido una experiencia previa como la exposición o habituación a un campo abierto, en nuestro caso.

En trabajos previos en ratas se ha reportado que el entrenamiento en ST-IA con choque de intensidad muy elevada (considerado un “sobre-refuerzo”) protege del efecto de la amnesia instigada por la inyección sistémica de escopolamina 5 min antes [377; 387] o 5 min después [376; 388; 389] del entrenamiento con intensidades de choque más moderadas. También se ha reportado en ratas un fenómeno similar cuando se inyecta cicloheximida 30 min antes o inmediatamente después del entrenamiento en ST-IA. Se observa un efecto protector de la amnesia instigada por cicloheximida, cuando se entrena con intensidades de choque muy elevadas (consideradas “sobre-refuerzo”) [456].

En nuestro laboratorio hemos observado que cuando se entrena a las ratas expuestas a dos sesiones de OF, con intensidades de choque más elevadas (0,75 mA), el nivel de retención evidenciado por los animales es muy elevado, cercano al tope temporal utilizado para SD-IA. En estas condiciones, la administración intrahipocampo de escopolamina o de MK-801 (en dosis que deterioran el aprendizaje con un entrenamiento suave) no tuvo un efecto observable sobre el desempeño. El entrenamiento con choque fuerte y la exposición al OF, protegerían del efecto amnésico de ambas drogas. Se puede especular que un choque más intenso producirá una estimulación sensorial mayor. Este estímulo entonces reclutaría más circuitos neuronales de la misma región, y de otras áreas cerebrales involucradas, produciéndose la inducción concomitante de cambios plásticos en las sinapsis implicadas, de manera de establecer un registro muy robusto de esa memoria y de las respuestas acordes. Por otra parte, durante el entrenamiento en la SD-IA, pudieron haberse activado determinados circuitos neuronales del hipocampo, algunos de los cuales serían comunes a los previamente activados durante la exposición y habituación al campo abierto. Esta reactivación de los mismos circuitos durante el entrenamiento de SD-IA, podría conducir a un refuerzo del fenómeno plástico iniciado durante la habituación. Es decir que tanto el entrenamiento con choque fuerte, como la previa exposición al OF podrían estar formando una traza más robusta que resultaría más resistente a la interferencia farmacológica.

Wang y col (2010) definieron un modelo comportamental para evaluar la memoria de uso cotidiano, dependiente de hipocampo. En este modelo, en días sucesivos las ratas fueron entrenadas para encontrar comida ubicada en diferentes lugares de una caja, y luego de 30-40 min se evaluó si recordaban la localización de la comida correspondiente a ese día. Utilizando este modelo observaron que la exploración de un ambiente novedoso, 30 min después de un entrenamiento con baja recompensa, que da lugar a una codificación débil, y en el que normalmente no se observa LTM, permitió que se formara una memoria espacial persistente. El bloqueo de los receptores dopaminérgicos D1/D5R, así como la inhibición de la síntesis proteica (por anisomicina) en el hipocampo, durante la exploración de la novedad, impidieron que se manifestara el aumento de la persistencia de la memoria. Por otra parte, el bloqueo de receptores dopaminérgicos D1/D5 del hipocampo (por administración de SCH23390, 15 min antes de un entrenamiento que daría lugar a la codificación de una LTM) deterioró el desempeño en esta tarea. La exposición durante 5 min a un ambiente novedoso 1 h antes del entrenamiento, permitió superar completamente el deterioro causado por el bloqueo de receptores dopaminérgicos [510]. Los autores interpretaron sus resultados dentro del marco de la hipótesis de etiquetado sináptico y captura, que implica cierta simetría en torno a la síntesis de PRPs, que puede ocurrir antes o después del establecimiento de la etiqueta sináptica [511]. Propusieron que el efecto sinérgico de la activación de los RNMDA y los receptores dopaminérgicos sobre el establecimiento de una LTP persistente, señalaría la necesidad de la activación de los receptores D1/D5 para que haya disponibilidad de PRPs [512]. Propusieron que la novedad regularía positivamente la transcripción de genes tempranos inmediatos (*immediate early genes*) [513; 514; 515], y en consecuencia, la síntesis y distribución de PRPs. Estos autores pusieron en evidencia el efecto superador de la amnesia de una LTM, ocasionada por el bloqueo de otro sistema de neurotransmisión hipocampal, distinto a los estudiados en esta Tesis, el sistema dopaminérgico, gracias a la previa exposición única al OF.

Desempeño en el campo abierto y relación con la evitación inhibitoria:

En la mayoría de los ensayos, la habituación al OF se puso en evidencia al menos para alguno de los parámetros analizados; en general, para el número de exploraciones verticales y/o de elevaciones sobre los miembros posteriores. Posiblemente los 3 min de duración de las sesiones de campo abierto no alcanzaron para que se produjera una habituación más robusta.

Thiel y colaboradores reportaron que aquellos animales con un número de elevaciones sobre los miembros posteriores mayor en el campo abierto novedoso, tuvieron una mayor reactividad colinérgica en el hipocampo, habiendo correlación entre el número de elevaciones y el aumento en la liberación de ACh (1998) [15]. En nuestro caso, cuando se analizó la posibilidad de interacción entre los resultados en las dos tareas comportamentales estudiadas, no se encontró un correlato entre el grado de habituación al OF y el desempeño en la tarea de SD-IA. En consecuencia, podemos decir que la facilitación por previa exposición al OF, sobre la memoria de SD-IA luego de entrenamiento fuerte, no guardaría una relación directa con la expresión de la memoria del OF. Por

otro lado, la superación por exposición al OF, de la amnesia (por escopolamina, MK-801 o anisomicina) de la LTM de la SD-IA, no evidenció correlación con el grado de habituación expresado en el OF, es decir que un mayor grado de habituación al OF, no implicó una superación más contundente de la amnesia.

PARTICIPACIÓN DE SUBTIPOS DE RECEPTORES NMDA EN LA CONSOLIDACIÓN DE LA MEMORIA DE EVITACIÓN INHIBITORIA

Recordemos que existen diferencias en cuanto a las subunidades que componen a los RNMDA y a su distribución en el SNC. NR2A y NR2B son las principales subunidades asociadas a la NR1 que forman complejos canal-receptor en la corteza y el hipocampo. Se demostró *in vitro* que la duración de la apertura del canal es mayor si está compuesto por NR1/NR2B, respecto de la dupla NR1/NR2A [516]. Por eso se llegó a proponer que el cambio de subunidades que se observa con la edad estaría asociado con una reducción del tiempo de apertura del canal y, por lo tanto, con una menor probabilidad de que la coincidencia sináptica ocurra, lo que podría contribuir a explicar por qué los individuos añosos tienen más dificultades en aprender y registrar nueva información o, en todo caso, “filtrarían” mucho más la información que llegará a ser procesada y almacenada [517].

Ha sido reportado que la sobreexpresión de la subunidad NR2B del RNMDA en el prosencéfalo de ratones transgénicos, condujo a una facilitación de la LTP inducida por un estímulo de 10 a 100 Hz. [132]. Por otra parte, se observó en rebanadas de hipocampo de ratas transgénicas Long Evans que sobre-expresaban la subunidad NR2B en el hipocampo y en la corteza, que no hubo cambios en la LTD de la región CA1, mientras que la LTP se vio aumentada [134]. En cambio, otros autores trabajando en rodajas de hipocampo de ratas de 3 a 4 semanas, observaron que un antagonista selectivo para los RNMDA que contienen NR2B, abolió la inducción de la LTD mientras que no afectó la inducción de LTP [126]. Por otra parte, se ha demostrado que la LTD requiere de la activación de los RNMDA conteniendo NR2B extrasinápticos del hipocampo [518] y de la corteza [127] en la rata. En el hipocampo, estos receptores extrasinápticos parecen regular la magnitud de la LTD mediante el control de la actividad de los RNMDA sinápticos conteniendo NR2A, mientras que no tuvieron efecto sobre la plasticidad en ausencia de activación del receptor sináptico [518].

En nuestros ensayos, cuando se administró en el hipocampo una dosis alta del antagonista no selectivo MK-801 de 6 µg/lado (fig. 4.10) inmediatamente luego de entrenamiento en la tarea de SD-IA, no se evidenció efecto amnésico alguno y, en cambio, se observó un mejor desempeño de las ratas en comparación con el grupo control. **¿Cuál podía ser la causa de esto?** Tal vez con las concentraciones más altas se habrían alcanzado receptores de más difícil acceso y/o de menor afinidad / diferente cinética?

Efecto de la administración del antagonista selectivo NR2B Ifenprodil administrado en hipocampo dorsal sobre la consolidación de la memoria en la prueba de SD-IA.

Tang y col. (1999) crearon un ratón transgénico que expresaba altos niveles de NR2B en el hipocampo y algunas regiones de la corteza cerebral [132]. En estos animales el tiempo de apertura del canal se asemeja al de los más jóvenes, lo que se propuso que los haría más aptos para la detección de coincidencia sináptica y formación de conexiones sinápticas más fuertes entre células coactivadas. Esos ratones aprendieron más rápido y recordaron por más tiempo respecto de los ratones salvajes, al menos en 6 tareas diferentes. Aunque no hubo efecto de la sobreexpresión de NR2B sobre la retención en una tarea de reconocimiento de olores novedosos, estos ratones manifestaron una ventaja notable en la memoria de un paradigma basado en la transmisión social de preferencia de alimentos [133]. A partir de estos resultados, los autores propusieron que NR2B tendría un rol crítico en determinar el umbral (dependería de la edad) para la plasticidad y el establecimiento de memorias. La formación de la memoria y el aprendizaje asociativo involucrarían modificaciones en la eficacia sináptica con participación directa del RNMDA. Como ya hemos mencionado, ratas transgénicas Long Evans sobreexpresando NR2B en hipocampo y corteza, no tuvieron cambios en la LTD de la región CA1, mientras que fue mayor la pendiente de la LTP. Los autores interpretaron que esta diferencia se debería a un aumento de RNMDA conteniendo NR2B. Por otra parte, propusieron que NR2B no estaría involucrada directamente en desencadenar LTD, sino que jugaría un rol esencial en el control de la LTP. A nivel comportamental, dichas ratas fueron más eficientes en el reconocimiento de objetos novedosos, en la versión espacial del laberinto acuático y en la memoria de trabajo (“*delayed-to-non-match*”) [134]. Por otro lado, Clayton y col. (2002), utilizando oligo-ARN antisentido contra NR2B para reducir los niveles de NR2B en hipocampo de rata, comprobaron que se abolió completamente la inducción de LTP dependiente de RNMDA y los animales tuvieron un desempeño deficiente en el MWM [519]. Wong y col. (2002) observaron que la sobreexpresión de KIF-17, una proteína motora de la familia de las kinesinas que se une a NR2B y la transporta a las terminales, produjo mejoras en el aprendizaje y la memoria espacial y de trabajo en ratones [520]. Sin embargo, ratones transgénicos hembra con déficit de estrógeno, que presentaron altos niveles de NR2B en el hipocampo, no mostraron diferencias relevantes en su desempeño en el MWM [521]. Guscott y col. (2003) observaron un efecto deletéreo de MK 801 en el MWM; pero un antagonista selectivo por NR2B, el CP-101.606, en una dosis que ocuparía plenamente los RNMDA del hipocampo conteniendo NR2B, si bien no tuvo efecto en la adquisición del MWM, aumentó notablemente el tiempo de natación (búsqueda de la plataforma) en el cuadrante correcto. Ambos fármacos fueron administrados vía i.p. 60 min antes del entrenamiento en el MWM [130]. Estos resultados coinciden con observaciones previas, en que la administración subcutánea, a través de bombas osmóticas, de antagonistas NR2B durante las 24 h posteriores al daño cerebral experimental, no tuvo efectos significativos en la LTP, pero mejoró funciones cognitivas evaluadas a las 48 h [522]. La subunidad NR2B también parece tener un importante rol en la adquisición del condicionamiento

al miedo. Rodrigues y col. (2001) inyectaron Ifenprodil, bloqueante selectivo NR2B, en amígdala lateral 15-30 min antes del entrenamiento y observaron efecto amnésico en la prueba de condicionamiento al miedo (EC: tono o contexto), tanto a la hora (STM) como a las 24 h (LTM). Sin embargo, cuando se bloqueó NR2B 1 h o 24 h luego del entrenamiento, no se observó efecto alguno. Estos autores interpretaron que Ifenprodil i.p., en las mismas dosis utilizadas en nuestros ensayos, alteró la adquisición pero no la expresión de condicionamiento al miedo contextual y auditivo [523] (ver resumen de los antecedentes en tabla 6.6). Aunque el funcionamiento de los RNMDA en la amígdala es diferente que en el hipocampo, en este caso no pareció modificarse la consolidación, como sí ocurrió, en cambio, en nuestros ensayos.

Teniendo en cuenta su diferente funcionamiento y distribución, así como los antecedentes mencionados sobre funciones cognitivas, es lógico pensar que los distintos tipos de RNMDA puedan estar contribuyendo al aprendizaje y la memoria de manera diferente en distintas regiones del cerebro.

En nuestros ensayos, Ifenprodil, MK 801 o vehículo fueron administrados en la región dorsal del hipocampo inmediatamente después de entrenamiento en las diferentes tareas de IA, y el testeo fue realizado a las 24 h. El antagonista Ifenprodil, selectivo por receptores NMDA conteniendo subunidades NR2B, no tuvo efecto observable, cuando fue administrado en el hipocampo dorsal, en dosis de 0,1 y 1 $\mu\text{g/lado}$, inmediatamente después de entrenamiento en SD-IA con 0,5 mA. Por otra parte, cuando la estimulación fue subumbral (0.3 mA), los animales no habrían aprendido la tarea o no expresaron una memoria de esa tarea; pero cuando se administró Ifenprodil (0,1, 1,0 y 6,0 $\mu\text{g/hipocampo}$), hubo expresión adecuada de la memoria durante la sesión de test, es decir que hubo evidencia de la formación de una LTM de SD-IA (fig 4.11). Esta LTM fue más robusta para los grupos inyectados con 1 y 6 μg , que resultaron estadísticamente distintos del grupo control. Es interesante señalar que una importante proporción de los animales tratados no descendieron de la plataforma dentro del tiempo máximo considerado para la prueba (ver [122]), sin evidenciar congelamiento (“freezing”) o alteración en la motricidad o en el comportamiento exploratorio (vertical y horizontal). Estos resultados parecerían estar en concordancia con lo reportado por Higgins y col (2005) que reportaron que “drogas NR2B” como traxoprodil mejoraron el rendimiento en una tarea de tiempo de reacción frente a 5 opciones en serie (*five-choice serial reaction time*) [129; 130]. Por otra parte, nuestros resultados podrían ser explicados por el mecanismo sugerido por Hayashi y col (2000): NR2B inhibiría, mientras que NR2A estimularía, la expresión en superficie de los RAMPAs regulando directamente el proceso de fusión [138; 139]. La regulación del tráfico de RAMPAs ha surgido como el principal mecanismo de expresión de plasticidad sináptica, al menos en el hipocampo. Por otro lado, la LTD resultaría de la endocitosis de RAMPAs. NR2B inhibiría Ras-ERK, produciendo remoción de los RAMPAs sinápticos y debilitamiento sináptico [139].

En consecuencia, concluimos que el bloqueo de los receptores NMDA de hipocampo dorsal conteniendo la subunidad NR2B, ejerció un claro efecto promotor de la consolidación de SD-IA. No tenemos una adecuada interpretación para la discrepancia entre nuestros resultados y los obtenidos con ratones y ratas transgénicos. Pero es posible que la sobreexpresión de subunidades NR2 lleve aparejada sobreexpresión de receptores NMDA, ya que existe un pool disponible de NR1, por lo que esta subunidad esencial no sería limitante. Entonces, los efectos observados en los animales transgénicos podrían tener relación con el aumento de los receptores NMDA en las regiones involucradas [132]. Un antagonista selectivo para NR2B provocó un efecto amnésico cuando fue administrado en un tiempo próximo, previo al entrenamiento (1 hora o menos), pudiendo haber afectado tanto la adquisición como la consolidación [130; 523]. Sin embargo, cuando se lo inyectó 1 h o 24 h después del entrenamiento, no hubo efecto [523]. Nuestros resultados muestran un efecto facilitatorio de ifenprodil, cuando es administrado en el hipocampo dorsal, inmediatamente después del entrenamiento con choque subumbral en SD-IA. Los RNMDA conteniendo NR2B parecerían ejercer roles diferentes durante la adquisición y la consolidación de esta memoria: durante la adquisición su funcionamiento parecería tener un rol crítico para la codificación de esa memoria; mientras que durante la consolidación, la activación de estos receptores parecería ejercer un rol modulador, de carácter inhibitorio.

Autor	Modelo	Tarea	Antagonista	Via	Tiempo respecto al								Efecto	
					-24h	-60'	-30'	-15'	0'	1h	24h			
Guscott y col., 2003	Rata	MWM	CP-101,606	i.p.		X								Sin efecto
Okiyama y col., 1997	Rata	MWM	CP-101,606; CP-101,581; CP-98,113	sub-cutánea (mini-pumps)	X									Sin efecto
Rodriguez y col., 2001	Rata	Condicionamiento de miedo	Ifenprodil	sistémica y intra-amígdala			X							deterioro
								X						
										X				
Resultados de esta Tesis	Rata	SD-IA	Ifenprodil (1 y 6 µg)	intra-hipocampo						X			Promovió LTM	
		ST-IA	Ifenprodil (4 µg)						X					

Tabla 6.6: Resumen de nuestros resultados y de los antecedentes acerca del efecto del bloqueo selectivo de aquellos RNMDA que contienen NR2B en el comportamiento de la rata.

Efecto de MK-801 sobre evitación inhibitoria por pasaje de compartimiento en un paso (ST-IA)

Hemos observado que 2 o 6 µg de MK-801 administrados intrahipocampo post-entrenamiento, no tuvieron un efecto significativo en la tarea de ST-IA, cuando las ratas fueron entrenadas con un choque por encima del umbral (0.5 mA) (Fig. 4.12), ni aún con un choque suave que puede considerarse umbral en las condiciones de nuestros ensayos (0.4 mA), con la dosis máxima de MK-801 utilizada (6 µg) (Fig. 4.13). Entonces podemos concluir que, en las condiciones de nuestros ensayos, MK-801 no evidenció efecto amnésico sobre la consolidación de ST-IA, como ocurrió en

la SD-IA en condiciones similares. Como ya hemos señalado (cap III.4) la tarea de ST-IA tuvo características diferentes a la tarea de SD-IA. Los estímulos, aún siendo de igual naturaleza e intensidad, pueden tener un valor comportamental diferente en cada tarea. Así como el umbral para el aprendizaje es aparentemente menor en ST-IA que en SD-IA, también es menor el estímulo que pone en evidencia una facilitación en ST-IA por manipulación sistemática desde el destete, además de no haber efecto evidente de la previa exposición al campo abierto sobre el desempeño en ST-IA. El bloqueo de los receptores muscarínicos por escopolamina, resultó amnésico en SD-IA (capítulo III, figs 4.2 y 4.3), mientras que en similares condiciones experimentales, no tuvo efecto visible en ST-IA (capítulo III, fig. 4.6). Estos resultados parecieran confirmar que las características de la tarea de ST-IA (los 15 segundos previos a que se abra la puerta-guillotina, el espacio “más confortable” en que se encuentra el animal, la latencia mas prolongada durante el entrenamiento) servirían para independizar relativamente la prueba, de la “novedad” que representa la primera exposición a la caja de entrenamiento, por un lado, así como de la manipulación por el experimentador por el otro, tal vez manteniendo más bajo el nivel de estrés generado por dicha manipulación. En ambas tareas, la “fuerza” de la traza, de las modificaciones plásticas subyacentes y su dependencia de los sistemas de neurotransmisión en juego, parecerían ser diferentes [433; 436]. Es lógico suponer que un estímulo comportamentalmente relevante concertaría más atención/alerta comportamental, que uno menos relevante. En ST-IA se podrían estar reclutando más circuitos neuronales de la misma y, tal vez, de otras áreas cerebrales involucradas, produciéndose la inducción concomitante de cambios plásticos en más sinapsis/circuitos, de manera de establecer un registro muy robusto de esa memoria y de las respuestas acordes. Por lo tanto, la traza de ST-IA resultaría menos susceptible de ser interferida por el tratamiento farmacológico.

Efecto de la administración del antagonista selectivo NR2B ifenprodil en hipocampo dorsal sobre la consolidación de la memoria en la prueba de ST-IA.

Ifenprodil administrado postentrenamiento en ST-IA, tuvo un evidente efecto facilitador sobre el desempeño en la tarea de ST-IA, cuando se entrenó con un choque suave de 0,4 mA de intensidad (fig. 4.14). El choque de 0.4 mA dio lugar a latencias de test considerablemente más bajas que el de 0,5 mA, revelando el mencionado efecto promotor o facilitador por el bloqueo de los receptores NMDA portadores de subunidades NR2B.

Cuando se compararon las diferencias de latencias (test-entrenamiento) de los grupos tratados con MK-801 en dosis máxima y con ifenprodil, ambos grupos resultaron ser significativamente diferentes, con un desempeño notablemente mejor del grupo tratado con ifenprodil (fig..4.14). Estos resultados corroboran el efecto promotor del bloqueo de receptores conteniendo NR2B en el hipocampo, en la formación de la traza de una LTM con componentes aversivos, tal como ocurrió en la SD-IA (fig 4.11). El bloqueo general de todos los subtipos de RNMDA del hipocampo dorsal

dio lugar a resultados distintos en SD-IA respecto a ST-IA, siendo que dio lugar a un efecto amnésico en SD-IA (fig 4.8), y no tuvo efecto evidente en ST-IA (fig 4.12). En cambio, el bloqueo selectivo de aquellos RNMDA conteniendo la subunidad NR2B, dio lugar a un efecto facilitatorio en ambas tareas. Estos resultados sugieren fuertemente que los receptores NMDA del hipocampo dorsal conteniendo NR2B se comportarían como inhibidores durante la consolidación de la memoria, al menos en las etapas tempranas. Si bien la traza de ST-IA resultaría menos susceptible de ser interferida por el bloqueo de los RNMDA durante la consolidación temprana, en forma similar a lo que ocurre en SD-IA, es susceptible de ser modulada positivamente por el bloqueo de los RNMDA conteniendo NR2B.

Resumen de nuestros resultados

Tratamiento	Choque		No-OF	2 OF
<i>naive</i>	0,5 mA		LTM	LTM
	0,75 mA		LTM	Facilitación LTM
	Vía	Momento inyección (respecto tr de SD-IA)		
escopolamina	IP	-20 min	amnesia STM y LTM	LTM (ok) y amnesia STM
	IH	0 min	amnesia STM y LTM	LTM (ok) y STM (ok)
anisomicina	IH	-90 min y -120 min	interferencia LTM	LTM (ok)
anisomicina + escopolamina	IH	-90 min y 0 min (respectivamente)	--	LTM (ok)
MK-801	IH	0 min	amnesia LTM	LTM (ok)

Tabla 6.X: Efecto de la previa exposición al campo abierto (OF). Resumen de los resultados.

(*) Tiempo respecto del entrenamiento en SD-IA.

IH: inyección intrahipocampo; i.p.: inyección intraperitoneal

(ok): indica que hubo recuperación de la amnesia.

Hipótesis de etiquetado sináptico y captura de proteínas de plasticidad

Aquellas sinapsis activadas por un aprendizaje requerirán de proteínas de plasticidad (PRPs: del inglés *plasticity related proteins*) para que se establezca la necesaria plasticidad subyacente a una LTM. La “hipótesis de etiquetado sináptico y captura” (STC del inglés “*synaptic tagging and capture*”) propone que en aquellas sinapsis activadas recientemente se establece una etiqueta transitoria que capturará con especificidad las PRPs. Se ha demostrado que una forma transitoria de LTP (la LTP temprana) que se induce a partir de una estimulación eléctrica débil, puede ser transformada en una forma más persistente de LTP (la LTP tardía), si el estímulo fuerte y el débil se aplican dentro del lapso de una cierta ventana temporal, que es bastante extensa (2 h), en diferentes sinapsis de una misma neurona [177; 412]. En otros trabajos se ha demostrado que la LTP del hipocampo puede

ser reforzada por exposición de las ratas a un ambiente novedoso o al entrenamiento en el tablero con agujeros (*holeboard*), y que este refuerzo es dependiente de síntesis proteica [524; 525].

A nivel comportamental, se ha demostrado en ratas que un protocolo que sólo daría lugar a la formación de una STM (en tareas como SD-IA, reconocimiento de la localización de objetos, condicionamiento del miedo y aversión a un gusto), dio, en cambio, lugar a una LTM cuando el entrenamiento fue contingente con la exposición a una experiencia novedosa. El procesamiento de la novedad habría dado lugar a activación neuronal convergente en algún área cerebral activada por ambas tareas-, dentro de una ventana temporal próxima al entrenamiento [170; 504]. Esto no ocurrió cuando se expuso a las ratas a una experiencia que se consideró familiar. Este proceso requirió de la síntesis *de novo* de proteínas, posiblemente inducida por la novedad. Por estos resultados Moncada y Viola (2007) y Ballarini y col. (2009) propusieron la existencia de un mecanismo general para la formación de una LTM, que se iniciaría con el “etiquetado comportamental” que se establecería a partir de un aprendizaje débil. Este mecanismo sería análogo al proceso de STC antes descrito: requeriría de la formación de una etiqueta transitoria -que no dependería de síntesis proteica- en una sinapsis específica, que tendría la capacidad de reclutar aquellas proteínas (PRPs) sintetizadas luego de la exposición a la novedad.

La amnesia puede ocurrir por deterioro de multitud de procesos cognitivos, tales como el aprendizaje (adquisición de nueva información), la consolidación de la información, el recuerdo/ evocación, la motivación, la atención y otros procesos no cognitivos como el estrés. Los fármacos utilizados en esta Tesis (escopolamina, MK-801 o anisomicina), en general dieron lugar a amnesias retrógradas de la memoria de SD-IA que estuvieron vinculadas principalmente con un deterioro durante la consolidación y además, en el caso de escopolamina, también se produjo amnesia anterógrada, afectándose la adquisición y/o la consolidación. Estas amnesias pudieron ser prevenidas o contrarrestadas por la previa exposición al campo abierto.

La teoría de la modulación de la memoria propone que durante la consolidación de una memoria, la neurotransmisión que proviene de la amígdala (por ejemplo, vía receptores β -adrenérgicos) o bien las hormonas relacionadas con el estrés (por ejemplo, vía receptores de glucocorticoides) podrían modular la persistencia de la memoria “declarativa” en otras regiones cerebrales, entre ellas el hipocampo [21]. Esta teoría podría incluir al efecto de la previa exposición a un ambiente poco familiar, si bien fue desarrollada a partir de aprendizajes con contenido emocional. Y esta teoría, a diferencia de la hipótesis de STC, no involucraría la existencia de etiquetas sinápticas [412].

Podemos concluir que la exposición con habituación al OF, previno o superó la amnesia por bloqueo de los receptores muscarínicos o receptores NMDA. En forma semejante

Wang y col (2010) reportaron que el bloqueo de receptores dopaminérgicos D1/D5 del hipocampo durante la adquisición y consolidación de una tarea que evalúa la memoria de uso cotidiano pudo ser superado o prevenido por la previa exposición una sesión de 5 min en el OF [510].

Intentando interpretar nuestros resultados en el marco de la teoría de STC, hay al menos dos hechos que difieren de las propuestas mas generales ya que, en las condiciones de los ensayos realizados: 1) la experiencia previa podría ser novedosa o no, ya que este no parecería ser un requerimiento absoluto, y 2) la síntesis de PRPs inducida por una tarea podría ocurrir en otra región o estructura relacionada –no exactamente en la misma- y, aun así, las etiquetas serían capaces de capturarlas.

PARTE I

RESUMEN DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO III.

Las siguientes conclusiones se refieren a resultados con ratas adultas criadas en ciclo luz/oscuridad invertido, entrenadas durante su fase de vigilia.

Manipulación sistemática.

- Ratas **macho manipuladas de manera sistemática** tres veces por semana desde el destete, 1 min por vez, que luego fueran **entrenadas con igual intensidad de choque en SD-IA**, mostraron un **desempeño similar** en esa tarea comparado con el de aquellas que no recibieron esta manipulación.
- El menor **estímulo con que hubo** aprendizaje de SD-IA, registro de la traza y formación de LTM, fue de **0,5 mA para los machos y de 0,4 mA para las hembras**, aunque debe tenerse en cuenta que estas fueron siempre algo más pequeñas que los machos de la misma edad.

Intensidad del estímulo.

- **Hubo coherencia entre la intensidad del estímulo durante el entrenamiento en SD-IA y el incremento en las medianas de las latencias de permanencia sobre la plataforma** (coeficientes de correlación de Spearman entre 0,9 y 1). El **desempeño fue mejor** para los animales **-con manipulación sistemática-** que recibieron **entrenamiento “fuerte”**, comparados con los animales sin manipulación y con los entrenados **con choque suave**.
- En cambio, **no hubo correlación entre las medianas de latencias del test de la SD-IA y la intensidad del choque**, para las ratas que no recibieron manipulación sistemática desde el destete. Los grupos entrenados con distintas intensidades de choque parecen haber tenido un desempeño similar (aunque hubo mayor dispersión de los datos).

Efecto de la exposición al OF sobre el desempeño en SD-IA

- La exposición previa a **una sesión de OF, de 3 o 5 min, no modificó el desempeño en SD-IA con entrenamiento débil** -cercano al umbral-, tanto con un intervalo de 50 min como de 90 min entre ambas experiencias.
- Los animales expuestos a **dos sesiones en el OF (de 3 min)**, en dos días consecutivos, mostraron **habitación**.
- La exposición a **dos sesiones de OF** en días consecutivos, previa al **entrenamiento en SD-IA con choque suave, no produjo modificación significativa en la LTM** de la evitación, ni en machos ni en hembras.
- En cambio, la previa exposición a las **dos sesiones de OF** (con habitación a la arena), dio lugar a una **facilitación en el aprendizaje y/o en la consolidación de la SD-IA cuando el entrenamiento fue fuerte**, manifestándose una **LTM más robusta**.
- Los animales entrenados en SD-IA **con el menor choque** para formar una LTM, también **expresaron STM**.

- El **OF previo no modificó** significativamente la expresión de la **STM**.

El **efecto del OF sobre la SD-IA pareciera depender del nivel de entrenamiento**, lo que indica que **podría depender de la relevancia comportamental del estímulo**. Un choque más intenso (por lo tanto más doloroso y, en consecuencia, más aversivo, representando entonces un estímulo muy relevante para el animal) produciría una estimulación sensorial mayor, con la posibilidad de establecer más asociaciones, más fuertes. Este estímulo reclutaría más circuitos neurales de la misma región, - en el terreno previamente “sembrado” por el OF - y tal vez de otras áreas cerebrales, produciéndose inducción concomitante de cambios plásticos en más sinapsis, dando lugar a un registro muy robusto de esa memoria, que resultara en respuestas acordes. Por otra parte, desde un enfoque evolutivo, podría representar menos costo el que una experiencia poco o nada aversiva (OF), se asociara (facilitando) fuertemente con una aversiva, sólo cuando esta última fuera comportamentalmente relevante (por ej., produciendo fuerte dolor o daño).

CD (FS) vs. CI (FV)

- En el OF, los animales criados en **CD, entrenados durante su FS, desarrollaron menos exploración horizontal y más exploración vertical**, comparados con los animales entrenados en FV.
- Tanto los animales FS como FV, se habituaron al OF en la segunda sesión, habiendo diferencias entre ellos en ambas sesiones: Las **ratas en CD, entrenadas en su FS, demoraron significativamente más en descender de la plataforma durante el entrenamiento en SD-IA**, y mucho **mas durante** el test, que los animales en CI, entrenados **durante su FV (fase de mayor actividad)**.
- **Como ya se mencionó, las ratas FV, hubieran sido** o no previamente expuestas al OF, expresaron una memoria similar de SD-IA cuando fueron entrenadas con un choque **suave**. En cambio, los animales FS expuestos a una o dos sesiones en el OF, evidenciaron una LTM más robusta de la SD-IA, cuando fueron entrenados con protocolo suave.
- **Tanto los animales FV como los animales FS, que fueran previamente expuestos a dos sesiones en el OF, tuvieron un desempeño en SD-IA significativamente** mejor que los animales no expuestos al OF, cuando fueron entrenados con un protocolo fuerte. En este caso, la LTM de la SD-IA, fue similar para ambos grupos.

Podemos concluir que **los animales en CD entrenados en FS, evidenciaron ser más sensibles al efecto del OF que los animales en CI entrenados durante FV, expresando una memoria de largo plazo más robusta con un entrenamiento débil**. Sin embargo, el hecho de que la actividad locomotora aparezca disminuida en las ratas en CD, debe ser tenido en cuenta tanto en el OF, donde el número de cruzamientos fue menor en la primera sesión (o en una única sesión), como en el entrenamiento en la SD-IA, en que los animales tuvieron latencias significativamente mayores

para descender de la plataforma. También debe tenerse en cuenta el factor atención, el comportamiento exploratorio, ya que las ratas FS no expuestas al OF, exploraron menos también la plataforma, y también el factor tiempo, más prolongado para FS, pudiendo influir en las asociaciones que debe hacer la rata,

ST-IA.

- Hubo **coherencia entre la intensidad del estímulo** durante el entrenamiento **en ST-IA** y el **incremento en las medianas de las latencias** de permanencia en el compartimiento iluminado de los animales con manipulación sistemática (coeficiente de correlación de Spearman = 1).
- El umbral de intensidad de choque para evidenciar aprendizaje en machos y hembras, sería $\leq 0,4$ mA en ST-IA (0,3-0,4 mA), siendo menor al umbral aparente para la SD-IA (entre 0,3 y 0,4 mA para las hembras y entre 0,4 y 0,5 mA para los machos).
- **Machos y hembras** entrenados **con igual intensidad de choque en ST-IA**, tuvieron un **desempeño similar** (como ocurrió en la SD-IA).
- La manipulación sistemática desde el destete mejoró el desempeño en ST-IA de ratas hembra entrenadas con choque de 0,5 mA. Siguiendo la misma línea de razonamiento que para SD-IA, 0,5 mA constituiría un estímulo supraumbral para ST-IA, ya que el umbral estaría cerca de los 0,3 mA (especialmente en las hembras que son un poco más pequeñas que los machos de igual camada); es posible entonces, que este constituya un estímulo más relevante; y de modo similar a lo que ocurrió en SD-IA con un estímulo supraumbral elevado, la manipulación sistemática facilite la memoria de la ST-IA.
- La exposición a **2 OF** (de 3 min), previa al entrenamiento **en ST-IA con choque de 0,5 mA**, **no produjo modificación alguna en la LTM de la evitación**, ni en machos ni en hembras.

En síntesis, **en ambas tareas** de evitación las ratas evidenciaron **mejor aprendizaje** y una **LTM más robusta cuanto más fuerte fue el estímulo**; machos y hembras entrenados con igual intensidad de choque tuvieron un **desempeño similar**; la **previa exposición a 2 OF** –con habituación- con intensidad de choque de 0,5 mA, **no dio lugar a una modificación significativa** en el desempeño en evitación, excepto para ratas FS con protocolo suave..

Los **diferentes resultados entre ambas tareas** parecen indicar que **los estímulos**, aún de igual intensidad, podrían tener un **valor comportamental diferente** en cada tarea. Así como el umbral para el aprendizaje es aparentemente menor en ST-IA que en SD-IA, también es menor el estímulo que pone en evidencia una facilitación en ST-IA por manipulación sistemática.

La **manipulación sistemática** tuvo un **efecto facilitador** sobre la memoria de **SD-IA con entrenamiento fuerte** (1 mA), y de **ST-IA aún con entrenamiento moderado** (0,5 mA).

PARTE II

RESUMEN DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES DE LOS RESULTADOS DEL CAPÍTULO IV

Farmacología de la memoria

Las conclusiones que siguen corresponden a los resultados de ensayos con ratas adultas criadas en CI y entrenadas en FV (hasta donde se indique).

Transmisión muscarínica y memoria de evitación:

El bloqueo de receptores muscarínicos por escopolamina, tanto administrada i.p. antes de entrenamiento suave en SD-IA, como en hipocampo dorsal, inmediatamente después del entrenamiento también suave, evidenció el esperado “efecto amnésico” sobre la memoria de la tarea, causando un deterioro de la expresión de la STM y la LTM. La escopolamina i.p. puede haber afectado tanto la adquisición como la consolidación de LTM, mientras que la administración intrahipocampo postentrenamiento, claramente afecta sólo la consolidación.

Por lo tanto, nuestros resultados corroboran que:

- La transmisión muscarínica es requerida posiblemente durante la adquisición y, en particular, en el hipocampo dorsal, durante la consolidación temprana de una LTM de SD-IA, como así también para el registro transitorio para la expresión de una STM.
- La **exposición a 2 OF fue suficiente para prevenir o superar la amnesia instigada por escopolamina de la STM de SD-IA**, cuando el **bloqueo se restringió al hipocampo dorsal** y a la etapa de consolidación temprana.
- En cambio, **cuando escopolamina fue administrada i.p.**, afectando también otras regiones cerebrales (e incluso a nivel periférico), estando así presente durante la adquisición, la previa exposición al **OF no rescató la expresión de STM** (como es sabido, algunos mecanismos comunes y otros diferentes subyacen a ambos tipos de memoria).
- La **exposición al OF** (a 1 o 2 sesiones) **fue suficiente para prevenir o superar la amnesia de SD-IA instigada por escopolamina**, cuando la memoria fue evaluada a las 24 h; es decir que se manifestó la **formación de LTM**: el OF habría promovido o rescatado la formación de una traza.
- Tanto las ratas FV, como las FS, evidenciaron superación de la amnesia instigada por escopolamina inyectada en hipocampo postentrenamiento con choque suave en SD-IA, por la exposición previa al OF.

El efecto amnésico del bloqueo de la transmisión muscarínica durante la adquisición y/o la consolidación temprana de SD-IA, pudo “ser superado”, por la previa exploración o la habituación a un ambiente diferente.

En cambio, en cuanto a la **STM**, el bloqueo muscarínico pudo ser “superado” solamente cuando estuvo restringido al hipocampo dorsal después del entrenamiento.

Esta **superación de la amnesia ocurrió en animales que se habían habituado** al OF, es decir que la **superación no dependió exclusivamente, del efecto de novedad**. Podría depender de otros

aspectos y funciones cognitivas, como el establecimiento de otra LTM en la misma estructura (o en otra estructura) y/o de modificaciones en el estado de atención.

- Como la **exposición al OF fue suficientemente breve** (<< 20 min) y fue presentada al menos 50 min antes del entrenamiento en la SD-IA (cuando el animal asociaría el contexto [EC] con el choque en las patas [EI]), **no hubo condiciones para una reversión de STP/LTP y de STM** (ya ocurridas o ya establecidas).
- A diferencia de lo observado para la SD-IA, **en ST-IA** (con 0,5 mA) **no hubo un efecto amnésico significativo por escopolamina** administrada en **hipocampo dorsal durante la consolidación**.
- La exposición previa al OF no tuvo efecto evidente sobre el desempeño en ST-IA.

Como ya se menciona, aunque similares, estas tareas son diferentes en varios aspectos, posiblemente a nivel de la **relevancia comportamental del estímulo** aversivo en diferentes situaciones, la importancia del **espacio para la evitación** -estrecha plataforma elevada vs. un espacio más amplio, iluminado, a nivel- y de la **posibilidad de asociación con una ventana temporal más prolongada** en ST-IA. Entonces, la “fuerza” de la traza, de las modificaciones plásticas subyacentes y su dependencia de los sistemas de neurotransmisión en juego, podrían ser muy diferentes [433; 436].

Inhibición de la síntesis proteica en hipocampo

El bloqueo de la síntesis proteica por **anisomicina administrada en el hipocampo 90 o 120 min antes del entrenamiento en SD-IA con choque suave, afectó la adquisición y/o consolidación de esta tarea, provocando amnesia**. Estos resultados corroboran que la LTM de SD-IA es dependiente de síntesis proteica en el hipocampo, previa a, o durante la adquisición y/o la consolidación temprana.

- Cuando anisomicina se administro luego del segundo OF, dicha amnesia **fue superada al menos parcialmente**. La anisomicina estuvo presente en el hipocampo durante el período en que podría haber tenido lugar un fenómeno de labilización y/o reconsolidación del OF, y podría haber seguido actuando en el hipocampo, incluso durante la adquisición de la SD-IA. Es decir, 2 sesiones en el OF posibilitaron superar el efecto amnésico de anisomicina a nivel de la adquisición/consolidación de SD-IA, promoviendo la formación y/o expresión de LTM.

Además, ello resulta coherente con la interpretación de que el OF podría haber inducido la síntesis de proteínas *ad hoc* de plasticidad sináptica, que podrían ser utilizadas luego, lo que habría permitido superar en parte la amnesia por inhibición de la síntesis en el hipocampo dorsal.

El grado de reversión/prevencción de la amnesia de SD-IA por previa exposición al OF, luego de administrar anisomicina y escopolamina en los mismos animales, resultó aparentemente similar al resultado de la infusión de cada una de las drogas por separado, lo que sugiere que el efecto

amnésico de ambas drogas no sería aditivo – y se podría especular que comparten algunos mecanismos -.

La inhibición de la síntesis proteica en el hipocampo 2 horas antes del entrenamiento en SD-IA, habría impedido la formación de una LTM y su evocación consecuente. Por otra parte, la previa exposición al OF permitió la formación de una LTM similar, tanto para los animales inyectados con anisomicina, como con anisomicina y escopolamina; en consecuencia, no fue posible concluir si el efecto superador por exposición al OF, de la amnesia provocada por escopolamina, dependería o no de síntesis proteica (se requieren otros ensayos para evaluarlo).

Los ensayos administrando anisomicina intrahipocampo (30 minutos) antes de exposición al OF, mostraron que, aún en ese caso, la amnesia producida cuando la droga se administró 2 h antes de entrenamiento en SD-IA sin exposición al OF, resultó superada o prevenida por esa sesión de OF. Ello sugiere fuertemente que **no sería – únicamente? - el hipocampo dorsal el lugar de síntesis hipotéticamente requerida de las proteínas de plasticidad inducidas por el OF.**

Estos resultados indican que, tanto la experiencia novedosa de exploración de un campo abierto, como la repetición de esa experiencia que da lugar al reconocimiento de la arena, posibilitan la formación de una LTM de la SD-IA, a pesar del bloqueo de los receptores muscarínicos de CA1 del hipocampo o de un bloqueo más generalizado por vía i.p. o a pesar de la inhibición de la síntesis proteica en esa estructura. Ello podría deberse, entre otras posibilidades, a un incremento sostenido de la liberación de ACh en el hipocampo durante y luego de la exploración y un incremento aun mayor en la reexposición al OF (ver Thiel y col., 1998), o también en otras estructuras relacionadas, reclutadas por el OF, así como también al probable aumento de algunas catecolaminas (McGaugh, 2000), y/o a la disminución del umbral para la inducción de cambios plásticos subyacentes a la formación de la traza y su consolidación en una LTM. En este caso, podrían intervenir proteínas directamente vinculadas con plasticidad sináptica que habrían sido sintetizadas durante el OF previo. Por eso, sería necesario ensayar el bloqueo de la síntesis proteica antes de la exposición al OF en otras estructuras posiblemente involucradas, intentando hacerlo en condiciones en que no se afecte directamente la adquisición de la SD-IA.

La exposición al OF fue siempre previa a la adquisición, por lo que no podemos saber si el efecto ocurre durante o después de la adquisición y tampoco si es simétrico. Dos hechos nos llevan a conjeturar que podría deberse a un efecto de “rescate” durante la consolidación temprana: 1) la amnesia por bloqueo muscarínico generalizado previo a la adquisición, pudo ser revertido por bloqueo de receptores A1 durante la consolidación, indicando que algo de la traza efectivamente se formó [457]; 2) la amnesia retrógrada por bloqueo de receptores muscarínicos del hipocampo durante la consolidación temprana, tanto sobre la STM como sobre la LTM, también fue prevenida o superada por el OF.

Transmisión glutamatérgica. Receptores NMDA.

- La **inhibición de RNMDA del hipocampo dorsal** por administración de 2 µg/lado -pero no de 0,5 µg/lado- de MK-801, luego de entrenamiento suave en la SD-IA, **provocó amnesia**. Esto corrobora que el bloqueo de los receptores NMDA del hipocampo dorsal interfiere en forma dosis-dependiente con la consolidación de la memoria de SD-IA, tanto en machos como hembras.
- La previa **exposición al OF dio lugar a formación de una LTM** de la tarea, **a pesar del bloqueo de los RNMDA** durante la consolidación temprana.

A la luz de datos de la literatura y de los resultados presentados en esta Tesis, tanto el **bloqueo de los receptores muscarínicos**, como de (algunos subtipos de?) **receptores NMDA de hipocampo durante la consolidación temprana**, que dio lugar a amnesia retrógrada, o la **inhibición de la síntesis de proteínas antes del entrenamiento**, que provocó amnesia anterógrada, **no impidieron la formación de una LTM cuando hubo una experiencia previa** como la exposición o habituación a un campo abierto, en este caso. El OF habría tenido un efecto similar frente al desafío con drogas que actúan en diferentes momentos, por sistemas de neurotransmisión y mecanismos muy diferentes, incluso administradas por distinta vía.

Como **no hubo efecto amnésico de MK-801 administrado i.p. (0,07 mg/kg) 20 min antes, o de MK-801 (2 µg) intrahipocampo, inmediatamente después de entrenamiento fuerte en SD-IA (0,75 mA)** en ratas que fueron **expuestas previamente al OF; como tampoco** hemos observado amnesia por escopolamina cuando el entrenamiento en SD-IA podría considerarse fuerte, es dable suponer que un estímulo comportamentalmente relevante concertaría más atención/alerta comportamental, que uno menos relevante. Como ya hemos mencionado, se reclutarían más circuitos neurales de la misma región, y tal vez, de otras áreas cerebrales involucradas, produciéndose la inducción concomitante de cambios plásticos en más sinapsis/circuitos, estableciéndose un registro muy robusto de esa memoria. Por lo tanto, la traza resultaría menos susceptible de ser interferida, por ej. por tratamiento farmacológico.

- Por otro lado, una **dosis alta de MK-801 (6 µg/hipocampo)** inmediatamente **luego de entrenamiento en SD-IA, no produjo efecto amnésico**. Inclusive pareció haber una tendencia a un mejor desempeño en esta tarea. Una interpretación posible para estos resultados sería la de una **participación diferencial de subtipos de receptores NMDA**: aquellos que serían bloqueados recién con las concentraciones más altas del antagonista (menos accesibles?, con menor afinidad?) serían “inhibitorios”, por lo que su bloqueo daría lugar a una facilitación.
- El **bloqueo de receptores NMDA del hipocampo dorsal** con MK-801 **no tuvo efecto sobre la consolidación de la memoria de ST-IA** (con 0,5 mA), a diferencia de lo que ocurrió con la SD-IA

(con igual choque). De manera similar a lo que ocurrió con escopolamina **en ST-IA, no se evidenció efecto amnésico de MK-801**. Esto constituye otra muestra de las diferencias entre estas tareas: como ya se mencionó, la “fuerza” de la traza, de las modificaciones plásticas subyacentes y su dependencia de los sistemas de neurotransmisión en juego, podrían ser muy diferentes.

- De manera similar a lo ocurrido en SD-IA, una **dosis alta de MK-801 (6 µg/lado) postentrenamiento suave en ST-IA, no provocó cambios.**
- El **bloqueo de receptores NMDA de hipocampo dorsal conteniendo la subunidad NR2B**, ejerció un claro **efecto promotor durante la consolidación**, en la formación **de la LTM de la SD-IA** cuando se entrenó **con choque subumbral**. De manera similar, el **bloqueo de los receptores de hipocampo conteniendo NR2B también fue facilitador durante la consolidación de la memoria de ST-IA.**

Los resultados sugieren fuertemente que los receptores NMDA del hipocampo dorsal serían requeridos durante la consolidación de SD-IA, pero no de ST-IA, mientras que aquellos receptores conteniendo NR2B se comportarían como inhibidores durante la consolidación de la memoria de ambas tareas, al menos en las etapas tempranas.

CONCLUSIONES FINALES

Exposición previa al OF:

- Tuvo **efecto similar** sobre la expresión de **LTM** frente al desafío con drogas que actúan en **diferentes momentos**, por **mecanismos** muy diferentes, incluso administradas por **distinta vía**.
- **Previno o superó** la amnesia por:
 - **Bloqueo de RChM o RNMDA en hipocampo dorsal durante la consolidación temprana.**
 - **Bloqueo generalizado de RChM antes del entrenamiento.**
- **Promovió la formación de una traza** que podría haber estado ausente, o **facilitó la expresión/consolidación** de una traza adquirida.

Sugerimos que:

- Podría ejercer un efecto de “rescate” **durante la consolidación temprana**, al menos para la amnesia por bloqueo muscarínico.
- Dicho efecto **no dependería, -o no exclusivamente- del efecto novedad** ya que ocurrió en animales habituados al OF.

Inhibición de síntesis proteica del hipocampo dorsal:

- Desde 90 min y 120 min antes de entrenamiento en SD-IA produjo interferencia en LTM de SD-IA

Exposición previa al OF:

- Previno/recuperó de dicha amnesia, tanto cuando la inhibición fue desde antes, como después del 2do OF.
- Sugerimos que el efecto del OF
 - **no dependería de síntesis proteica** que hubiera ocurrido **durante o después del 2do OF en el hipocampo dorsal**
 - **¿podría depender de la 1ra sesión de OF?**

Corroboramos que los **RNMDA del hipocampo dorsal serían requeridos durante la consolidación de SD-IA**, pero aquellos conteniendo **NR2B** se comportarían como **inhibidores durante la consolidación temprana.**

BIBLIOGRAFÍA CITADA:

- [1]H. Maldonado, La memoria animal. Adquisición, persistencia y olvido, Buenos Aires, 2008.
- [2]I. Izquierdo, J.H. Medina, M.R. Vianna, L.A. Izquierdo, and D.M. Barros, Separate mechanisms for short- and long-term memory. *Behav Brain Res* 103 (1999) 1-11.
- [3]J. Fuster, Distributed memory for both short and long term. *Neurobiol of Learning and Memory* 70 (1998) 268-74.
- [4]E. Salmon, M. Van der Linden, F. Collette, G. Delfiore, P. Maquet, C. Degueldre, A. Luxen, and G. Franck, Regional brain activity during working memory tasks. *Brain* 119 (Pt 5) (1996) 1617-25.
- [5]P.S. Goldman-Rakic, Working memory and the mind. *Sci Am* 267 (1992) 110-7.
- [6]C.A. Barnes, Involvement of LTP in memory: are we "searching under the street light"? *Neuron* 15 (1995) 751-4.
- [7]N.S. Clayton, and A. Dickinson, Episodic-like memory during cache recovery by scrub jays. *Nature* 395 (1998) 272-4.
- [8]R.R. Hampton, Rhesus monkeys know when they remember. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (2001) 5359-62.
- [9]W.H. Thorpe, Learning and instinct in animals., Cambridge, 1956.
- [10]N.R.F. Maier, and T.C. Schneirla, Principles of animal psychology, New York, 1964.
- [11]R.M. Tarpay, Basic principles of learning., Glenview, Ill, 1975.
- [12]G.H. Bower, and E.R. Hilgard, Theories of learning (5th Ed.), New Jersey, 1981.
- [13]Y. Dudai, The neurobiology of memory. Concepts, findings, trends., New York, 1989.
- [14]K.Z. Lorenz, The foundations of ethology, New York, 1981.
- [15]C.M. Thiel, J.P. Huston, and R.K. Schwarting, Hippocampal acetylcholine and habituation learning. *Neuroscience* 85 (1998) 1253-62.
- [16]I. Izquierdo, C. da Cunha, R. Rosat, D. Jerusalinsky, M.B. Ferreira, and J.H. Medina, Neurotransmitter receptors involved in post-training memory processing by the amygdala, medial septum, and hippocampus of the rat. *Behav Neural Biol* 58 (1992) 16-26.
- [17]O.S. Vinogradova, E.S. Brazhnik, V.F. Kitchigina, and V.S. Stafekhina, Acetylcholine, theta-rhythm and activity of hippocampal neurons in the rabbit--IV. Sensory stimulation. *Neuroscience* 53 (1993) 993-1007.
- [18]I.P. Pavlov, Conditioned reflexes. An investigation of physiological activity of the cerebral cortex., London, 1927.
- [19]B.F. Skinner, The behavior of organisms., New York., 1938.
- [20]N.J. Mackintosh, Conditioning and associative learning., Oxford, 1983.
- [21]L. Cahill, and J.L. McGaugh, Mechanisms of emotional arousal and lasting declarative memory. *Trends Neurosci* 21 (1998) 294-9.
- [22]J.L. McGaugh, L. Cahill, and B. Roozendaal, Involvement of the amygdala in memory storage: interaction with other brain systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (1996) 13508-14.
- [23]I. Izquierdo, and J.H. Medina, Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol Learn Mem* 68 (1997) 285-316.
- [24]Y. Dudai, and M. Eisenberg, Rites of passage of the engram: reconsolidation and the lingering consolidation hypothesis. *Neuron* 44 (2004) 93-100.
- [25]D. Tse, R.F. Langston, M. Kakeyama, I. Bethus, P.A. Spooner, E.R. Wood, M.P. Witter, and R.G. Morris, Schemas and memory consolidation. *Science* 316 (2007) 76-82.

- [26]R.G. Morris, Elements of a neurobiological theory of hippocampal function: the role of synaptic plasticity, synaptic tagging and schemas. *Eur J Neurosci* 23 (2006) 2829-46.
- [27]C. Katche, P. Bekinschtein, L. Slipczuk, A. Goldin, I.A. Izquierdo, M. Cammarota, and J.H. Medina, Delayed wave of c-Fos expression in the dorsal hippocampus involved specifically in persistence of long-term memory storage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 349-54.
- [28]S.D. Iversen, Behavioural evaluation of cholinergic drugs. *Life Sci* 60 (1997) 1145-52.
- [29]I. Izquierdo, Different forms of post-training memory processing. *Behav Neural Biol* 51 (1989) 171-202.
- [30]S.J. Sara, Retrieval and reconsolidation: toward a neurobiology of remembering. *Learn Mem* 7 (2000) 73-84.
- [31]J.R. Misanin, R.R. Miller, and D.J. Lewis, Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a consolidated memory trace. *Science* 160 (1968) 554-5.
- [32]D.J. Lewis, N.J. Bregman, and J.J. Mahan, Jr., Cue-dependent amnesia in rats. *J Comp Physiol Psychol* 81 (1972) 243-7.
- [33]D.J. Lewis, and N.J. Bregman, Source of cues for cue-dependent amnesia in rats. *J Comp Physiol Psychol* 85 (1973) 421-6.
- [34]M.J. Robbins, and D.R. Meyer, Motivational control of retrograde amnesia. *J Exp Psychol* 84 (1970) 220-5.
- [35]C.F. Mactutus, D.C. Riccio, and J.M. Ferek, Retrograde amnesia for old (reactivated) memory: some anomalous characteristics. *Science* 204 (1979) 1319-20.
- [36]R. Richardson, D.C. Riccio, and S. Molenda, Reducing vulnerability to retrograde amnesia treatment: can new memory be deactivated? *Physiol Behav* 29 (1982) 1117-23.
- [37]M.E. Judge, and D. Quartermain, Alleviation of anisomycin-induced amnesia by pre-test treatment with lysine- vasopressin. *Pharmacol Biochem Behav* 16 (1982) 463-6.
- [38]M.M. Boccia, M.G. Blake, G.B. Acosta, and C.M. Baratti, Post-retrieval effects of icv infusions of hemicholinium in mice are dependent on the age of the original memory. *Learn Mem* 13 (2006) 376-81.
- [39]N.E. Spear, and C.W. Mueller, Consolidation as a function of retrieval. In *Memory consolidation: Psychobiology of cognition*, Hillsdale, 1984.
- [40]K. Nader, G.E. Schafe, and J.E. Le Doux, Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature* 406 (2000) 722-6.
- [41]M.H. Milekic, and C.M. Alberini, Temporally graded requirement for protein synthesis following memory reactivation. *Neuron* 36 (2002) 521-5.
- [42]M.E. Pedreira, L.M. Perez-Cuesta, and H. Maldonado, Reactivation and reconsolidation of long-term memory in the crab *Chasmagnathus*: protein synthesis requirement and mediation by NMDA-type glutamatergic receptors. *J Neurosci* 22 (2002) 8305-11.
- [43]K.M. Myers, and M. Davis, Behavioral and neural analysis of extinction. *Neuron* 36 (2002) 567-84.
- [44]I. Izquierdo, *El arte de olvidar*, Buenos Aires, 2008.
- [45]J. O'Keefe, Do hippocampal pyramidal cells signal non-spatial as well as spatial information? *Hippocampus* 9 (1999) 352-64.
- [46]W.B. Scoville, and B. Milner, Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 20 (1957) 11-21.
- [47]M.G. Packard, and J.L. McGaugh, Inactivation of hippocampus or caudate nucleus with lidocaine differentially affects expression of place and response learning. *Neurobiol Learn Mem* 65 (1996) 65-72.

- [48]T.V. Bliss, and G.L. Collingridge, A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361 (1993) 31-9.
- [49]R.G. Morris, P. Garrud, J.N. Rawlins, and J. O'Keefe, Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 297 (1982) 681-3.
- [50]D.S. Olton, Mazes, maps, and memory. *Am Psychol* 34 (1979) 583-96.
- [51]R.D. Burwell, and D.G. Amaral, Perirhinal and postrhinal cortices of the rat: interconnectivity and connections with the entorhinal cortex. *J Comp Neurol* 391 (1998) 293-321.
- [52]L.R. Squire, and S.M. Zola, Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (1996) 13515-22.
- [53]G. Paxinos, *The Rat Brain*. Eds. Paxinos G. , San Diego, 1995.
- [54]G. Paxinos, *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.*, Orlando, FL. USA, 1996.
- [55]G. Siegel, R. Wayne Albers, S. Brady, and D. Price, *Basic Neurochemistry*, 2006.
- [56]B. Milner, L.R. Squire, and E.R. Kandel, Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron* 20 (1998) 445-68.
- [57]L.R. Squire, Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychol Rev* 99 (1992) 195-231.
- [58]S.M. Zola-Morgan, and L.R. Squire, The primate hippocampal formation: evidence for a time-limited role in memory storage. *Science* 250 (1990) 288-90.
- [59]L.R. Squire, S. Zola-Morgan, and K.S. Chen, Human amnesia and animal models of amnesia: performance of amnesic patients on tests designed for the monkey. *Behav Neurosci* 102 (1988) 210-21.
- [60]C.P. Duncan, The effect of electroshock convulsions on the maze habit in the white rat. *J. Exp. Psychol.* 35 (1945) 267-278.
- [61]J.B. Flexner, L.B. Flexner, and E. Stellar, Memory in mice as affected by intracerebral puromycin. *Science* 141 (1963) 57-9.
- [62]B.W. Agranoff, R.E. Davis, and J.J. Brink, Memory fixation in the goldfish. *Proc Natl Acad Sci U S A* 54 (1965) 788-93.
- [63]S.H. Barondes, and H.D. Cohen, Puromycin effect on successive phases of memory storage. *Science* 151 (1966) 594-5.
- [64]S.H. Barondes, and H.D. Cohen, Delayed and sustained effect of acetoxycycloheximide on memory in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 58 (1967) 157-64.
- [65]J.L. McGaugh, Time-dependent processes in memory storage. *Science* 153 (1966) 1351-8.
- [66]J.L. McGaugh, Drug facilitation of learning and memory. *Annu Rev Pharmacol* 13 (1973) 229-41.
- [67]J.L. McGaugh, Dissociating learning and performance: drug and hormone enhancement of memory storage. *Brain Res Bull* 23 (1989) 339-45.
- [68]E.F. Loftus, The malleability of human memory. *Am Sci* 67 (1979) 312-20.
- [69]E.K. Warrington, and L. Weiskrantz, Amnesic syndrome: consolidation or retrieval? *Nature* 228 (1970) 628-30.
- [70]S.J. Sara, and B. Hars, In memory of consolidation. *Learn Mem* 13 (2006) 515-21.
- [71]S. Nakanishi, Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science* 258 (1992) 597-603.
- [72]S. Nakanishi, Metabotropic glutamate receptors: synaptic transmission, modulation, and plasticity. *Neuron* 13 (1994) 1031-7.
- [73]J.P. Pin, and R. Duvoisin, The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology* 34 (1995) 1-26.
- [74]P.L. Chazot, S.K. Coleman, M. Cik, and F.A. Stephenson, Molecular characterization of N-methyl-D-aspartate receptors expressed in mammalian cells yields evidence

- for the coexistence of three subunit types within a discrete receptor molecule. *J Biol Chem* 269 (1994) 24403-9.
- [75]D.J. Goebel, and M.S. Poosch, NMDA receptor subunit gene expression in the rat brain: a quantitative analysis of endogenous mRNA levels of NR1Com, NR2A, NR2B, NR2C, NR2D and NR3A. *Brain Res Mol Brain Res* 69 (1999) 164-70.
- [76]H. Sugihara, K. Moriyoshi, T. Ishii, M. Masu, and S. Nakanishi, Structures and properties of seven isoforms of the NMDA receptor generated by alternative splicing. *Biochem Biophys Res Commun* 185 (1992) 826-32.
- [77]K. Moriyoshi, M. Masu, T. Ishii, R. Shigemoto, N. Mizuno, and S. Nakanishi, Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature* 354 (1991) 31-7.
- [78]D.J. Laurie, J. Putzke, W. Zieglgansberger, P.H. Seeburg, and T.R. Tolle, The distribution of splice variants of the NMDAR1 subunit mRNA in adult rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 32 (1995) 94-108.
- [79]R. Dingledine, K. Borges, D. Bowie, and S.F. Traynelis, The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 51 (1999) 7-61.
- [80]A. Wenzel, J.M. Fritschy, H. Mohler, and D. Benke, NMDA receptor heterogeneity during postnatal development of the rat brain: differential expression of the NR2A, NR2B, and NR2C subunit proteins. *J Neurochem* 68 (1997) 469-78.
- [81]A. Wenzel, L. Scheurer, R. Kunzi, J.M. Fritschy, H. Mohler, and D. Benke, Distribution of NMDA receptor subunit proteins NR2A, 2B, 2C and 2D in rat brain. *Neuroreport* 7 (1995) 45-8.
- [82]T.C. Dumas, Developmental regulation of cognitive abilities: modified composition of a molecular switch turns on associative learning. *Prog Neurobiol* 76 (2005) 189-211.
- [83]H. Monyer, N. Burnashev, D.J. Laurie, B. Sakmann, and P.H. Seeburg, Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12 (1994) 529-40.
- [84]R.J. Clarke, and J.W. Johnson, NMDA receptor NR2 subunit dependence of the slow component of magnesium unblock. *J Neurosci* 26 (2006) 5825-34.
- [85]M.A. Henson, A.C. Roberts, K. Salimi, S. Vadlamudi, R.M. Hamer, J.H. Gilmore, L.F. Jarskog, and B.D. Philpot, Developmental regulation of the NMDA receptor subunits, NR3A and NR1, in human prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 18 (2008) 2560-73.
- [86]P. Paoletti, and J. Neyton, NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Curr Opin Pharmacol* 7 (2007) 39-47.
- [87]M.A. Henson, A.C. Roberts, I. Perez-Otano, and B.D. Philpot, Influence of the NR3A subunit on NMDA receptor functions. *Prog Neurobiol* (2010).
- [88]L. Nowak, P. Bregestovski, P. Ascher, A. Herbert, and A. Prochiantz, Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* 307 (1984) 462-5.
- [89]N.W. Kleckner, and R. Dingledine, Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Science* 241 (1988) 835-7.
- [90]F. Blandini, G. Nappi, and J.T. Greenamyre, Subthalamic infusion of an NMDA antagonist prevents basal ganglia metabolic changes and nigral degeneration in a rodent model of Parkinson's disease. *Ann Neurol* 49 (2001) 525-9.
- [91]E. Alberdi, M.V. Sanchez-Gomez, F. Cavaliere, A. Perez-Samartin, J.L. Zugaza, R. Trullas, M. Domercq, and C. Matute, Amyloid beta oligomers induce Ca²⁺ dysregulation and neuronal death through activation of ionotropic glutamate receptors. *Cell Calcium* 47 (2010) 264-72.
- [92]H. Decker, S. Jurgensen, M.F. Adrover, J. Brito-Moreira, T.R. Bomfim, W.L. Klein, A.L. Epstein, F.G. De Felice, D. Jerusalinsky, and S.T. Ferreira, N-Methyl-d-

- aspartate receptors are required for synaptic targeting of Alzheimer's toxic amyloid-beta peptide oligomers. *J Neurochem* (2010).
- [93]I. Goussakov, M.B. Miller, and G.E. Stutzmann, NMDA-mediated Ca(2+) influx drives aberrant ryanodine receptor activation in dendrites of young Alzheimer's disease mice. *J Neurosci* 30 (2010) 12128-37.
- [94]T. Ondrejcek, I. Klyubin, N.W. Hu, A.E. Barry, W.K. Cullen, and M.J. Rowan, Alzheimer's disease amyloid beta-protein and synaptic function. *Neuromolecular Med* 12 (2010) 13-26.
- [95]F. Li, and J.Z. Tsien, Memory and the NMDA receptors. *N Engl J Med* 361 (2009) 302-3.
- [96]T.W. Lai, W.C. Shyu, and Y.T. Wang, Stroke intervention pathways: NMDA receptors and beyond. *Trends Mol Med* (2010).
- [97]F. Menniti, B. Chenard, M. Collins, M. Ducat, I. Shalaby, and F. White, CP-101,606, a potent neuroprotectant selective for forebrain neurons. *Eur J Pharmacol* 331 (1997) 117-26.
- [98]T.M. Tzschentke, Glutamatergic mechanisms in different disease states: overview and therapeutical implications -- an introduction. *Amino Acids* 23 (2002) 147-52.
- [99]S. Boyce, A. Wyatt, J.K. Webb, R. O'Donnell, G. Mason, M. Rigby, D. Sirinathsinghji, R.G. Hill, and N.M. Rupniak, Selective NMDA NR2B antagonists induce antinociception without motor dysfunction: correlation with restricted localisation of NR2B subunit in dorsal horn. *Neuropharmacology* 38 (1999) 611-23.
- [100]C.G. Parsons, NMDA receptors as targets for drug action in neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 429 (2001) 71-8.
- [101]R.C. Malenka, D.V. Madison, and R.A. Nicoll, Potentiation of synaptic transmission in the hippocampus by phorbol esters. *Nature* 321 (1986) 175-7.
- [102]R. Malinow, H. Schulman, and R.W. Tsien, Inhibition of postsynaptic PKC or CaMKII blocks induction but not expression of LTP. *Science* 245 (1989) 862-6.
- [103]J. Lisman, R.C. Malenka, R.A. Nicoll, and R. Malinow, Learning mechanisms: the case for CaM-KII. *Science* 276 (1997) 2001-2.
- [104]R. Malinow, and R.C. Malenka, AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 25 (2002) 103-26.
- [105]A.V. Dovgan, V.P. Cherkas, A.R. Stepanyuk, D.J. Fitzgerald, L.P. Haynes, A.V. Tepikin, R.D. Burgoyne, and P.V. Belan, Decoding glutamate receptor activation by the Ca2+ sensor protein hippocalcin in rat hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 32 (2010) 347-58.
- [106]J. Wickens, Electrically coupled but chemically isolated synapses: dendritic spines and calcium in a rule for synaptic modification. *Prog Neurobiol* 31 (1988) 507-28.
- [107]J.A. Cummings, R.M. Mulkey, R.A. Nicoll, and R.C. Malenka, Ca2+ signaling requirements for long-term depression in the hippocampus. *Neuron* 16 (1996) 825-33.
- [108]S.N. Yang, Y.G. Tang, and R.S. Zucker, Selective induction of LTP and LTD by postsynaptic [Ca2+]i elevation. *J Neurophysiol* 81 (1999) 781-7.
- [109]H.W. Ko, K.Y. Park, H. Kim, P.L. Han, Y.U. Kim, B.J. Gwag, and E.J. Choi, Ca2+-mediated activation of c-Jun N-terminal kinase and nuclear factor kappa B by NMDA in cortical cell cultures. *J Neurochem* 71 (1998) 1390-5.
- [110]G.L. Collingridge, and T.V. Bliss, Memories of NMDA receptors and LTP. *Trends Neurosci* 18 (1995) 54-6.
- [111]E.R. Kandel, and C. Pittenger, The past, the future and the biology of memory storage. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354 (1999) 2027-52.
- [112]M. Cammarota, L.R. Bevilacqua, P. Ardenghi, G. Paratcha, M. Levi de Stein, I. Izquierdo, and J.H. Medina, Learning-associated activation of nuclear MAPK,

- CREB and Elk-1, along with Fos production, in the rat hippocampus after a one-trial avoidance learning: abolition by NMDA receptor blockade. *Brain Res Mol Brain Res* 76 (2000) 36-46.
- [113]R.G. Morris, E.I. Moser, G. Riedel, S.J. Martin, J. Sandin, M. Day, and C. O'Carroll, Elements of a neurobiological theory of the hippocampus: the role of activity-dependent synaptic plasticity in memory. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358 (2003) 773-86.
- [114]D. Jerusalinsky, M.B. Ferreira, R. Walz, R.C. Da Silva, M. Bianchin, A.C. Ruschel, M.S. Zanatta, J.H. Medina, and I. Izquierdo, Amnesia by post-training infusion of glutamate receptor antagonists into the amygdala, hippocampus, and entorhinal cortex. *Behav Neural Biol* 58 (1992) 76-80.
- [115]R.G. Morris, E. Anderson, G.S. Lynch, and M. Baudry, Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* 319 (1986) 774-6.
- [116]G. Riedel, B. Platt, and J. Micheau, Glutamate receptor function in learning and memory. *Behav Brain Res* 140 (2003) 1-47.
- [117]I. Izquierdo, and J.H. Medina, Correlation between the pharmacology of long-term potentiation and the pharmacology of memory. *Neurobiol Learn Mem* 63 (1995) 19-32.
- [118]J.Z. Tsien, D.F. Chen, D. Gerber, C. Tom, E.H. Mercer, D.J. Anderson, M. Mayford, E.R. Kandel, and S. Tonegawa, Subregion- and cell type-restricted gene knockout in mouse brain. *Cell* 87 (1996) 1317-26.
- [119]J.Z. Tsien, P.T. Huerta, and S. Tonegawa, The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell* 87 (1996) 1327-38.
- [120]V.T. Cheli, M.F. Adrover, C. Blanco, E. Rial Verde, V. Guyot-Revol, R. Vidal, E. Martin, L. Alche, G. Sanchez, M. Acerbo, A.L. Epstein, and D. Jerusalinsky, Gene transfer of NMDAR1 subunit sequences to the rat CNS using herpes simplex virus vectors interfered with habituation. *Cell Mol Neurobiol* 22 (2002) 303-14.
- [121]M.F. Adrover, V. Guyot-Revol, V.T. Cheli, C. Blanco, R. Vidal, L. Alche, E. Kornisiuk, A.L. Epstein, and D. Jerusalinsky, Hippocampal infection with HSV-1-derived vectors expressing an NMDAR1 antisense modifies behavior. *Genes Brain Behav* 2 (2003) 103-13.
- [122]V. Cheli, M. Adrover, C. Blanco, C. Ferrari, A. Cornea, F. Pitossi, A.L. Epstein, and D. Jerusalinsky, Knocking-down the NMDAR1 subunit in a limited amount of neurons in the rat hippocampus impairs learning. *J Neurochem* 97 Suppl 1 (2006) 68-73.
- [123]J.I. Rossato, J.S. Bonini, A.S. Coitinho, M.R. Vianna, J.H. Medina, M. Cammarota, and I. Izquierdo, Retrograde amnesia induced by drugs acting on different molecular systems. *Behav Neurosci* 118 (2004) 563-8.
- [124]Y. Kiyama, T. Manabe, K. Sakimura, F. Kawakami, H. Mori, and M. Mishina, Increased thresholds for long-term potentiation and contextual learning in mice lacking the NMDA-type glutamate receptor epsilon1 subunit. *J Neurosci* 18 (1998) 6704-12.
- [125]Y.P. Auberson, H. Allgeier, S. Bischoff, K. Lingenhoehl, R. Moretti, and M. Schmutz, 5-Phosphonomethylquinoxalinediones as competitive NMDA receptor antagonists with a preference for the human 1A/2A, rather than 1A/2B receptor composition. *Bioorg Med Chem Lett* 12 (2002) 1099-102.
- [126]L. Liu, T.P. Wong, M.F. Pozza, K. Lingenhoehl, Y. Wang, M. Sheng, Y.P. Auberson, and Y.T. Wang, Role of NMDA receptor subtypes in governing the direction of hippocampal synaptic plasticity. *Science* 304 (2004) 1021-4.

- [127]P.V. Massey, B.E. Johnson, P.R. Moulton, Y.P. Auberson, M.W. Brown, E. Molnar, G.L. Collingridge, and Z.I. Bashir, Differential roles of NR2A and NR2B-containing NMDA receptors in cortical long-term potentiation and long-term depression. *J Neurosci* 24 (2004) 7821-8.
- [128]G.A. Higgins, T.M. Ballard, J. Huwyler, J.A. Kemp, and R. Gill, Evaluation of the NR2B-selective NMDA receptor antagonist Ro 63-1908 on rodent behaviour: evidence for an involvement of NR2B NMDA receptors in response inhibition. *Neuropharmacology* 44 (2003) 324-41.
- [129]G.A. Higgins, T.M. Ballard, M. Enderlin, M. Haman, and J.A. Kemp, Evidence for improved performance in cognitive tasks following selective NR2B NMDA receptor antagonist pre-treatment in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 179 (2005) 85-98.
- [130]M.R. Guscott, H.F. Clarke, F. Murray, S. Grimwood, L.J. Bristow, and P.H. Hutson, The effect of (+/-)-CP-101,606, an NMDA receptor NR2B subunit selective antagonist, in the Morris watermaze. *Eur J Pharmacol* 476 (2003) 193-9.
- [131]N.T. Agnihotri, R.D. Hawkins, E.R. Kandel, and C. Kentros, The long-term stability of new hippocampal place fields requires new protein synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (2004) 3656-61.
- [132]Y.P. Tang, E. Shimizu, G.R. Dube, C. Rampon, G.A. Kerchner, M. Zhuo, G. Liu, and J.Z. Tsien, Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature* 401 (1999) 63-9.
- [133]T.L. White, and S.L. Youngentob, The effect of NMDA-NR2B receptor subunit over-expression on olfactory memory task performance in the mouse. *Brain Res* 1021 (2004) 1-7.
- [134]D. Wang, Z. Cui, Q. Zeng, H. Kuang, L.P. Wang, J.Z. Tsien, and X. Cao, Genetic enhancement of memory and long-term potentiation but not CA1 long-term depression in NR2B transgenic rats. *PLoS One* 4 (2009) e7486.
- [135]J.Q. Wang, A. Arora, L. Yang, N.K. Parelkar, G. Zhang, X. Liu, E.S. Choe, and L. Mao, Phosphorylation of AMPA receptors: mechanisms and synaptic plasticity. *Mol Neurobiol* 32 (2005) 237-49.
- [136]S. Royer, and D. Pare, Conservation of total synaptic weight through balanced synaptic depression and potentiation. *Nature* 422 (2003) 518-22.
- [137]M.J. Kim, A.W. Dunah, Y.T. Wang, and M. Sheng, Differential roles of NR2A- and NR2B-containing NMDA receptors in Ras-ERK signaling and AMPA receptor trafficking. *Neuron* 46 (2005) 745-60.
- [138]Y. Hayashi, S.H. Shi, J.A. Esteban, A. Piccini, J.C. Poncer, and R. Malinow, Driving AMPA receptors into synapses by LTP and CaMKII: requirement for GluR1 and PDZ domain interaction. *Science* 287 (2000) 2262-7.
- [139]J.J. Zhu, Y. Qin, M. Zhao, L. Van Aelst, and R. Malinow, Ras and Rap control AMPA receptor trafficking during synaptic plasticity. *Cell* 110 (2002) 443-55.
- [140]M.L. Escobar, and B. Derrick, Long-Term Potentiation and Depression as Putative Mechanisms for Memory. (2007).
- [141]T.V. Bliss, and T. Lomo, Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 232 (1973) 331-56.
- [142]E. Hanse, and B. Gustafsson, Postsynaptic, but not presynaptic, activity controls the early time course of long-term potentiation in the dentate gyrus. *J Neurosci* 12 (1992) 3226-40.
- [143]N.N. Urban, and G. Barrionuevo, Induction of hebbian and non-hebbian mossy fiber long-term potentiation by distinct patterns of high-frequency stimulation. *J Neurosci* 16 (1996) 4293-9.

- [144]Y.Y. Huang, C. Pittenger, and E.R. Kandel, A form of long-lasting, learning-related synaptic plasticity in the hippocampus induced by heterosynaptic low-frequency pairing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (2004) 859-64.
- [145]C.O. Martinez, V.H. Do, J.L. Martinez, Jr., and B.E. Derrick, Associative long-term potentiation (LTP) among extrinsic afferents of the hippocampal CA3 region in vivo. *Brain Res* 940 (2002) 86-94.
- [146]J.F. MacDonald, M.F. Jackson, and M.A. Beazely, Hippocampal long-term synaptic plasticity and signal amplification of NMDA receptors. *Crit Rev Neurobiol* 18 (2006) 71-84.
- [147]D.S. Bredt, and R.A. Nicoll, AMPA receptor trafficking at excitatory synapses. *Neuron* 40 (2003) 361-79.
- [148]D. Fernandez de Sevilla, and W. Buno, The muscarinic long-term enhancement of NMDA and AMPA receptor-mediated transmission at Schaffer collateral synapses develop through different intracellular mechanisms. *J Neurosci* 30 (2010) 11032-42.
- [149]R.C. Malenka, and M.F. Bear, LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* 44 (2004) 5-21.
- [150]M.T. Kelly, J.F. Crary, and T.C. Sacktor, Regulation of protein kinase Mzeta synthesis by multiple kinases in long-term potentiation. *J Neurosci* 27 (2007) 3439-44.
- [151]D.A. Fortin, M.A. Davare, T. Srivastava, J.D. Brady, S. Nygaard, V.A. Derkach, and T.R. Soderling, Long-term potentiation-dependent spine enlargement requires synaptic Ca²⁺-permeable AMPA receptors recruited by CaM-kinase I. *J Neurosci* 30 (2010) 11565-75.
- [152]R. Malinow, D.V. Madison, and R.W. Tsien, Persistent protein kinase activity underlying long-term potentiation. *Nature* 335 (1988) 820-4.
- [153]S.G. Grant, T.J. O'Dell, K.A. Karl, P.L. Stein, P. Soriano, and E.R. Kandel, Impaired long-term potentiation, spatial learning, and hippocampal development in *fyn* mutant mice. *Science* 258 (1992) 1903-10.
- [154]T.J. O'Dell, E.R. Kandel, and S.G. Grant, Long-term potentiation in the hippocampus is blocked by tyrosine kinase inhibitors. *Nature* 353 (1991) 558-60.
- [155]A.J. McDonald, and F. Mascagni, Neuronal localization of m1 muscarinic receptor immunoreactivity in the rat basolateral amygdala. *Brain Struct Funct* 215 (2010) 37-48.
- [156]Y. Goda, and C.F. Stevens, Long-term depression properties in a simple system. *Neuron* 16 (1996) 103-11.
- [157]D.E. Feldman, Synaptic mechanisms for plasticity in neocortex. *Annu Rev Neurosci* 32 (2009) 33-55.
- [158]T. Sigurdsson, V. Doyere, C.K. Cain, and J.E. LeDoux, Long-term potentiation in the amygdala: a cellular mechanism of fear learning and memory. *Neuropharmacology* 52 (2007) 215-27.
- [159]T. Nakano, T. Doi, J. Yoshimoto, and K. Doya, A kinetic model of dopamine- and calcium-dependent striatal synaptic plasticity. *PLoS Comput Biol* 6 (2010) e1000670.
- [160]J. O'Keefe, and J. Dostrovsky, The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res* 34 (1971) 171-5.
- [161]S.N. Moses, R.J. Sutherland, and R.J. McDonald, Differential involvement of amygdala and hippocampus in responding to novel objects and contexts. *Brain Res Bull* 58 (2002) 517-27.
- [162]R.T. Knight, and T. Nakada, Cortico-limbic circuits and novelty: a review of EEG and blood flow data. *Rev Neurosci* 9 (1998) 57-70.

- [163]E. Tulving, and H.J. Markowitsch, Episodic and declarative memory: role of the hippocampus. *Hippocampus* 8 (1998) 198-204.
- [164]J.E. Lisman, and N.A. Otmakhova, Storage, recall, and novelty detection of sequences by the hippocampus: elaborating on the SOCRATIC model to account for normal and aberrant effects of dopamine. *Hippocampus* 11 (2001) 551-68.
- [165]S. Li, W.K. Cullen, R. Anwyl, and M.J. Rowan, Dopamine-dependent facilitation of LTP induction in hippocampal CA1 by exposure to spatial novelty. *Nat Neurosci* 6 (2003) 526-31.
- [166]L. Xu, R. Anwyl, and M.J. Rowan, Spatial exploration induces a persistent reversal of long-term potentiation in rat hippocampus. *Nature* 394 (1998) 891-4.
- [167]D. Manahan-Vaughan, and K.H. Braunewell, Novelty acquisition is associated with induction of hippocampal long-term depression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (1999) 8739-44.
- [168]W.C. Abraham, B. Logan, J.M. Greenwood, and M. Dragunow, Induction and experience-dependent consolidation of stable long-term potentiation lasting months in the hippocampus. *J Neurosci* 22 (2002) 9626-34.
- [169]C.A. Netto, R.D. Dias, and I. Izquierdo, Interaction between consecutive learnings: inhibitory avoidance and habituation. *Behav Neural Biol* 44 (1985) 515-20.
- [170]D. Moncada, and H. Viola, Induction of long-term memory by exposure to novelty requires protein synthesis: evidence for a behavioral tagging. *J Neurosci* 27 (2007) 7476-81.
- [171]L.A. Izquierdo, H. Viola, D.M. Barros, M. Alonso, M.R. Vianna, M. Furman, M. Levi de Stein, G. Szapiro, C. Rodrigues, H. Choi, J.H. Medina, and I. Izquierdo, Novelty enhances retrieval: molecular mechanisms involved in rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 13 (2001) 1464-7.
- [172]H. Motanis, and M. Maroun, Exposure to a novel context following contextual fear conditioning enhances the induction of hippocampal long-term potentiation. *Eur J Neurosci* 32 (2010) 840-6.
- [173]R. Roesler, M.R. Vianna, F. De-Paris, J. Quevedo, R. Walz, and M. Bianchin, Infusions of AP5 into the basolateral amygdala impair the formation, but not the expression, of step-down inhibitory avoidance. *Braz J Med Biol Res* 33 (2000) 829-34.
- [174]K.C. Liang, W. Hon, and M. Davis, Pre- and posttraining infusion of N-methyl-D-aspartate receptor antagonists into the amygdala impair memory in an inhibitory avoidance task. *Behav Neurosci* 108 (1994) 241-53.
- [175]I. Izquierdo, N. Schroder, C.A. Netto, and J.H. Medina, Novelty causes time-dependent retrograde amnesia for one-trial avoidance in rats through NMDA receptor- and CaMKII-dependent mechanisms in the hippocampus. *Eur J Neurosci* 11 (1999) 3323-8.
- [176]C. Wolfman, L.A. Izquierdo, N. Schroder, and I. Izquierdo, Intra-hippocampal KN-62 hinders the memory of habituation acquired alone, but not simultaneously with a water-finding task. *Behav Pharmacol* 10 (1999) 99-104.
- [177]U. Frey, and R.G. Morris, Synaptic tagging: implications for late maintenance of hippocampal long-term potentiation. *Trends Neurosci* 21 (1998) 181-8.
- [178]R.T. Bartus, C. Flicker, R.L. Dean, M. Pontecorvo, J.C. Figueiredo, and S.K. Fisher, Selective memory loss following nucleus basalis lesions: long term behavioral recovery despite persistent cholinergic deficiencies. *Pharmacol Biochem Behav* 23 (1985) 125-35.
- [179]B. Meyers, and E.F. Domino, The Effect of Cholinergic Blocking Drugs on Spontaneous Alternation in Rats. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 150 (1964) 525-9.

- [180]B. Meyers, K.H. Roberts, R.H. Riciputi, and E.F. Domino, Some Effects of Muscarinic Cholinergic Blocking Drugs on Behavior and the Electrooculogram. *Psychopharmacologia* 5 (1964) 289-300.
- [181]K.A. Khavari, and R.W. Russell, Acquisition, retention, and extinction under conditions of water deprivation and of central cholinergic stimulation. *J Comp Physiol Psychol* 61 (1966) 339-45.
- [182]S.L. Dilts, Berry CA: Effect of cholinergic drugs on passive avoidance in the mouse. *J Pharmacol Exp Ther* 158 (1967) 279-85.
- [183]I.B. Introini-Collison, and C.M. Baratti, Memory-modulatory effects of centrally acting noradrenergic drugs: possible involvement of brain cholinergic mechanisms. *Behav Neural Biol* 57 (1992) 248-55.
- [184]P. Davies, and A.J. Maloney, Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet* 2 (1976) 1403.
- [185]E.C. Hulme, N.J. Birdsall, and N.J. Buckley, Muscarinic receptor subtypes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 30 (1990) 633-73.
- [186]E.G. Peralta, A. Ashkenazi, J.W. Winslow, J. Ramachandran, and D.J. Capon, Differential regulation of PI hydrolysis and adenylyl cyclase by muscarinic receptor subtypes. *Nature* 334 (1988) 434-7.
- [187]R. Hammer, Muscarinic receptors in the stomach. *Scand J Gastroenterol Suppl* 66 (1980) 5-11.
- [188]K. Kashiwara, E.V. Varga, S.L. Waite, W.R. Roeske, and H.I. Yamamura, Cloning of the rat M3, M4 and M5 muscarinic acetylcholine receptor genes by the polymerase chain reaction (PCR) and the pharmacological characterization of the expressed genes. *Life Sci* 51 (1992) 955-71.
- [189]Z.B. Huang, H. Wang, X.R. Rao, G.F. Zhong, W.H. Hu, and G.Q. Sheng, Different effects of scopolamine on the retrieval of spatial memory and fear memory. *Behav Brain Res* (2010).
- [190]A. Figenschou, G.Y. Hu, and J.F. Storm, Cholinergic modulation of the action potential in rat hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 8 (1996) 211-9.
- [191]P.T. Huerta, and J.E. Lisman, Bidirectional synaptic plasticity induced by a single burst during cholinergic theta oscillation in CA1 in vitro. *Neuron* 15 (1995) 1053-63.
- [192]J.M. Auerbach, and M. Segal, A novel cholinergic induction of long-term potentiation in rat hippocampus. *J Neurophysiol* 72 (1994) 2034-40.
- [193]L.M. Savage, J. Roland, and A. Klintsova, Selective septohippocampal - but not forebrain amygdalar - cholinergic dysfunction in diencephalic amnesia. *Brain Res* 1139 (2007) 210-9.
- [194]A. Easton, A.E. Fitchett, M.J. Eacott, and M.G. Baxter, Medial septal cholinergic neurons are necessary for context-place memory but not episodic-like memory. *Hippocampus* (2010).
- [195]S.R. Cobb, and C.H. Davies, Cholinergic modulation of hippocampal cells and circuits. *J Physiol* 562 (2005) 81-8.
- [196]S. Maren, J.P. DeCola, R.A. Swain, M.S. Fanselow, and R.F. Thompson, Parallel augmentation of hippocampal long-term potentiation, theta rhythm, and contextual fear conditioning in water-deprived rats. *Behav Neurosci* 108 (1994) 44-56.
- [197]C.H. Vanderwolf, and T.E. Robinson, Reticulo-cortical activity and behavior: A critique of the arousal theory and a new synthesis. *Behavioral and Brain Sciences* 1981 (1981) 459-76.
- [198]C.M. Baratti, and S.R. Kopf, The post-training memory enhancement induced by physostigmine and oxotremorine in mice is not state-dependent. *Neurobiol Learn Mem* 65 (1996) 121-4.

- [199]C.M. Baratti, P. Huygens, J. Mino, A. Merlo, and J. Gardella, Memory facilitation with posttrial injection of oxotremorine and physostigmine in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 64 (1979) 85-8.
- [200]R. Rosat, R.C. Da-Silva, M.S. Zanatta, J.H. Medina, and I. Izquierdo, Memory consolidation of a habituation task: role of N-methyl-D-aspartate, cholinergic muscarinic and GABA-A receptors in different brain regions. *Braz J Med Biol Res* 25 (1992) 267-73.
- [201]J.D. Brioni, and I. Izquierdo, Retention enhancement by pre-test beta-endorphin and oxotremorine and its reversal by scopolamine. *Behav Neural Biol* 50 (1988) 251-4.
- [202]E.A. van der Zee, and P.G. Luiten, Muscarinic acetylcholine receptors in the hippocampus, neocortex and amygdala: a review of immunocytochemical localization in relation to learning and memory. *Prog Neurobiol* 58 (1999) 409-71.
- [203]C.M. Baratti, J.W. Opezzo, and S.R. Kopf, Facilitation of memory storage by the acetylcholine M2 muscarinic receptor antagonist AF-DX 116. *Behav Neural Biol* 60 (1993) 69-74.
- [204]N. González, M.V. Oberholzer, F. Urbano, D. Servent, D. Jerusalinky, and E. Kornisiuk, M1 muscarinic receptor involvement in LTP induction in CA1 synapses of rat hippocampus., II RCN Huerta Grande, Cordoba. Argentina 2010.
- [205]A.R. Ferreira, L. Furstenau, C. Blanco, E. Kornisiuk, G. Sanchez, D. Daroit, M. Castro e Silva, C. Cervenansky, D. Jerusalinsky, and J.A. Quillfeldt, Role of hippocampal M1 and M4 muscarinic receptor subtypes in memory consolidation in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 74 (2003) 411-5.
- [206]M.V. Oberholzer, E. Kornisiuk, F. Urbano, D. Servent, C. Cerveñansky, and D. Jerusalinky, Muscarinic M1 modulation on basal neurotransmission in CA1 region of rat hippocampus., II RCN, Huerta Grande, Cordoba. Argentina., 2010.
- [207]G. Sanchez, O. Alvarez Lde, M.V. Oberholzer, B. Genro, J. Quillfeldt, J.C. da Costa, C. Cervenansky, D. Jerusalinsky, and E. Kornisiuk, M4 muscarinic receptors are involved in modulation of neurotransmission at synapses of Schaffer collaterals on CA1 hippocampal neurons in rats. *J Neurosci Res* 87 (2009) 691-700.
- [208]A. Ortega, M.A. del Guante, R.A. Prado-Alcala, and V. Aleman, Changes in rat brain muscarinic receptors after inhibitory avoidance learning. *Life Sci* 58 (1996) 799-809.
- [209]D. Fernandez de Sevilla, and W. Buno, Presynaptic inhibition of Schaffer collateral synapses by stimulation of hippocampal cholinergic afferent fibres. *Eur J Neurosci* 17 (2003) 555-8.
- [210]F. Kimura, and R.W. Baughman, Distinct muscarinic receptor subtypes suppress excitatory and inhibitory synaptic responses in cortical neurons. *J Neurophysiol* 77 (1997) 709-16.
- [211]J. Hounsgaard, Presynaptic inhibitory action of acetylcholine in area CA1 of the hippocampus. *Exp Neurol* 62 (1978) 787-97.
- [212]R.J. Valentino, and R. Dingleline, Presynaptic inhibitory effect of acetylcholine in the hippocampus. *J Neurosci* 1 (1981) 784-92.
- [213]P. Dutar, and R.A. Nicoll, Classification of muscarinic responses in hippocampus in terms of receptor subtypes and second-messenger systems: electrophysiological studies in vitro. *J Neurosci* 8 (1988) 4214-24.
- [214]R.D. Sheridan, and B. Sutor, Presynaptic M1 muscarinic cholinceptors mediate inhibition of excitatory synaptic transmission in the hippocampus in vitro. *Neurosci Lett* 108 (1990) 273-8.
- [215]T. Kremin, D. Gerber, L.M. Giocomo, S.Y. Huang, S. Tonegawa, and M.E. Hasselmo, Muscarinic suppression in stratum radiatum of CA1 shows dependence

- on presynaptic M1 receptors and is not dependent on effects at GABA(B) receptors. *Neurobiol Learn Mem* 85 (2006) 153-63.
- [216]M. Yamasaki, M. Matsui, and M. Watanabe, Preferential localization of muscarinic M1 receptor on dendritic shaft and spine of cortical pyramidal cells and its anatomical evidence for volume transmission. *J Neurosci* 30 (2010) 4408-18.
- [217]S.T. Rouse, M.J. Marino, L.T. Potter, P.J. Conn, and A.I. Levey, Muscarinic receptor subtypes involved in hippocampal circuits. *Life Sci* 64 (1999) 501-9.
- [218]S. Li, W.K. Cullen, R. Anwyl, and M.J. Rowan, Muscarinic acetylcholine receptor-dependent induction of persistent synaptic enhancement in rat hippocampus in vivo. *Neuroscience* 144 (2007) 754-61.
- [219]M. Ohno, and S. Watanabe, Interactive processing between glutamatergic and cholinergic systems involved in inhibitory avoidance learning of rats. *Eur J Pharmacol* 312 (1996) 145-7.
- [220]R.J. Fishkin, E.S. Ince, W.A. Carlezon, Jr., and R.W. Dunn, D-cycloserine attenuates scopolamine-induced learning and memory deficits in rats. *Behav Neural Biol* 59 (1993) 150-7.
- [221]H. Markram, and M. Segal, Long-lasting facilitation of excitatory postsynaptic potentials in the rat hippocampus by acetylcholine. *J Physiol* 427 (1990) 381-93.
- [222]T.G. Aigner, Pharmacology of memory: cholinergic-glutamatergic interactions. *Curr Opin Neurobiol* 5 (1995) 155-60.
- [223]M. Frotscher, and C. Leranth, Cholinergic innervation of the rat hippocampus as revealed by choline acetyltransferase immunocytochemistry: a combined light and electron microscopic study. *J Comp Neurol* 239 (1985) 237-46.
- [224]J. Harvey, R. Balasubramaniam, and G.L. Collingridge, Carbachol can potentiate N-methyl-D-aspartate responses in the rat hippocampus by a staurosporine and thapsigargin-insensitive mechanism. *Neurosci Lett* 162 (1993) 165-8.
- [225]J.M. Auerbach, and M. Segal, Muscarinic receptors mediating depression and long-term potentiation in rat hippocampus. *J Physiol* 492 (Pt 2) (1996) 479-93.
- [226]M.J. Marino, S.T. Rouse, A.I. Levey, L.T. Potter, and P.J. Conn, Activation of the genetically defined m1 muscarinic receptor potentiates N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor currents in hippocampal pyramidal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998) 11465-70.
- [227]D. Fernandez de Sevilla, A. Nunez, M. Borde, R. Malinow, and W. Buno, Cholinergic-mediated IP3-receptor activation induces long-lasting synaptic enhancement in CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* 28 (2008) 1469-78.
- [228]R. Guttman, I. Lieblich, and R. Gross, Behavioral correlates of estrous cycle stages in laboratory mice. *Behav Biol* 13 (1975) 127-32.
- [229]J. Hyde, and T.F. Sawyer, Estrous cycle fluctuations in aggressiveness of house mice. *Horm Behav* 9 (1977) 290-5.
- [230]M.B. Kristal, S. Axelrod, and M. Noonan, Learning in escape/avoidance tasks in female rats does not vary with reproductive condition. *Physiol Behav* 21 (1978) 251-6.
- [231]S.A. Farr, J.F. Flood, J.F. Scherrer, F.E. Kaiser, G.T. Taylor, and J.E. Morley, Effect of ovarian steroids on footshock avoidance learning and retention in female mice. *Physiol Behav* 58 (1995) 715-23.
- [232]R.M. Deacon, Housing, husbandry and handling of rodents for behavioral experiments. *Nat Protoc* 1 (2006) 936-46.
- [233]D.A. Brown, and P.R. Adams, Muscarinic suppression of a novel voltage-sensitive K⁺ current in a vertebrate neurone. *Nature* 283 (1980) 673-6.
- [234]J. Stewart, and B. Kolb, Dendritic branching in cortical pyramidal cells in response to ovariectomy in adult female rats: suppression by neonatal exposure to testosterone. *Brain Res* 654 (1994) 149-54.

- [235]D.D. Murphy, and M. Segal, Regulation of dendritic spine density in cultured rat hippocampal neurons by steroid hormones. *J Neurosci* 16 (1996) 4059-68.
- [236]C.S. Woolley, Estrogen-mediated structural and functional synaptic plasticity in the female rat hippocampus. *Horm Behav* 34 (1998) 140-8.
- [237]N.G. Weiland, Estradiol selectively regulates agonist binding sites on the N-methyl-D-aspartate receptor complex in the CA1 region of the hippocampus. *Endocrinology* 131 (1992) 662-8.
- [238]D.A. Cordoba Montoya, and H.F. Carrer, Estrogen facilitates induction of long term potentiation in the hippocampus of awake rats. *Brain Res* 778 (1997) 430-8.
- [239]V.N. Luine, S.T. Richards, V.Y. Wu, and K.D. Beck, Estradiol enhances learning and memory in a spatial memory task and effects levels of monoaminergic neurotransmitters. *Horm Behav* 34 (1998) 149-62.
- [240]R.B. Gibbs, Effects of gonadal hormone replacement on measures of basal forebrain cholinergic function. *Neuroscience* 101 (2000) 931-8.
- [241]M. Good, M. Day, and J.L. Muir, Cyclical changes in endogenous levels of oestrogen modulate the induction of LTD and LTP in the hippocampal CA1 region. *Eur J Neurosci* 11 (1999) 4476-80.
- [242]N.L. Desmond, D.X. Zhang, and W.B. Levy, Estradiol enhances the induction of homosynaptic long-term depression in the CA1 region of the adult, ovariectomized rat. *Neurobiol Learn Mem* 73 (2000) 180-7.
- [243]N.M. White, and R.J. McDonald, Multiple parallel memory systems in the brain of the rat. *Neurobiol Learn Mem* 77 (2002) 125-84.
- [244]B. Rucker, G.S. Pereira, C.R. Furstenu, I. Izquierdo, C.D. Bonan, and J.J. Sarkis, Inhibitory avoidance task reveals differences in ectonucleotidase activities between male and female rats. *Neurochem Res* 29 (2004) 2231-7.
- [245]V.N. Luine, Steroid Hormone Modulation of Hippocampal Dependent Spatial Memory. *Stress* 2 (1997) 21-36.
- [246]M.F. O'Neal, L.W. Means, M.C. Poole, and R.J. Hamm, Estrogen affects performance of ovariectomized rats in a two-choice water-escape working memory task. *Psychoneuroendocrinology* 21 (1996) 51-65.
- [247]S.J. Duff, and E. Hampson, A beneficial effect of estrogen on working memory in postmenopausal women taking hormone replacement therapy. *Horm Behav* 38 (2000) 262-76.
- [248]D.L. Korol, and L.L. Kolo, Estrogen-induced changes in place and response learning in young adult female rats. *Behav Neurosci* 116 (2002) 411-20.
- [249]M.G. Packard, and L.A. Teather, Intra-hippocampal estradiol infusion enhances memory in ovariectomized rats. *Neuroreport* 8 (1997) 3009-13.
- [250]V. Luine, and M. Rodriguez, Effects of estradiol on radial arm maze performance of young and aged rats. *Behav Neural Biol* 62 (1994) 230-6.
- [251]C.A. Frye, Estrus-associated decrements in a water maze task are limited to acquisition. *Physiol Behav* 57 (1995) 5-14.
- [252]L.A. Galea, M. Kavaliers, K.P. Ossenkopp, and E. Hampson, Gonadal hormone levels and spatial learning performance in the Morris water maze in male and female meadow voles, *Microtus pennsylvanicus*. *Horm Behav* 29 (1995) 106-25.
- [253]S.G. Warren, and J.M. Juraska, Spatial and nonspatial learning across the rat estrous cycle. *Behav Neurosci* 111 (1997) 259-66.
- [254]A.J. Fader, A.W. Hendricson, and G.P. Dohanich, Estrogen improves performance of reinforced T-maze alternation and prevents the amnesic effects of scopolamine administered systemically or intrahippocampally. *Neurobiol Learn Mem* 69 (1998) 225-40.

- [255]R.B. Gibbs, A.M. Burke, and D.A. Johnson, Estrogen replacement attenuates effects of scopolamine and lorazepam on memory acquisition and retention. *Horm Behav* 34 (1998) 112-25.
- [256]S.G. Warren, A.G. Humphreys, J.M. Juraska, and W.T. Greenough, LTP varies across the estrous cycle: enhanced synaptic plasticity in proestrus rats. *Brain Res* 703 (1995) 26-30.
- [257]G. Diaz-Veliz, F. Urresta, N. Dussaubat, and S. Mora, Effects of estradiol replacement in ovariectomized rats on conditioned avoidance responses and other behaviors. *Physiol Behav* 50 (1991) 61-5.
- [258]B.S. McEwen, S.E. Alves, K. Bulloch, and N.G. Weiland, Ovarian steroids and the brain: implications for cognition and aging. *Neurology* 48 (1997) S8-15.
- [259]M. Wong, and R.L. Moss, Long-term and short-term electrophysiological effects of estrogen on the synaptic properties of hippocampal CA1 neurons. *J Neurosci* 12 (1992) 3217-25.
- [260]M.R. Foy, J. Xu, X. Xie, R.D. Brinton, R.F. Thompson, and T.W. Berger, 17beta-estradiol enhances NMDA receptor-mediated EPSPs and long-term potentiation. *J Neurophysiol* 81 (1999) 925-9.
- [261]C.L. Williams, A.M. Barnett, and W.H. Meck, Organizational effects of early gonadal secretions on sexual differentiation in spatial memory. *Behav Neurosci* 104 (1990) 84-97.
- [262]R.L. Roof, The dentate gyrus is sexually dimorphic in prepubescent rats: testosterone plays a significant role. *Brain Res* 610 (1993) 148-51.
- [263]D.J. Bucci, A.A. Chiba, and M. Gallagher, Spatial learning in male and female Long-Evans rats. *Behav Neurosci* 109 (1995) 180-3.
- [264]T.S. Perrot-Sinal, M.A. Kostenuik, K.P. Ossenkopp, and M. Kavaliers, Sex differences in performance in the Morris water maze and the effects of initial nonstationary hidden platform training. *Behav Neurosci* 110 (1996) 1309-20.
- [265]A.M. Aloisi, Sex differences in pain-induced effects on the septo-hippocampal system. *Brain Res Brain Res Rev* 25 (1997) 397-406.
- [266]B. Zimmerberg, and M.J. Farley, Sex differences in anxiety behavior in rats: role of gonadal hormones. *Physiol Behav* 54 (1993) 1119-24.
- [267]J.L. Dawson, Y.M. Cheung, and R.T. Lau, Developmental effects of neonatal sex hormones on spatial and activity skills in the white rat. *Biol Psychol* 3 (1975) 213-29.
- [268]N.J. Sandstrom, J. Kaufman, and S.A. Huettel, Males and females use different distal cues in a virtual environment navigation task. *Brain Res Cogn Brain Res* 6 (1998) 351-60.
- [269]A. Blokland, K. Rutten, and J. Prickaerts, Analysis of spatial orientation strategies of male and female Wistar rats in a Morris water escape task. *Behav Brain Res* 171 (2006) 216-24.
- [270]R.B. Gibbs, and D.A. Johnson, Sex-specific effects of gonadectomy and hormone treatment on acquisition of a 12-arm radial maze task by Sprague Dawley rats. *Endocrinology* 149 (2008) 3176-83.
- [271]Q. Rahman, S. Abrahams, and F. Jussab, Sex differences in a human analogue of the Radial Arm Maze: the "17-Box Maze Test". *Brain Cogn* 58 (2005) 312-7.
- [272]S.J. Duff, and E. Hampson, A sex difference on a novel spatial working memory task in humans. *Brain Cogn* 47 (2001) 470-93.
- [273]A. Postma, G. Jager, R.P. Kessels, H.P. Koppeschaar, and J. van Honk, Sex differences for selective forms of spatial memory. *Brain Cogn* 54 (2004) 24-34.
- [274]F. van Haaren, A. van Hest, and R.P. Heinsbroek, Behavioral differences between male and female rats: effects of gonadal hormones on learning and memory. *Neurosci Biobehav Rev* 14 (1990) 23-33.

- [275]R.L. Roof, Q. Zhang, M.M. Glasier, and D.G. Stein, Gender-specific impairment on Morris water maze task after entorhinal cortex lesion. *Behav Brain Res* 57 (1993) 47-51.
- [276]M.D. Madeira, and A.R. Lieberman, Sexual dimorphism in the mammalian limbic system. *Prog Neurobiol* 45 (1995) 275-333.
- [277]M. Kavaliers, K.P. Ossenkopp, L.A. Galea, and B. Kolb, Sex differences in spatial learning and prefrontal and parietal cortical dendritic morphology in the meadow vole, *Microtus pennsylvanicus*. *Brain Res* 810 (1998) 41-7.
- [278]F.P. Valle, Effects of strain, sex, and illumination on open-field behavior of rats. *Am J Psychol* 83 (1970) 103-11.
- [279]J. Masur, M.T. Schutz, and R. Boerngen, Gender differences in open-field behavior as a function of age. *Dev Psychobiol* 13 (1980) 107-10.
- [280]J. Alstott, and W. Timberlake, Effects of rat sex differences and lighting on locomotor exploration of a circular open field with free-standing central corners and without peripheral walls. *Behav Brain Res* 196 (2009) 214-9.
- [281]D.J. Haleem, G. Kennett, and G. Curzon, Adaptation of female rats to stress: shift to male pattern by inhibition of corticosterone synthesis. *Brain Res* 458 (1988) 339-47.
- [282]J.R. Kaplan, M.R. Adams, T.B. Clarkson, and D.R. Koritnik, Psychosocial influences on female 'protection' among cynomolgus macaques. *Atherosclerosis* 53 (1984) 283-95.
- [283]G.A. Kennett, F. Chaouloff, M. Marcou, and G. Curzon, Female rats are more vulnerable than males in an animal model of depression: the possible role of serotonin. *Brain Res* 382 (1986) 416-21.
- [284]S.E. Taylor, L.C. Klein, B.P. Lewis, T.L. Gruenewald, R.A. Gurung, and J.A. Updegraff, Biobehavioral responses to stress in females: tend-and-befriend, not fight-or-flight. *Psychol Rev* 107 (2000) 411-29.
- [285]M.M. Faraday, Rat sex and strain differences in responses to stress. *Physiol Behav* 75 (2002) 507-22.
- [286]R.E. Bowman, D. Ferguson, and V.N. Luine, Effects of chronic restraint stress and estradiol on open field activity, spatial memory, and monoaminergic neurotransmitters in ovariectomized rats. *Neuroscience* 113 (2002) 401-10.
- [287]J. Archer, Rodent sex differences in emotional and related behavior. *Behav Biol* 14 (1975) 451-79.
- [288]G.T. Livezey, J.M. Miller, and W.H. Vogel, Plasma norepinephrine, epinephrine and corticosterone stress responses to restraint in individual male and female rats, and their correlations. *Neurosci Lett* 62 (1985) 51-6.
- [289]H.L. Steenbergen, R.P. Heinsbroek, A. Van Hest, and N.E. Van de Poll, Sex-dependent effects of inescapable shock administration on shuttlebox-escape performance and elevated plus-maze behavior. *Physiol Behav* 48 (1990) 571-6.
- [290]C.R. Pryce, J. Lehmann, and J. Feldon, Effect of sex on fear conditioning is similar for context and discrete CS in Wistar, Lewis and Fischer rat strains. *Pharmacol Biochem Behav* 64 (1999) 753-9.
- [291]F. van Haaren, and N.E. van de Poll, The number of pre-shock trials affects sex differences in passive avoidance behavior. *Physiol Behav* 33 (1984) 269-72.
- [292]R.P. Heinsbroek, F. van Haaren, and N.E. van de Poll, Sex differences in passive avoidance behavior of rats: sex-dependent susceptibility to shock-induced behavioral depression. *Physiol Behav* 43 (1988) 201-6.
- [293]K. Kudo, C.X. Qiao, S. Kanba, and J. Arita, A selective increase in phosphorylation of cyclic AMP response element-binding protein in hippocampal CA1 region of male, but not female, rats following contextual fear and passive avoidance conditioning. *Brain Res* 1024 (2004) 233-43.

- [294]T. Sagvolden, M.B. Pettersen, and M.C. Larsen, Spontaneously hypertensive rats (SHR) as a putative animal model of childhood hyperkinesis: SHR behavior compared to four other rat strains. *Physiol Behav* 54 (1993) 1047-55.
- [295]A. Sfikakis, C. Spyraiki, N. Sitaras, and D. Varonos, Implication of the estrous cycle on conditioned avoidance behavior in the rat. *Physiol Behav* 21 (1978) 441-6.
- [296]T.J. Shors, C. Lewczyk, M. Pacynski, P.R. Mathew, and J. Pickett, Stages of estrous mediate the stress-induced impairment of associative learning in the female rat. *Neuroreport* 9 (1998) 419-23.
- [297]R.P. Heinsbroek, M.G. Feenstra, P. Boon, F. Van Haaren, and N.E. Van de Poll, Sex differences in passive avoidance depend on the integrity of the central serotonergic system. *Pharmacol Biochem Behav* 31 (1988) 499-503.
- [298]S. Monleon, A. Urquiza, M. Carmen Arenas, C. Vinader-Caerols, and A. Parra, Chronic administration of fluoxetine impairs inhibitory avoidance in male but not female mice. *Behav Brain Res* 136 (2002) 483-8.
- [299]E. Everss, M.C. Arenas, C. Vinader-Caerols, S. Monleon, and A. Parra, Piracetam counteracts the effects of amitriptyline on inhibitory avoidance in CD1 mice. *Behav Brain Res* 159 (2005) 235-42.
- [300]S. Monleon, A. Urquiza, C. Vinader-Caerols, and A. Parra, Effects of oxotremorine and physostigmine on the inhibitory avoidance impairment produced by amitriptyline in male and female mice. *Behav Brain Res* 205 (2009) 367-71.
- [301]M.C. Arenas, C. Vinader-Caerols, S. Monleon, A.J. Martos, E. Everss, A. Ferrer-Ano, and A. Parra, Are the effects of the antidepressants amitriptyline, maprotiline, and fluoxetine on inhibitory avoidance state-dependent? *Behav Brain Res* 166 (2006) 150-8.
- [302]R.H. Bauer, Ontogeny of two-way avoidance in male and female rats. *Dev Psychobiol* 11 (1978) 103-116.
- [303]F. Drago, B. Bohus, U. Scapagnini, and D. de Wied, Sexual dimorphism in passive avoidance behavior of rats: relation to body weight, age, shock intensity and retention interval. *Physiol Behav* 24 (1980) 1161-4.
- [304]H.G. Van Oyen, N.E. Van De Poll, and J.P. De Bruin, Sex, age and shock-intensity as factors in passive avoidance. *Physiol Behav* 23 (1979) 915-8.
- [305]C. Vinader-Caerols, A.J. Martos, S. Monleon, M.C. Arenas, and A. Parra, Acute effects of maprotiline on learning, anxiety, activity and analgesia in male and female mice. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 66 (2006) 23-31.
- [306]A. van Hest, J. Stroet, F. van Haaren, and M. Feenstra, Scopolamine differentially disrupts the behavior of male and female Wistar rats in a delayed nonmatching to position procedure. *Pharmacol Biochem Behav* 35 (1990) 903-9.
- [307]F. van Haaren, and A. van Hest, The effects of scopolamine and methylscopolamine on visual and auditory discriminations in male and female Wistar rats. *Pharmacol Biochem Behav* 32 (1989) 707-10.
- [308]F. van Haaren, A. van Hest, and T. van Hattum, Scopolamine and methylscopolamine differentially affect fixed-consecutive-number performance of male and female Wistar rats. *Pharmacol Biochem Behav* 33 (1989) 361-5.
- [309]J.S. Andrews, Possible confounding influence of strain, age and gender on cognitive performance in rats. *Brain Res Cogn Brain Res* 3 (1996) 251-67.
- [310]S.E. File, and S.V. Vellucci, Behavioural and biochemical measures of stress in hooded rats from different sources. *Physiol Behav* 22 (1979) 31-5.
- [311]C. Gentsch, M. Lichtsteiner, H.R. Frischknecht, H. Feer, and B. Siegfried, Isolation-induced locomotor hyperactivity and hypoalgesia in rats are prevented by handling and reversed by resocialization. *Physiol Behav* 43 (1988) 13-6.
- [312]T.A. Kosten, H.J. Lee, and J.J. Kim, Neonatal handling alters learning in adult male and female rats in a task-specific manner. *Brain Res* 1154 (2007) 144-53.

- [313]T.A. Kosten, H.J. Lee, and J.J. Kim, Early life stress impairs fear conditioning in adult male and female rats. *Brain Res* 1087 (2006) 142-50.
- [314]P. Meerlo, K.M. Horvath, G.M. Nagy, B. Bohus, and J.M. Koolhaas, The influence of postnatal handling on adult neuroendocrine and behavioural stress reactivity. *J Neuroendocrinol* 11 (1999) 925-33.
- [315]C.R. Pryce, D. Bettschen, N.I. Nanz-Bahr, and J. Feldon, Comparison of the effects of early handling and early deprivation on conditioned stimulus, context, and spatial learning and memory in adult rats. *Behav Neurosci* 117 (2003) 883-93.
- [316]J.F. Nunez, P. Ferre, E. Garcia, R.M. Escorihuela, A. Fernandez-Teruel, and A. Tobena, Postnatal handling reduces emotionality ratings and accelerates two-way active avoidance in female rats. *Physiol Behav* 57 (1995) 831-5.
- [317]J. Weinberg, and S. Levine, Early handling influences on behavioral and physiological responses during active avoidance. *Dev Psychobiol* 10 (1977) 161-9.
- [318]J. Lehmann, C.R. Pryce, A.L. Jongen-Relo, T. Stohr, H.H. Pothuizen, and J. Feldon, Comparison of maternal separation and early handling in terms of their neurobehavioral effects in aged rats. *Neurobiol Aging* 23 (2002) 457-66.
- [319]T.M. Pham, S. Soderstrom, B.G. Henriksson, and A.H. Mohammed, Effects of neonatal stimulation on later cognitive function and hippocampal nerve growth factor. *Behav Brain Res* 86 (1997) 113-20.
- [320]E.G. Marchant, and R.E. Mistlberger, Entrainment and phase shifting of circadian rhythms in mice by forced treadmill running. *Physiol Behav* 60 (1996) 657-63.
- [321]D. Chaudhury, and C.S. Colwell, Circadian modulation of learning and memory in fear-conditioned mice. *Behav Brain Res* 133 (2002) 95-108.
- [322]R.I. Fernandez, L.C. Lyons, J. Levenson, O. Khabour, and A. Eskin, Circadian modulation of long-term sensitization in *Aplysia*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (2003) 14415-20.
- [323]N.F. Ruby, C.E. Hwang, C. Wessells, F. Fernandez, P. Zhang, R. Sapolsky, and H.C. Heller, Hippocampal-dependent learning requires a functional circadian system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (2008) 15593-8.
- [324]J.M. Ellenbogen, J.D. Payne, and R. Stickgold, The role of sleep in declarative memory consolidation: passive, permissive, active or none? *Curr Opin Neurobiol* 16 (2006) 716-22.
- [325]E.W. Lamont, B. Robinson, J. Stewart, and S. Amir, The central and basolateral nuclei of the amygdala exhibit opposite diurnal rhythms of expression of the clock protein *Period2*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (2005) 4180-4.
- [326]H. Wakamatsu, Y. Yoshinobu, R. Aida, T. Moriya, M. Akiyama, and S. Shibata, Restricted-feeding-induced anticipatory activity rhythm is associated with a phase-shift of the expression of *mPer1* and *mPer2* mRNA in the cerebral cortex and hippocampus but not in the suprachiasmatic nucleus of mice. *Eur J Neurosci* 13 (2001) 1190-6.
- [327]D. Chaudhury, D.H. Loh, J.M. Dragich, A. Hagopian, and C.S. Colwell, Select cognitive deficits in vasoactive intestinal peptide deficient mice. *BMC Neurosci* 9 (2008) 63.
- [328]C.A. McClung, K. Sidiropoulou, M. Vitaterna, J.S. Takahashi, F.J. White, D.C. Cooper, and E.J. Nestler, Regulation of dopaminergic transmission and cocaine reward by the *Clock* gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (2005) 9377-81.
- [329]G. Hampp, and U. Albrecht, The circadian clock and mood-related behavior. *Commun Integr Biol* 1 (2008) 1-3.
- [330]C. Abarca, U. Albrecht, and R. Spanagel, Cocaine sensitization and reward are under the influence of circadian genes and rhythm. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2002) 9026-30.

- [331]E.A. Van der Zee, R. Havekes, R.P. Barf, R.A. Hut, I.M. Nijholt, E.H. Jacobs, and M.P. Gerkema, Circadian time-place learning in mice depends on Cry genes. *Curr Biol* 18 (2008) 844-8.
- [332]A. Jilg, S. Lesny, N. Peruzki, H. Schwegler, O. Selbach, F. Dehghani, and J.H. Stehle, Temporal dynamics of mouse hippocampal clock gene expression support memory processing. *Hippocampus* 20 (2009) 377-88.
- [333]K.L. Eckel-Mahan, T. Phan, S. Han, H. Wang, G.C. Chan, Z.S. Scheiner, and D.R. Storm, Circadian oscillation of hippocampal MAPK activity and cAmp: implications for memory persistence. *Nat Neurosci* 11 (2008) 1074-82.
- [334]W.N. Tapp, and F.A. Holloway, Phase shifting circadian rhythms produces retrograde amnesia. *Science* 211 (1981) 1056-8.
- [335]M. Fekete, J.M. van Ree, R.J. Niesink, and D. de Wied, Disrupting circadian rhythms in rats induces retrograde amnesia. *Physiol Behav* 34 (1985) 883-7.
- [336]B.D. Devan, E.H. Goad, H.L. Petri, E.A. Antoniadis, N.S. Hong, C.H. Ko, L. Leblanc, S.S. Lebovic, Q. Lo, M.R. Ralph, and R.J. McDonald, Circadian phase-shifted rats show normal acquisition but impaired long-term retention of place information in the water task. *Neurobiol Learn Mem* 75 (2001) 51-62.
- [337]L.A. Craig, and R.J. McDonald, Chronic disruption of circadian rhythms impairs hippocampal memory in the rat. *Brain Res Bull* 76 (2008) 141-51.
- [338]W.P. Ma, J. Cao, M. Tian, M.H. Cui, H.L. Han, Y.X. Yang, and L. Xu, Exposure to chronic constant light impairs spatial memory and influences long-term depression in rats. *Neurosci Res* 59 (2007) 224-30.
- [339]E. Aserinsky, and N. Kleitman, Regularly occurring periods of eye motility, and concomitant phenomena, during sleep. *Science* 118 (1953) 273-4.
- [340]M.P. Walker, and R. Stickgold, Sleep, memory, and plasticity. *Annu Rev Psychol* 57 (2006) 139-66.
- [341]M.G. Frank, and J.H. Benington, The role of sleep in memory consolidation and brain plasticity: dream or reality? *Neuroscientist* 12 (2006) 477-88.
- [342]S. Diekelmann, and J. Born, The memory function of sleep. *Nat Rev Neurosci* 11 (2010) 114-26.
- [343]J.G. Jenkins, and K.M. Dallenbach, Obliviscence during sleep and waking. *American Journal of Psychology* 35 (1924) 605-12.
- [344]C. Smith, Sleep states and learning: a review of the animal literature. *Neurosci Biobehav Rev* 9 (1985) 157-68.
- [345]W.C. Stern, Acquisition impairments following rapid eye movement sleep deprivation in rats. *Physiol Behav* 7 (1971) 345-52.
- [346]Z. Guan, X. Peng, and J. Fang, Sleep deprivation impairs spatial memory and decreases extracellular signal-regulated kinase phosphorylation in the hippocampus. *Brain Res* 1018 (2004) 38-47.
- [347]M.J. McGrath, and D.B. Cohen, REM sleep facilitation of adaptive waking behavior: a review of the literature. *Psychol Bull* 85 (1978) 24-57.
- [348]A. Gruart-Masso, R. Nadal-Aleman, M. Coll-Andreu, I. Portell-Cortes, and M. Marti-Nicolovius, Effects of pretraining paradoxical sleep deprivation upon two-way active avoidance. *Behav Brain Res* 72 (1995) 181-3.
- [349]R.R. Pagano, and R.H. Lovely, Diurnal cycle and ACTH facilitation of shuttlebox avoidance. *Physiol Behav* 8 (1972) 721-3.
- [350]W. Hauber, and A. Bareiss, Facilitative effects of an adenosine A1/A2 receptor blockade on spatial memory performance of rats: selective enhancement of reference memory retention during the light period. *Behav Brain Res* 118 (2001) 43-52.
- [351]F.A. Holloway, and R. Wansley, Multiphasic retention deficits at periodic intervals after passive-avoidance learning. *Science* 180 (1973) 208-10.

- [352]F.A. Holloway, and R.A. Wansley, Multiple retention deficits at periodic intervals after active and passive avoidance learning. *Behav Biol* 9 (1973) 1-14.
- [353]M. Coll-Andreu, M. Marti-Nicolovius, and I. Morgado-Bernal, Facilitation of shuttle-box avoidance by the platform method: temporal effects. *Physiol Behav* 49 (1991) 1211-5.
- [354]M.I. Cordero, J.J. Merino, and C. Sandi, Correlational relationship between shock intensity and corticosterone secretion on the establishment and subsequent expression of contextual fear conditioning. *Behav Neurosci* 112 (1998) 885-91.
- [355]W.B. Ghiselli, and R.A. Patton, Diurnal variation in performance of free-operant avoidance behavior of rats. *Psychol Rep* 38 (1976) 83-90.
- [356]V.S. Valentinuzzi, L. Menna-Barreto, and G.F. Xavier, Effect of circadian phase on performance of rats in the Morris water maze task. *J Biol Rhythms* 19 (2004) 312-24.
- [357]C.A. Barnes, B.L. McNaughton, G.V. Goddard, R.M. Douglas, and R. Adamec, Circadian rhythm of synaptic excitability in rat and monkey central nervous system. *Science* 197 (1977) 91-2.
- [358]K.M. Harris, and T.J. Teyler, Age differences in a circadian influence on hippocampal LTP. *Brain Res* 261 (1983) 69-73.
- [359]A.V. Raghavan, J.M. Horowitz, and C.A. Fuller, Diurnal modulation of long-term potentiation in the hamster hippocampal slice. *Brain Res* 833 (1999) 311-4.
- [360]M.R. Vianna, M. Alonso, H. Viola, J. Quevedo, F. de Paris, M. Furman, M.L. de Stein, J.H. Medina, and I. Izquierdo, Role of hippocampal signaling pathways in long-term memory formation of a nonassociative learning task in the rat. *Learn Mem* 7 (2000) 333-40.
- [361]R. Mahibbur, and Z. Govindarajulu, A modification of the test of Shapiro and Wilks for normality. *J Appl Statistics* 24 (1997) 219-235.
- [362]D. Eilam, Locomotor activity in common spiny mice (*Acomys cahirinuse*): the effect of light and environmental complexity. *BMC Ecol* 4 (2004) 16.
- [363]A.G. Nasello, C. Machado, J.F. Bastos, and L.F. Felicio, Sudden darkness induces a high activity-low anxiety state in male and female rats. *Physiol Behav* 63 (1998) 451-4.
- [364]M.S. Fanselow, Factors governing one-trial contextual conditioning. *Animal Learning Behavior* 18 (1990) 264-270.
- [365]F. Fadda, S. Cocco, and R. Stancampiano, Hippocampal acetylcholine release correlates with spatial learning performance in freely moving rats. *Neuroreport* 11 (2000) 2265-9.
- [366]R. Stancampiano, S. Cocco, C. Cugusi, L. Sarais, and F. Fadda, Serotonin and acetylcholine release response in the rat hippocampus during a spatial memory task. *Neuroscience* 89 (1999) 1135-43.
- [367]D. Jerusalinsky, E. Kornisiuk, and I. Izquierdo, Cholinergic neurotransmission and synaptic plasticity concerning memory processing. *Neurochem Res* 22 (1997) 507-15.
- [368]M.G. Giovannini, L. Bartolini, L. Bacciottini, L. Greco, and P. Blandina, Effects of histamine H3 receptor agonists and antagonists on cognitive performance and scopolamine-induced amnesia. *Behav Brain Res* 104 (1999) 147-55.
- [369]D.M. Barros, P. Pereira, J.H. Medina, and I. Izquierdo, Modulation of working memory and of long- but not short-term memory by cholinergic mechanisms in the basolateral amygdala. *Behav Pharmacol* 13 (2002) 163-7.
- [370]J.L. McGaugh, Memory--a century of consolidation. *Science* 287 (2000) 248-51.
- [371]I. Izquierdo, J.H. Medina, L.A. Izquierdo, D.M. Barros, M.M. de Souza, and T. Mello e Souza, Short- and long-term memory are differentially regulated by monoaminergic systems in the rat brain. *Neurobiol Learn Mem* 69 (1998) 219-24.

- [372]D. Jerusalinsky, E. Kornisiuk, P. Alfaro, J. Quillfeldt, M. Alonso, E.R. Verde, C. Cervenansky, and A. Harvey, Muscarinic toxin selective for m4 receptors impairs memory in the rat. *Neuroreport* 9 (1998) 1407-11.
- [373]P.H. Botton, M.S. Costa, A.P. Ardaís, S. Mioranza, D.O. Souza, J.B. da Rocha, and L.O. Porciuncula, Caffeine prevents disruption of memory consolidation in the inhibitory avoidance and novel object recognition tasks by scopolamine in adult mice. *Behav Brain Res* 214 (2010) 254-9.
- [374]N. Pitsikas, A.E. Rigamonti, S.G. Cella, V. Locatelli, M. Sala, and E.E. Muller, Effects of molsidomine on scopolamine-induced amnesia and hypermotility in the rat. *Eur J Pharmacol* 426 (2001) 193-200.
- [375]J. Day, G. Damsma, and H.C. Fibiger, Cholinergic activity in the rat hippocampus, cortex and striatum correlates with locomotor activity: an in vivo microdialysis study. *Pharmacol Biochem Behav* 38 (1991) 723-9.
- [376]M. Duran-Arevalo, S.E. Cruz-Morales, and R.A. Prado-Alcala, Is acetylcholine involved in memory consolidation of over-reinforced learning? *Brain Res Bull* 24 (1990) 725-7.
- [377]A. Pazzagli, and G. Pepeu, [Correlations between the Modifications of Behavior Induced by Scopolamine and Cerebral Acetylcholine Contents in the Rat]. *Rass Studi Psichiatr* 53 (1964) 261-6.
- [378]M.G. Blake, M.M. Boccia, M.C. Krawczyk, and C.M. Baratti, Scopolamine prevents retrograde memory interference between two different learning tasks. *Physiol Behav* 102 (2011) 332-7.
- [379]G. Roldan, E. Bolanos-Badillo, H. Gonzalez-Sanchez, G.L. Quirarte, and R.A. Prado-Alcala, Selective M1 muscarinic receptor antagonists disrupt memory consolidation of inhibitory avoidance in rats. *Neurosci Lett* 230 (1997) 93-6.
- [380]D.K. Rush, Scopolamine amnesia of passive avoidance: a deficit of information acquisition. *Behav Neural Biol* 50 (1988) 255-74.
- [381]E.I. Moser, and O. Paulsen, New excitement in cognitive space: between place cells and spatial memory. *Curr Opin Neurobiol* 11 (2001) 745-51.
- [382]I. Lee, and R.P. Kesner, Differential contribution of NMDA receptors in hippocampal subregions to spatial working memory. *Nat Neurosci* 5 (2002) 162-8.
- [383]M.M. Boccia, G.B. Acosta, M.G. Blake, and C.M. Baratti, Memory consolidation and reconsolidation of an inhibitory avoidance response in mice: effects of i.c.v. injections of hemicholinium-3. *Neuroscience* 124 (2004) 735-41.
- [384]M.W. Decker, and J.L. McGaugh, Effects of concurrent manipulations of cholinergic and noradrenergic function on learning and retention in mice. *Brain Res* 477 (1989) 29-37.
- [385]R.G. Morris, J.J. Hagan, and J.N. Rawlins, Allocentric spatial learning by hippocampectomised rats: a further test of the "spatial mapping" and "working memory" theories of hippocampal function. *Q J Exp Psychol B* 38 (1986) 365-95.
- [386]P. Andine, N. Widermark, R. Axelsson, G. Nyberg, U. Olofsson, E. Martensson, and M. Sandberg, Characterization of MK-801-induced behavior as a putative rat model of psychosis. *J Pharmacol Exp Ther* 290 (1999) 1393-408.
- [387]G.L. Quirarte, S.E. Cruz-Morales, A. Cepeda, M. Garcia-Montanez, G. Roldan-Roldan, and R.A. Prado-Alcala, Effects of central muscarinic blockade on passive avoidance: anterograde amnesia, state dependency, or both? *Behav Neural Biol* 62 (1994) 15-20.
- [388]G.L. Quirarte, S.E. Cruz-Morales, M.A. Diaz del Guante, M. Garcia, and R.A. Prado-Alcala, Protective effect of under-reinforcement of passive avoidance against scopolamine-induced amnesia. *Brain Res Bull* 32 (1993) 521-4.
- [389]S.E. Cruz-Morales, M. Duran-Arevalo, M.A. Diaz Del Guante, G. Quirarte, and R.A. Prado-Alcala, A threshold for the protective effect of over-reinforced passive

- avoidance against scopolamine-induced amnesia. *Behav Neural Biol* 57 (1992) 256-9.
- [390]C. Quiroz, I. Martinez, G.L. Quirarte, T. Morales, S. Diaz-Cintra, and R.A. Prado-Alcala, Enhanced inhibitory avoidance learning prevents the memory-impairing effects of post-training hippocampal inactivation. *Exp Brain Res* 153 (2003) 400-2.
- [391]V. Cheli, Rol de los receptores glutamatérgicos ionotrópicos en el procesamiento de información., FFyB, UBA, 2006.
- [392]W.W. Beatty, and P.A. Beatty, Hormonal determinants of sex differences in avoidance behavior and reactivity to electric shock in the rat. *J Comp Physiol Psychol* 73 (1970) 446-55.
- [393]M. Dennis, Sex-dependent and sex-independent neural control of reactivity to electric footshock in the rat. *Expl Neurol* 37 (1972) 256-268.
- [394]H.E. Marks, and S.H. Hobbs, Changes in stimulus reactivity following gonadectomy in male and female rats of different ages. *Physiol Behav* 8 (1972) 1113-9.
- [395]W.P. Pare, Interaction of age and shock intensity on acquisition of a discriminated conditioned emotional response. *J Comp Physiol Psychol* 68 (1969) 364-9.
- [396]J. Myslivecek, and J. Hassmannova, Step-down passive avoidance in the rat ontogeny. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 51 (1991) 89-96.
- [397]L.L. Hwang, C.H. Wang, T.L. Li, S.D. Chang, L.C. Lin, C.P. Chen, C.T. Chen, K.C. Liang, I.K. Ho, W.S. Yang, and L.C. Chiou, Sex differences in high-fat diet-induced obesity, metabolic alterations and learning, and synaptic plasticity deficits in mice. *Obesity (Silver Spring)* 18 (2010) 463-9.
- [398]J. Podhorna, and R.E. Brown, Strain differences in activity and emotionality do not account for differences in learning and memory performance between C57BL/6 and DBA/2 mice. *Genes Brain Behav* 1 (2002) 96-110.
- [399]J.C. Schank, and M.K. McClintock, A coupled-oscillator model of ovarian-cycle synchrony among female rats. *J Theor Biol* 157 (1992) 317-62.
- [400]N. Yasukawa, S.D. Michael, and J.J. Christian, Estrous cycle regulation in the whitefooted mouse (*Peromyscus leucopus*) with special reference to vaginal cast formation. *Lab Anim Sci* 28 (1978) 46-50.
- [401]W.K. Whitten, Occurrence of anestrus in mice caged in groups. *J. Endocrinol.* 18 (1959) 102-107.
- [402]P. Hirsjarvi, and T. Valiaho, Effects of gentling on open-field behaviour of Wistar rats in fear-evoking test situation. *Lab Anim* 29 (1995) 380-4.
- [403]S.B. Powell, M.A. Geyer, D. Gallagher, and M.P. Paulus, The balance between approach and avoidance behaviors in a novel object exploration paradigm in mice. *Behav Brain Res* 152 (2004) 341-9.
- [404]R.C. Reboucas, and W.R. Schmidek, Handling and isolation in three strains of rats affect open field, exploration, hoarding and predation. *Physiol Behav* 62 (1997) 1159-64.
- [405]G. Genaro, and W.R. Schmidek, The influence of handling and isolation postweaning on open field, exploratory and maternal behavior of female rats. *Physiol Behav* 75 (2002) 681-8.
- [406]C. Cannizzaro, M. Martire, E. Cannizzaro, G. Provenzano, M. Gagliano, A. Carollo, A. Mineo, and L. Steardo, Long-lasting handling affects behavioural reactivity in adult rats of both sexes prenatally exposed to diazepam. *Brain Res* 904 (2001) 225-33.
- [407]M.L. Rosa, R.C. Silva, F.T. Moura-de-Carvalho, M.L. Brandao, F.S. Guimaraes, and E.A. Del Bel, Routine post-weaning handling of rats prevents isolation rearing-induced deficit in prepulse inhibition. *Braz J Med Biol Res* 38 (2005) 1691-6.
- [408]N. Colettis, Snitcofsky M, Gonzalez N, Kornisiuk E, and J. D., Does previous learning facilitate a next one? Time window required to establish a facilitatory

- effect of previous learning on performance in a different task, *Molecular and Cellular Cognition Society. Society for Neuroscience Satellite Symposium 2009 Chicago USA, 2009.*
- [409]N. Colettis, M. Snitcofsky, N. Gonzalez, E. Kornisiuk, and D. Jerusalinsky, Time window required to establish a facilitatory effect of previous learning on performance in a different task. , I Reunión Conjunta de Neurociencias (IRCN). Huerta Grande, Córdoba, Argentina., 2009.
- [410]N. Colettis, M. Snitcofsky, E. Kornisiuk, and D. Jerusalinky, Open field recovered from the amnesia caused by scopolamine in an aversive learning task. , Society for Neuroscience, San Diego, USA, 2010.
- [411]N. Colettis, M. Snitcofsky, E. Kornisiuk, J. Quillfeldt, and D. Jerusalinky, Overcoming the amnesia caused by blockade of hippocampal muscarinic receptors by previous exposures to an open field., II Reunión Conjunta de Neurociencias (IIRCN), Huerta Grande, Córdoba, Argentina., 2010.
- [412]U. Frey, and R.G. Morris, Synaptic tagging and long-term potentiation. *Nature* 385 (1997) 533-6.
- [413]H. Maldonado, Crustacean as model to investigate memory illustrated by extensive behavioral and physiological studies in *Chasmagnathus.*, Springer, Berlin, 2002.
- [414]L. Frenkel, H. Maldonado, and A. Delorenzi, Memory strengthening by a real-life episode during reconsolidation: an outcome of water deprivation via brain angiotensin II. *Eur J Neurosci* 22 (2005) 1757-66.
- [415]L. Smal, L.D. Suarez, and A. Delorenzi, Enhancement of long-term memory expression by a single trial during consolidation. *Neurosci Lett* 487 (2010) 36-40.
- [416]L.A. Izquierdo, D.M. Barros, M.R. Vianna, A. Coitinho, T. deDavid e Silva, H. Choi, B. Moletta, J.H. Medina, and I. Izquierdo, Molecular pharmacological dissection of short- and long-term memory. *Cell Mol Neurobiol* 22 (2002) 269-87.
- [417]S. Stough, J.L. Shobe, and T.J. Carew, Intermediate-term processes in memory formation. *Curr Opin Neurobiol* 16 (2006) 672-8.
- [418]K. Parvez, O. Stewart, S. Sangha, and K. Lukowiak, Boosting intermediate-term into long-term memory. *J Exp Biol* 208 (2005) 1525-36.
- [419]M.J. Summers, S.F. Crowe, and K.T. Ng, Modification of a weak learning experience by memory retrieval in the day-old chick. *Behav Neurosci* 114 (2000) 713-9.
- [420]L.D. Suarez, L. Smal, and A. Delorenzi, Updating contextual information during consolidation as result of a new memory trace. *Neurobiol Learn Mem* 93 (2010) 561-71.
- [421]B. Deweer, S.J. Sara, and B. Hars., Contextual cues and memory retrieval in rats: Alleviation of forgetting by a pretest exposure to background stimuli. *Animal Learning Behavior* 8 (1980) 265-272.
- [422]R.J. Bialik, B.A. Pappas, and D.C. Roberts, Deficits in conditioned avoidance responding following adrenalectomy and central norepinephrine depletion are dependent on postsurgical recovery period and phase of the diurnal cycle. *Behav Neurosci* 98 (1984) 847-57.
- [423]F.K. Stephan, and N.S. Kovacevic, Multiple retention deficit in passive avoidance in rats is eliminated by suprachiasmatic lesions. *Behav Biol* 22 (1978) 456-62.
- [424]D.N. Ruskin, C. Liu, K.E. Dunn, N.G. Bazan, and G.J. LaHoste, Sleep deprivation impairs hippocampus-mediated contextual learning but not amygdala-mediated cued learning in rats. *Eur J Neurosci* 19 (2004) 3121-4.
- [425]O. Rawashdeh, N.H. de Borsetti, G. Roman, and G.M. Cahill, Melatonin suppresses nighttime memory formation in zebrafish. *Science* 318 (2007) 1144-6.
- [426]L.C. Lyons, C.L. Green, and A. Eskin, Intermediate-term memory is modulated by the circadian clock. *J Biol Rhythms* 23 (2008) 538-42.

- [427]L.C. Lyons, and G. Roman, Circadian modulation of short-term memory in *Drosophila*. *Learn Mem* 16 (2009) 19-27.
- [428]J.R. Gerstner, and J.C. Yin, Circadian rhythms and memory formation. *Nat Rev Neurosci* 11 (2010) 577-88.
- [429]R. Ader, J.A.W.M. Weijnen, and P. Moleman, Retention of a passive avoidance response as a function of the intensity and duration of electric shock. *Psychon. Sci.* 26 (1972) 125--128.
- [430]K.C. Chambers, and C.B. Sengstake, Sexually dimorphic extinction of a conditioned taste aversion in rats. *Anim Learn Behav* 4 (1976) 181-5.
- [431]A. Denti, and A. Epstein, Sex differences in the acquisition of two kinds of avoidance behavior in rats. *Physiol Behav* 8 (1972) 611-5.
- [432]N.E. van de Poll, J.P. de Bruin, H. van Dis, and H.G. van Oyen, Gonadal hormones and the differentiation of sexual and aggressive behavior and learning in the rat. *Prog Brain Res* 48 (1978) 309-25.
- [433]G. Martel, R. Jaffard, and J.L. Guillou, Identification of hippocampus-dependent and hippocampus independent memory components in step-down inhibitory avoidance tasks. *Behav Brain Res* 207 (2010) 138-43.
- [434]P.W. Frankland, S.A. Josselyn, S.G. Anagnostaras, J.H. Kogan, E. Takahashi, and A.J. Silva, Consolidation of CS and US representations in associative fear conditioning. *Hippocampus* 14 (2004) 557-69.
- [435]A. Ennaceur, S. Michalikova, and P.L. Chazot, Models of anxiety: responses of rats to novelty in an open space and an enclosed space. *Behav Brain Res* 171 (2006) 26-49.
- [436]M.G. Blake, M.M. Boccia, and C.M. Baratti, Behavioral differences on memory retrieval between two variants of step-through inhibitory avoidance task in mice. *Neurosci Lett* 444 (2008) 102-5.
- [437]M. Costanzi, D. Saraulli, C. Rossi-Arnaud, M. Aceti, and V. Cestari, Memory impairment induced by an interfering task is reverted by pre-frontal cortex lesions: a possible role for an inhibitory process in memory suppression in mice. *Neuroscience* 158 (2009) 503-13.
- [438]J.D. Dudar, I.Q. Whishaw, and J.C. Szerb, Release of acetylcholine from the hippocampus of freely moving rats during sensory stimulation and running. *Neuropharmacology* 18 (1979) 673-8.
- [439]F.M. Inglis, and H.C. Fibiger, Increases in hippocampal and frontal cortical acetylcholine release associated with presentation of sensory stimuli. *Neuroscience* 66 (1995) 81-6.
- [440]O.G. Nilsson, P. Kalen, E. Rosengren, and A. Bjorklund, Acetylcholine release in the rat hippocampus as studied by microdialysis is dependent on axonal impulse flow and increases during behavioural activation. *Neuroscience* 36 (1990) 325-38.
- [441]O.G. Nilsson, P. Kalen, E. Rosengren, and A. Bjorklund, Acetylcholine release from intrahippocampal septal grafts is under control by the host brain: a microdialysis study. *Prog Brain Res* 82 (1990) 321-8.
- [442]H. Dai, M. Krost, and R.J. Carey, A new methodological approach to the study of habituation: the use of positive and negative behavioral indices of habituation. *J Neurosci Methods* 62 (1995) 169-74.
- [443]P. Gerhardt, R.U. Hasenohrl, F.J. Hock, and J.P. Huston, Mnemogenic effects of injecting RA-octil, a CE-inhibitor derivate, systemically or into the basal forebrain. *Psychopharmacology (Berl)* 111 (1993) 442-8.
- [444]M. Ukai, T. Kobayashi, and T. Kameyama, Characterization of the effects of scopolamine on the habituation of exploratory activity: differential effects of oxotremorine and physostigmine. *Gen Pharmacol* 25 (1994) 433-8.

- [445]J.E. Harkness, and J.E. Wagner, *The biology and medicine of Rabbits and Rodents*, Philadelphia, 1995.
- [446]S.M. Schuchman, *Individual care and treatment of rabbits, mice, rats, guinea pigs, hamsters and gerbils.*, Philadelphia, 1989.
- [447]R.N. Hughes, C.S. Desmond, and L.C. Fisher, Room novelty, sex, scopolamine and their interactions as determinants of general activity and rearing, and light-dark preferences in rats. *Behav Processes* 67 (2004) 173-81.
- [448]J.W. Smythe, D. Murphy, S. Bhatnagar, C. Timothy, and B. Costall, Muscarinic antagonists are anxiogenic in rats tested in the black-white box. *Pharmacol Biochem Behav* 54 (1996) 57-63.
- [449]J.A. Harder, H.F. Baker, and R.M. Ridley, The role of the central cholinergic projections in cognition: implications of the effects of scopolamine on discrimination learning by monkeys. *Brain Res Bull* 45 (1998) 319-26.
- [450]A.H. Herremans, T.H. Hijzen, B. Olivier, and J.L. Slangen, Cholinergic drug effects on a delayed conditional discrimination task in the rat. *Behav Neurosci* 109 (1995) 426-35.
- [451]D.B. Hodges, Jr., M.D. Lindner, J.B. Hogan, K.M. Jones, and E.J. Markus, Scopolamine induced deficits in a battery of rat cognitive tests: comparisons of sensitivity and specificity. *Behav Pharmacol* 20 (2009) 237-51.
- [452]S. Spinelli, T. Ballard, J. Feldon, G.A. Higgins, and C.R. Pryce, Enhancing effects of nicotine and impairing effects of scopolamine on distinct aspects of performance in computerized attention and working memory tasks in marmoset monkeys. *Neuropharmacology* 51 (2006) 238-50.
- [453]S.N. Pradhan, and T. Roth, Comparative behavioral effects of several anticholinergic agents in rats. *Psychopharmacologia* 12 (1968) 358-66.
- [454]A. Chintoh, J. Fulton, N. Koziel, M. Aziz, M. Sud, and J.S. Yeomans, Role of cholinergic receptors in locomotion induced by scopolamine and oxotremorine-M. *Pharmacol Biochem Behav* 76 (2003) 53-61.
- [455]I. Klinkenberg, and A. Blokland, The validity of scopolamine as a pharmacological model for cognitive impairment: a review of animal behavioral studies. *Neurosci Biobehav Rev* 34 (2010) 1307-50.
- [456]A. Diaz-Trujillo, J. Contreras, A.C. Medina, G.A. Silveyra-Leon, A. Antaramian, G.L. Quirarte, and R.A. Prado-Alcala, Enhanced inhibitory avoidance learning prevents the long-term memory-impairing effects of cycloheximide, a protein synthesis inhibitor. *Neurobiol Learn Mem* 91 (2009) 310-4.
- [457]A.L. Harvey, L.C. Young, E. Kornisiuk, M. Snitcofsky, C. Blanco, N. Colettis, D. Jerusalinsky, and T.W. Stone, A novel dihydro-pyrazolo(3,4d)(1,2,4)triazolo(1,5a)pyrimidin-4-one as a selective antagonist at adenosine A1 receptors. *en preparación* (2011).
- [458]R.B. Levy, A.D. Reyes, and C. Aoki, Cholinergic modulation of local pyramid-interneuron synapses exhibiting divergent short-term dynamics in rat sensory cortex. *Brain Res* 1215 (2008) 97-104.
- [459]R. Roesler, G.K. Reolon, T. Luft, M.R. Martins, N. Schroder, M.R. Vianna, and J. Quevedo, NMDA receptors mediate consolidation of contextual memory in the hippocampus after context preexposure. *Neurochem Res* 30 (2005) 1407-11.
- [460]W. James, *Principles of Psychology*, New York, 1890.
- [461]N.J. Emptage, and T.J. Carew, Long-term synaptic facilitation in the absence of short-term facilitation in Aplysia neurons. *Science* 262 (1993) 253-6.
- [462]I. Izquierdo, D.M. Barros, T. Mello e Souza, M.M. de Souza, L.A. Izquierdo, and J.H. Medina, Mechanisms for memory types differ. *Nature* 393 (1998) 635-6.
- [463]I. Izquierdo, L.A. Izquierdo, D.M. Barros, T. Mello e Souza, M.M. de Souza, J. Quevedo, C. Rodrigues, M.K. Sant'Anna, M. Madruga, and J.H. Medina,

- Differential involvement of cortical receptor mechanisms in working, short-term and long-term memory. *Behav Pharmacol* 9 (1998) 421-7.
- [464]L. Cahill, J. Brioni, and I. Izquierdo, Retrograde memory enhancement by diazepam: its relation to anterograde amnesia, and some clinical implications. *Psychopharmacology (Berl)* 90 (1986) 554-6.
- [465]I. Izquierdo, and M.E. Pereira, Post-training memory facilitation blocks extinction but not retroactive interference. *Behav Neural Biol* 51 (1989) 108-13.
- [466]R.G. Morris, Synaptic plasticity. Down with novelty. *Nature* 394 (1998) 834-5.
- [467]R. Roesler, M. Vianna, M.K. Sant'Anna, C.R. Kuyven, A.V. Krueel, J. Quevedo, and M.B. Ferreira, Intrahippocampal infusion of the NMDA receptor antagonist AP5 impairs retention of an inhibitory avoidance task: protection from impairment by pretraining or preexposure to the task apparatus. *Neurobiol Learn Mem* 69 (1998) 87-91.
- [468]S.J. Sara, Recovery from hypoxia and ECS-induced amnesia after a single exposure to training environment. *Physiol Behav* 10 (1973) 85-9.
- [469]M. Bianchin, T. Mello e Souza, J.H. Medina, and I. Izquierdo, The amygdala is involved in the modulation of long-term memory, but not in working or short-term memory. *Neurobiol Learn Mem* 71 (1999) 127-31.
- [470]P.S. Goldman-Rakic, Regional and cellular fractionation of working memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (1996) 13473-80.
- [471]S.P. Baron, D. Wright, and G.R. Wenger, Effects of drugs of abuse and scopolamine on memory in rats: delayed spatial alternation and matching to position. *Psychopharmacology (Berl)* 137 (1998) 7-14.
- [472]C.K. Lieben, A. Blokland, A. Sik, E. Sung, P. van Nieuwenhuizen, and R. Schreiber, The selective 5-HT₆ receptor antagonist Ro4368554 restores memory performance in cholinergic and serotonergic models of memory deficiency in the rat. *Neuropsychopharmacology* 30 (2005) 2169-79.
- [473]A. Sambeth, W.J. Riedel, L.T. Smits, and A. Blokland, Cholinergic drugs affect novel object recognition in rats: relation with hippocampal EEG? *Eur J Pharmacol* 572 (2007) 151-9.
- [474]O. Buresova, and J. Bures, Radial maze as a tool for assessing the effect of drugs on the working memory of rats. *Psychopharmacology (Berl)* 77 (1982) 268-71.
- [475]H. Tsukada, T. Kakiuchi, H. Shizuno, and S. Nishiyama, Interactions of cholinergic and glutamatergic neuronal systems in the functional activation of cerebral blood flow response: a PET study in unanesthetized monkeys. *Brain Res* 796 (1998) 82-90.
- [476]H.C. Fibiger, The organization and some projections of cholinergic neurons of the mammalian forebrain. *Brain Res* 257 (1982) 327-88.
- [477]J.S. Schwaber, W.T. Rogers, K. Satoh, and H.C. Fibiger, Distribution and organization of cholinergic neurons in the rat forebrain demonstrated by computer-aided data acquisition and three-dimensional reconstruction. *J Comp Neurol* 263 (1987) 309-25.
- [478]R.T. Bartus, M.J. Pontecorvo, C. Flicker, R.L. Dean, and J.C. Figueiredo, Behavioral recovery following bilateral lesions of the nucleus basalis does not occur spontaneously. *Pharmacol Biochem Behav* 24 (1986) 1287-92.
- [479]S.B. Dunnett, B.J. Everitt, and T.W. Robbins, The basal forebrain-cortical cholinergic system: interpreting the functional consequences of excitotoxic lesions. *Trends Neurosci* 14 (1991) 494-501.
- [480]J.L. Muir, S.B. Dunnett, T.W. Robbins, and B.J. Everitt, Attentional functions of the forebrain cholinergic systems: effects of intraventricular hemicholinium, physostigmine, basal forebrain lesions and intracortical grafts on a multiple-choice serial reaction time task. *Exp Brain Res* 89 (1992) 611-22.

- [481]M.L. Voytko, D.S. Olton, R.T. Richardson, L.K. Gorman, J.R. Tobin, and D.L. Price, Basal forebrain lesions in monkeys disrupt attention but not learning and memory. *J Neurosci* 14 (1994) 167-86.
- [482]G. Apostol, and O.D. Creutzfeldt, Crosscorrelation between the activity of septal units and hippocampal EEG during arousal. *Brain Res* 67 (1974) 65-75.
- [483]G. Buzsaki, R.G. Bickford, G. Ponomareff, L.J. Thal, R. Mandel, and F.H. Gage, Nucleus basalis and thalamic control of neocortical activity in the freely moving rat. *J Neurosci* 8 (1988) 4007-26.
- [484]R. Metherate, C.L. Cox, and J.H. Ashe, Cellular bases of neocortical activation: modulation of neural oscillations by the nucleus basalis and endogenous acetylcholine. *J Neurosci* 12 (1992) 4701-11.
- [485]J.E. Sweeney, Y. Lamour, and M.H. Bassant, Arousal-dependent properties of medial septal neurons in the unanesthetized rat. *Neuroscience* 48 (1992) 353-62.
- [486]F. Casamenti, G. Deffenu, A.L. Abbamondi, and G. Pepeu, Changes in cortical acetylcholine output induced by modulation of the nucleus basalis. *Brain Res Bull* 16 (1986) 689-95.
- [487]D.D. Rasmusson, K. Clow, and J.C. Szerb, Frequency-dependent increase in cortical acetylcholine release evoked by stimulation of the nucleus basalis magnocellularis in the rat. *Brain Res* 594 (1992) 150-4.
- [488]T. Mizuno, Y. Endo, J. Arita, and F. Kimura, Acetylcholine release in the rat hippocampus as measured by the microdialysis method correlates with motor activity and exhibits a diurnal variation. *Neuroscience* 44 (1991) 607-12.
- [489]E. Acquas, C. Wilson, and H.C. Fibiger, Conditioned and unconditioned stimuli increase frontal cortical and hippocampal acetylcholine release: effects of novelty, habituation, and fear. *J Neurosci* 16 (1996) 3089-96.
- [490]D. Quartermain, and P. Leo, Alleviation of scopolamine amnesia by different retrieval enhancing treatments. *Pharmacol Biochem Behav* 30 (1988) 1093-6.
- [491]A.I. Hersi, K. Kitaichi, L.K. Srivastava, P. Gaudreau, and R. Quirion, Dopamine D-5 receptor modulates hippocampal acetylcholine release. *Brain Res Mol Brain Res* 76 (2000) 336-40.
- [492]T. Weiss, R.W. Veh, and U. Heinemann, Dopamine depresses cholinergic oscillatory network activity in rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 18 (2003) 2573-80.
- [493]R. Bernabeu, L. Bevilacqua, P. Ardenghi, E. Bromberg, P. Schmitz, M. Bianchin, I. Izquierdo, and J.H. Medina, Involvement of hippocampal cAMP/cAMP-dependent protein kinase signaling pathways in a late memory consolidation phase of aversively motivated learning in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (1997) 7041-6.
- [494]O.S. Vinogradova, Hippocampus as comparator: role of the two input and two output systems of the hippocampus in selection and registration of information. *Hippocampus* 11 (2001) 578-98.
- [495]S.J. Martin, P.D. Grimwood, and R.G. Morris, Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annu Rev Neurosci* 23 (2000) 649-711.
- [496]J. Quevedo, M.R. Vianna, R. Roesler, F. de-Paris, I. Izquierdo, and S.P. Rose, Two time windows of anisomycin-induced amnesia for inhibitory avoidance training in rats: protection from amnesia by pretraining but not pre-exposure to the task apparatus. *Learn Mem* 6 (1999) 600-7.
- [497]F.M. Freeman, S.P. Rose, and A.B. Scholey, Two time windows of anisomycin-induced amnesia for passive avoidance training in the day-old chick. *Neurobiol Learn Mem* 63 (1995) 291-5.
- [498]J.F. Flood, G.E. Smith, E.L. Bennett, M.H. Alberti, A.E. Orme, and M.E. Jarvik, Neurochemical and behavioral effects of catecholamine and protein synthesis inhibitors in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 24 (1986) 631-45.

- [499]S. Monleon Verdu, M.C. Arenas Fenollar, C. Vinader Caerols, A. Ferrer Ano, and A. Parra Guerrero, Effects of anisomycin on inhibitory avoidance in male and female CD1 mice. *Psicothema* 20 (2008) 456-9.
- [500]M. Cammarota, L.R. Bevilaqua, J.H. Medina, and I. Izquierdo, Retrieval does not induce reconsolidation of inhibitory avoidance memory. *Learn Mem* 11 (2004) 572-8.
- [501]H.P. Davis, M.R. Rosenzweig, P.T. Kinkade, and E.L. Bennett, Effects of anisomycin on retention of the passive-avoidance habit as a function of age. *Exp Aging Res* 7 (1981) 33-44.
- [502]G. Grecksch, and H. Matthies, Two sensitive periods for the amnesic effect of anisomycin. *Pharmacol Biochem Behav* 12 (1980) 663-5.
- [503]L.M. Igaz, M.R. Vianna, J.H. Medina, and I. Izquierdo, Two time periods of hippocampal mRNA synthesis are required for memory consolidation of fear-motivated learning. *J Neurosci* 22 (2002) 6781-9.
- [504]F. Ballarini, D. Moncada, M.C. Martinez, N. Alen, and H. Viola, Behavioral tagging is a general mechanism of long-term memory formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (2009) 14599-604.
- [505]A. Mele, C. Castellano, V. Cestari, and A. Oliverio, Interaction between the NMDA competitive antagonist CPP and the dopaminergic system in one-trial inhibitory avoidance in C57BL/6 mice. *Neurobiol Learn Mem* 63 (1995) 143-8.
- [506]M. Pitkanen, J. Sirvio, E. MacDonald, S. Niemi, T. Ekonsalo, and P. Riekkinen, Sr., The effects of D-cycloserine and MK-801 on the performance of rats in two spatial learning and memory tasks. *Eur Neuropsychopharmacol* 5 (1995) 457-63.
- [507]D.M. Bannerman, M.A. Good, S.P. Butcher, M. Ramsay, and R.G. Morris, Distinct components of spatial learning revealed by prior training and NMDA receptor blockade. *Nature* 378 (1995) 182-6.
- [508]G.L. Collingridge, S.J. Kehl, and H. McLennan, Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus. *J Physiol* 334 (1983) 33-46.
- [509]R.A. Zalutsky, and R.A. Nicoll, Comparison of two forms of long-term potentiation in single hippocampal neurons. *Science* 248 (1990) 1619-24.
- [510]S.H. Wang, R.L. Redondo, and R.G. Morris, Relevance of synaptic tagging and capture to the persistence of long-term potentiation and everyday spatial memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (2010) 19537-42.
- [511]J. Viosca, D. Jancic, J.P. Lopez-Atalaya, and E. Benito, Hunting for synaptic tagging and capture in memory formation. *J Neurosci* 27 (2007) 12761-3.
- [512]S. Navakkode, S. Sajikumar, and J.U. Frey, Synergistic requirements for the induction of dopaminergic D1/D5-receptor-mediated LTP in hippocampal slices of rat CA1 in vitro. *Neuropharmacology* 52 (2007) 1547-54.
- [513]J.F. Guzowski, B.L. McNaughton, C.A. Barnes, and P.F. Worley, Environment-specific expression of the immediate-early gene *Arc* in hippocampal neuronal ensembles. *Nat Neurosci* 2 (1999) 1120-4.
- [514]J.F. Guzowski, T. Miyashita, M.K. Chawla, J. Sanderson, L.I. Maes, F.P. Houston, P. Lipa, B.L. McNaughton, P.F. Worley, and C.A. Barnes, Recent behavioral history modifies coupling between cell activity and *Arc* gene transcription in hippocampal CA1 neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (2006) 1077-82.
- [515]A. Vazdarjanova, B.L. McNaughton, C.A. Barnes, P.F. Worley, and J.F. Guzowski, Experience-dependent coincident expression of the effector immediate-early genes *arc* and *Homer 1a* in hippocampal and neocortical neuronal networks. *J Neurosci* 22 (2002) 10067-71.

- [516]A. Malayev, T.T. Gibbs, and D.H. Farb, Inhibition of the NMDA response by pregnenolone sulphate reveals subtype selective modulation of NMDA receptors by sulphated steroids. *Br J Pharmacol* 135 (2002) 901-9.
- [517]C.A. Barnes, G. Rao, and J. Shen, Age-related decrease in the N-methyl-D-aspartateR-mediated excitatory postsynaptic potential in hippocampal region CA1. *Neurobiol Aging* 18 (1997) 445-52.
- [518]M. Kollen, P. Dutar, and A. Jouvenceau, The magnitude of hippocampal long term depression depends on the synaptic location of activated NR2-containing N-methyl-D-aspartate receptors. *Neuroscience* 154 (2008) 1308-17.
- [519]D.A. Clayton, M.H. Mesches, E. Alvarez, P.C. Bickford, and M.D. Browning, A hippocampal NR2B deficit can mimic age-related changes in long-term potentiation and spatial learning in the Fischer 344 rat. *J Neurosci* 22 (2002) 3628-37.
- [520]R.W. Wong, M. Setou, J. Teng, Y. Takei, and N. Hirokawa, Overexpression of motor protein KIF17 enhances spatial and working memory in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2002) 14500-5.
- [521]W.C. Boon, J. Diepstraten, J. van der Burg, M.E. Jones, E.R. Simpson, and M. van den Buuse, Hippocampal NMDA receptor subunit expression and watermaze learning in estrogen deficient female mice. *Brain Res Mol Brain Res* 140 (2005) 127-32.
- [522]K. Okiyama, D.H. Smith, W.F. White, K. Richter, and T.K. McIntosh, Effects of the novel NMDA antagonists CP-98,113, CP-101,581 and CP-101,606 on cognitive function and regional cerebral edema following experimental brain injury in the rat. *J Neurotrauma* 14 (1997) 211-22.
- [523]S.M. Rodrigues, G.E. Schafe, and J.E. LeDoux, Intra-amygdala blockade of the NR2B subunit of the NMDA receptor disrupts the acquisition but not the expression of fear conditioning. *J Neurosci* 21 (2001) 6889-96.
- [524]T. Straube, V. Korz, D. Balschun, and J.U. Frey, Requirement of beta-adrenergic receptor activation and protein synthesis for LTP-reinforcement by novelty in rat dentate gyrus. *J Physiol* 552 (2003) 953-60.
- [525]S. Uzakov, J.U. Frey, and V. Korz, Reinforcement of rat hippocampal LTP by holeboard training. *Learn Mem* 12 (2005) 165-71.

Abreviaturas:

Ach: acetilcolina
AMPA: ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasol propionico
AP: antero-posterior
APV o AP5: ácido-5-fosfonovalerico o ácido D-amino-5-fosfonopentanoico
CA: Cuerno de Ammón
CaMK II: Calcio/calmodulina proteína kinasas II
CD: ciclo luz/oscuridad derecho
CI: ciclo luz/oscuridad invertido
CREB: proteínas que se unen a elementos de respuesta a AMPc
EPSP: potencial postsináptico excitatorio
FS: fase de sueño
FV: fase de vigilia
GABA: ácido gamma amino butírico
GD: Giro dentado
HFS: estimulación de alta frecuencia, del inglés *high frequency stimulation*
HSV-1: virus herpes simplex tipo 1
i.p.: intraperitoneal
IA: evitación inhibitoria, del inglés *inhibitory avoidance*
IH: intrahipocampo
KA: Kainato
LL: latero-lateral
LTD: depresión de larga duración, del inglés *long term depression*
LTM: memoria de larga duración, del inglés *long term memory*
LTP: potenciación de larga duración, del inglés *long term potentiation*
MWM: laberinto acuático de Morris, del inglés *Morris water maze*
NMDA: N-metil-D-aspartato
NR1: subunidad 1 del receptor NMDA
NR2: subunidades 2 del receptor NMDA
OF: campo abierto, del inglés *open field*
PKA: protein quinasa A
PRPs: proteínas relacionadas con la plasticidad sináptica (del inglés: *plasticity related proteins*)
RNMDA: receptor NMDA
RACHM: receptores muscarínicos de acetilcolina
SD-IA: evitación inhibitoria por descenso en un paso, del inglés *Step Down inhibitory avoidance*)
ST-IA: evitación inhibitoria de pasaje de compartimiento en un paso, del inglés *Step Through inhibitory avoidance*
STM: memoria de corta duración
STP: potenciación de corta duración, del inglés *short term memory*
STC: hipótesis de etiquetado sináptico y captura de proteínas de plasticidad (del inglés: *synaptic tagging and capture*)
te: test o prueba
tr: entrenamiento
WM: memoria de trabajo, del inglés *working memory*