



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

11281  
4  
cej

FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ESTUDIO SOBRE LOS EFECTOS DE NIVELES  
ALTOS Y BAJOS DE REFORZAMIENTO SOBRE  
LA AMNESIA EXPERIMENTAL

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMEDICAS  
( AREA DE FISIOLOGIA )  
P R E S E N T A :  
GINA LORENA QUIRARTE

DIRECTOR: DR. ROBERTO A. PRADO ALCALA

SINODALES: DR. JUAN JOSE BOLIVAR GONZALEZ  
DR. LEON CINTRA MCGLONE  
DRA. SOFIA DIAZ MIRANDA  
DRA. ROSALINDA GUEVARA GUZMAN  
DRA. DIETER MASCHER GRAMLICH  
DR. ROBERTO A. PRADO ALCALA  
DRA. SELVA LUCIA RIVAS ARANCIBIA

MEXICO, D. F. FALLA DE ORIGEN

1995

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

NO HAY MANERA DE SABER, ANTES DE EXPERIMENTAR.

DEDICATORIA

A ROBERTO

SOBRE TODO, PORQUE TE AMO



## AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi reconocimiento a las siguientes instituciones,  
por el apoyo que me brindaron para la realización del  
presente trabajo:

Laboratorio de Aprendizaje y Memoria, Departamento de Fisiología,  
Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.

Laboratorio de Psicobiología, Departamento de Neurociencias,  
Centro Universitario de Ciencias de la Salud,  
Universidad de Guadalajara.

Center for the Neurobiology of Learning and Memory,  
Bonney Center, University of California, Irvine, E. U. A.

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Beca No. 55298).

Dirección General de Asuntos del Personal Académico,  
Universidad Nacional Autónoma de México  
(Proyectos IN200993 e IN202094).

Programa de Apoyo a las Divisiones de Estudios de Posgrado,  
Universidad Nacional Autónoma de México  
(Proyectos 9114 y 012312).

Además quiero expresar mis más sinceros agradecimientos:

Al Dr. Roberto A. Prado Alcalá, por guiarme en el camino de la ciencia, por su valiosa dirección en la realización de mi investigación y sobre todo por enseñarme lo que es la libertad de trabajo.

Al Dr. James L. McGaugh, por permitirme ser parte de su grupo de trabajo, por su amistad y gran ejemplo.

A mis Sinodales, por la colaboración brindada, por sus comentarios y cuestionamientos.

A la Dra. Marise B. Parent; nuestra colaboración me permitió lograr dos cosas: crecer como científica y tener una gran amiga.

A toda mi Familia: papás, hermanos, tías, tíos, primos, primas y abuelitas, por su amor.

Al Mtro. Miguel Angel Guevara, por su gran apoyo y sus valiosas observaciones.

Al Dr. Salvador Hernández y la Dra. Mayra García por su apoyo, confianza y la amistad que siempre me han brindado.

A Nan Collett por su gran ayuda y por permitirme compartir su espacio familiar.

A la Familia Cantón Serna, por su cariño, confianza y ayuda incondicional.

A mis compañeros amigos de laboratorio, especialmente al Mtro. Gabriel Roldán por la revisión de mi trabajo.

A Isabel Rojas y Marco A. Guzmán por su participación en algunos experimentos y por su apoyo.

Al Dr. Jorge Arauz y demás autoridades académicas de la Universidad de Guadalajara, por su apoyo durante mis estudios de posgrado.

Al Sr. Joaquín Mendoza por su ayuda técnica.

## INDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCION	3
I. DE LA MEMORIA Y EL CEREBRO	6
II. OBJETIVO GENERAL DEL TRABAJO Y ANTECEDENTES	27
2.1 Las neuronas colinérgicas y la memoria	29
2.2 Alteraciones de la actividad colinérgica por tratamientos sistemicos	29
2.3 Alteraciones de la actividad colinérgica por tratamientos intracerebrales	33
2.3.1 Ch1, Ch2 e hipocampo	35
2.3.2 Ch2 y corteza	37
2.3.3 Estriado	40
2.4 El sobrentrenamiento y el sobrerreforzamiento protegen contra la amnesia inducida por el bloqueo colinérgico	43
2.5 La participación de la amígdala en los procesos de memoria	46
III. INTERACCIONES ENTRE LA MAGNITUD DEL REFORZAMIENTO Y TRATAMIENTOS QUE PRODUCEN MODIFICACIONES DE LA MEMORIA	74
3.1 Interacciones entre la magnitud del reforzamiento y tratamientos aplicados sistemicamente	76
3.2 Interacciones entre la magnitud del reforzamiento y tratamientos aplicados en estructuras cerebrales	83
IV. EL CONDICIONAMIENTO DE PREVENCION PASIVA EN UN ENSAYO COMO HERRAMIENTA PARA EL ESTUDIO DE LA MEMORIA	95

V.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y ANTECEDENTES RELEVANTES PARA LAS HIPOTESIS DE TRABAJO DEL EXPERIMENTO I	103
	HIPOTESIS	105
	EXPERIMENTO I: Protective Effect of under-reinforcement of passive avoidance against scopolamine-induced amnesia	106
VI.	ANTECEDENTES RELEVANTES PARA LAS HIPOTESIS DEL EXPERIMENTO II	110
	HIPOTESIS	112
	EXPERIMENTO II: Spared retention of inhibitory avoidance learning following posttraining amygdala lesions	113
VII.	DISCUSION GENERAL	129
	EXPERIMENTO I	129
	EXPERIMENTO II	133
	APENDICE	138
	ARTICULOS PUBLICADOS	

## RESUMEN

La proposición de que la activación de ciertas estructuras o sistemas neuroquímicos cerebrales específicos es necesaria para que se lleve a cabo la consolidación de la memoria es aceptada por todos los científicos involucrados en el estudio de este fenómeno. Sin embargo, recientemente este concepto ha sido puesto en tela de juicio a partir de una serie de resultados experimentales que aparentemente son incongruentes con dicha proposición.

Por ejemplo, se ha reportado que la lesión del núcleo caudado, así como la interferencia con su actividad colinérgica, producen estados amnésicos significativos. Por otra parte, dichos tratamientos son ineficaces para producir la amnesia, cuando los sujetos de experimentación son sometidos a un número relativamente elevado de sesiones de entrenamiento (sobrentrenamiento) o a estímulos nociceptivos de intensidad relativamente alta (sobrerreforzamiento).

El objetivo de esta tesis fue determinar: a) si al igual que el sobrerreforzamiento, el entrenamiento con bajos niveles de reforzamiento protege la formación de la memoria cuando se aplican tratamientos amnésicos; y b) si el efecto protector del sobrerreforzamiento también puede observarse cuando se producen lesiones irreversibles de la amígdala.

Se realizaron dos estudios; en el primero se inyectó escopolamina en animales que fueron entrenados en una tarea de evitación pasiva y en el segundo se lesionó la amígdala, por medio de la inyección local de NMDA, después de haber entrenado los animales en la misma tarea. En ambos estudios se emplearon niveles bajos, medios y altos de reforzamiento durante el entrenamiento.

Los resultados de la primera serie experimental permiten concluir que, efectivamente, los niveles de reforzamiento, tanto bajos como altos son efectivos para contrarrestar los efectos amnésicos del bloqueo colinérgico generalizado, cumpliéndose así las hipótesis planteadas en este trabajo. En contraste, independientemente del grado de reforzamiento, la lesión amigdalina produjo una deficiencia significativa en la retención de la tarea. Este resultado, aunado a otros reportados en la literatura concernientes a la lesión de la amígdala con NMDA, es interpretado en el sentido de que en la presente situación experimental no se estudió una escala amplia de intensidades, y que por lo tanto este factor no permitió observar el esperado efecto protector.

Estos resultados dan un apoyo parcial a la idea de que los diversos niveles de reforzamiento que median un aprendizaje modifican el funcionamiento cerebral, de tal manera que diferentes tratamientos amnésicos no son igualmente efectivos para alterar los procesos de memoria.

## ABSTRACT

The proposition that the activation of certain cerebral structures or neurochemical systems is necessary for the development of memory consolidation is accepted by all scientists working in this field. This concept has been recently challenged in view of recent experimental findings that seem to be incongruent with such proposition.

For example, it has been reported that the lesion of the caudate nucleus, as well as the interference with its cholinergic activity, produce amnesia. On the other hand, such treatments are ineffective in producing memory impairments when the experimental subjects are submitted to a relatively high number of training sessions (overtraining) or to aversive stimulation of relatively high intensities (overreinforcement).

The goal of this thesis was to determine: a) if as in the case of overreinforcement, training with low levels of reinforcement protects memory consolidation against the effect of amnesic treatments; and b) if the protective effect of overreinforcement can also be observed after lesions of the amygdala.

Two studies were carried out; in the first one scopolamine was injected to animals that had been trained in passive avoidance and in the second one the amygdala was lesioned with local injections of NMDA after training the animals in the avoidance task. In both cases, low, medium, and high levels of reinforcement were used during training.

The results of the first experimental series allow to conclude that high and low levels of reinforcement are effective in counteracting the amnesic effects of cholinergic blockade. In contrast, regardless of the degree of reinforcement, the amygdalar lesion induced a significant deficit in retention of the task. This result indicates that in the present experimental situation the range of aversive intensities was not broad enough to unmask the expected protective effect.

The findings reported in this thesis give partial support to the idea that diverse levels of reinforcement involved in learning modify cerebral functioning, in such a way that different amnesic treatments are not equally effective in altering memory processes.

## INTRODUCCION

La presente tesis está basada en una serie de trabajos desarrollados durante mis estudios de Doctorado en Ciencias Biomédicas, área de Fisiología, en la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

La finalidad de este trabajo es someter a prueba experimental la proposición de que los estados amnésicos inducidos por la interferencia con la actividad cerebral (producida por la aplicación de fármacos, lesiones, estimulación eléctrica u otros tratamientos), pueden ser evitados cuando las experiencias de aprendizaje se establecen mediante la aplicación de diferentes grados de reforzamiento. En otras palabras, en los estudios sobre la memoria de aprendizajes de tipo instrumental, generalmente los sujetos experimentales aprenden respuestas condicionadas que son mantenidas por la administración de niveles de reforzamiento suficientes para que dicho proceso se lleve a cabo, y es en esta condición cuando los tratamientos amnésicos ejercen su acción. Sin embargo, existen muy pocos estudios sistematizados acerca de las interacciones entre los efectos de diversos tratamientos experimentales y variaciones en la magnitud de los reforzadores utilizados durante el aprendizaje.

El estudio de las variaciones en el grado de reforzamiento y sus efectos sobre la memoria es una área nueva de investigación en las neurociencias, que posiblemente cambiará la conceptualización acerca de la manera en la que el sistema

nervioso central (SNC) maneja la información derivada del aprendizaje y, en consecuencia, de los procesos que subyacen el establecimiento (o consolidación) de la memoria.

Esta tesis está constituida por mis aportaciones a este campo, expresadas en una serie de artículos publicados, o en prensa, en los que se vierten tanto proposiciones teóricas como resultados experimentales referentes a los efectos de bajos y altos niveles de reforzamiento.

En el primer capítulo, a manera de introducción al problema, se presenta un breve desarrollo histórico acerca del estudio neurobiológico de la memoria, desde los primeros reportes experimentales del siglo pasado, hasta las nuevas concepciones teóricas que guían nuestra investigación.

En el Capítulo II se presentan el objetivo general del trabajo y los datos que apoyan la utilización de los dos modelos experimentales para producir amnesia: el bloqueo colinérgico generalizado y la lesión irreversible de la amígdala.

Los datos en los que se basa la proposición central de esta tesis, de que los cambios en la magnitud del reforzador interactúan con diversos tratamientos experimentales para modular el grado de consolidación de la memoria, se presentan en el Capítulo III.

La justificación para medir la consolidación de la memoria y la evocación de la información almacenada, con el procedimiento de prevención pasiva se plantea en el Capítulo IV.

Los antecedentes relevantes para las hipótesis de trabajo, las hipótesis mismas y los Experimentos 1 y 2 se presentan en los



Capítulos V y VI, respectivamente.

Las referencias bibliográficas correspondientes a cada capítulo aparecen al final de cada uno de ellos.

La discusión general de los hallazgos, y su relación con el marco teórico aparecen en el Capítulo VII. Finalmente, el apéndice está conformado por artículos adicionales, publicados o en prensa, escritos durante mis estudios de doctorado.

CAPITULO I

DE LA MEMORIA Y EL CEREBRO

Roberto A. Prado Alcalá<sup>1</sup> y Gina L. Quirarte<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Medicina, Departamento de Fisiología,  
Universidad Nacional Autónoma de México,  
Apdo. Postal 70-250, México, D. F. 04510

y

<sup>2</sup>Laboratorio de Psicobiología, Departamento de  
Neurociencias, Centro Universitario de Ciencias  
de la Salud, Universidad de Guadalajara,  
Guadalajara, Jalisco

## DE LA MEMORIA Y EL CEREBRO

Los organismos han podido sobrevivir en la medida en que han sido capaces de adaptarse a los cambios de su medio ambiente. Aquellas especies que no lograron desarrollar estrategias adecuadas para superar los desafíos a los que tuvieron que enfrentarse, son ahora especies extintas.

A lo largo del proceso evolutivo, se han desarrollado mecanismos funcionales que permiten el mantenimiento adecuado de la homeostasia, y se han mejorado las capacidades para detectar a las presas que suministran nutrimentos, así como a los depredadores de los que se debe huir. Los organismos están dotados de una eficaz capacidad reproductiva que permite la conservación de las especies. Además de contar con estos mecanismos, en muchos individuos del reino animal hubo un importante avance evolutivo que les ha ayudado a adaptarse mejor a su medio: *la memoria*, que permite el almacenamiento de las experiencias.

La memoria es esencial para la experiencia humana y ésta implica enlaces temporales: consideramos la experiencia de cada momento como una continuación del pasado reciente o remoto, así como una proyección hacia el futuro. De esta manera, la memoria representa la base para todo nuestro conocimiento, habilidades, ensueños, planes y esperanzas.

La primera referencia escrita conocida acerca del cerebro data del siglo XVII antes de la era común, y está contenida en un papiro egipcio, en el que se describen los síntomas, diagnosis y

prognosis de dos pacientes que presentaban fracturas en el cráneo (5). Podemos suponer que cuando menos desde esa época, nuestros ancestros se plantearon interrogantes acerca de la manera en que guardamos los recuerdos de nuestras experiencias.

Sin embargo, no fue sino casi 4000 años después (a finales del siglo XIX) cuando, en Europa, se sentaron las bases científicas para el estudio de la memoria.

En 1881 Ribot publicó la primera compilación global y sistemática de casos de amnesia humana y fue el primer intento para desarrollar, a partir de hechos, principios generales acerca de la organización de la memoria normal (37).

Poco después, en 1885 Ebbinghaus describió los primeros experimentos sistemáticos acerca de este fenómeno, que representan el primer intento serio para aplicar el método científico al estudio de los procesos cognitivos (10). Encontró que el aprendizaje, el recuerdo y el olvido seguían leyes precisas.

En 1887, Korsakoff publicó las primeras descripciones del síndrome amnésico que llevaría su nombre, y que hoy es el mejor conocido y más estudiado ejemplo de un síndrome amnésico (21).

En América, en 1890 (17), William James publicó los Principios de Psicología, en donde describía, entre otras cosas, la distinción entre las memorias primaria y secundaria (hoy conocidas como memorias de corto y de largo plazo), que más tarde se vincularían a la organización y función de sistemas cerebrales.

Ya en el presente siglo, las dos figuras que probablemente

dieron el mayor impulso al estudio de las bases biológicas de la memoria, fueron Karl Lashley y Donald Hebb.

En 1930 Lashley fundó el primer laboratorio de neuropsicología uniendo, literalmente, a la neurología y a la psicología. El trabajo pionero de Lashley (22) estuvo encaminado a determinar en qué lugar del cerebro se encontraba el asiento de la memoria. Su búsqueda se concentró, fundamentalmente, en la corteza cerebral. Después de un buen número de años de intenso trabajo experimental, concluyó que no existía un lugar específico encargado del almacenamiento de la información derivada de la experiencia de aprendizaje. Basado en sus resultados, propuso que las deficiencias observadas después de hacer lesiones de la corteza dependían de la cantidad de tejido lesionado (principio de acción de masas), independientemente de la zona cortical que había sido dañada (principio de equipotencialidad).

Por otra parte, Hebb (16) se interesó por los mecanismos subyacentes al almacenamiento de información. En 1949, basado en la idea expuesta por Santiago Ramón y Cajal (36), de que el aprendizaje involucraba la formación de nuevas conexiones entre neuronas, expuso su teoría de los ensambles celulares, y propuso que la memoria de corto plazo estaba mediada por circuitos neuronales reverberantes.

Su trabajo clásico, "La organización de la conducta", es generalmente considerado como el punto de partida para la suposición de que la plasticidad sináptica tiene un papel primordial en el almacenamiento de la información derivada de una experiencia. La hipótesis de que la sinapsis es el sitio crítico

del cambio plástico también fue expresada por Konorski, en 1948 (20).

Actualmente, explícita o implícitamente, el trabajo de los científicos interesados en el estudio de las bases biológicas de la memoria está centrado en la búsqueda del *engrama*, término introducido en el campo por el biólogo alemán Richard Semon en 1904. El *engrama* puede ser definido como el conjunto de cambios en el sistema nervioso que representan a la memoria almacenada (41).

Esta búsqueda ha originado dos grandes líneas de investigación: la primera pretende descubrir los *mecanismos fisiológicos* de los que depende el almacenamiento de la información, mientras que la segunda implica la determinación de las *estructuras cerebrales* involucradas en dicho almacenamiento.

Debido a las limitaciones de espacio, no podremos mencionar muchos estudios importantes en este campo y sólo haremos una breve relación de algunos casos que ejemplifican los avances que han dirigido la investigación actual en las neurociencias conductuales.

Con respecto a los posibles mecanismos involucrados en el establecimiento de la memoria, Kandel ha demostrado que los procesos de habituación y sensibilización (que son formas de aprendizaje muy simple) inducen cambios presinápticos que modifican la liberación de mediador químico<sup>1</sup> (19). También se ha -----

1. Un mediador químico, o neurotransmisor, es una sustancia que liberan los axones de las neuronas, y que ejerce su influencia en otras neuronas o músculos, excitándolos o inhibiéndolos.

propuesto que los cambios sinápticos dependen de eventos bioquímicos, ya que se ha demostrado que los inhibidores de la síntesis de proteínas impiden la formación de la memoria de largo plazo y que el aprendizaje induce un incremento en la incorporación de precursores de ARN o de proteínas marcadas en el cerebro (7).

Otros estudios han demostrado que ratas criadas en ambientes enriquecidos, en contraste con ratas criadas en condiciones de aislamiento, muestran un incremento en el peso y grosor corticales, en el tamaño del soma neuronal, en el número y longitud de las dendritas y en el diámetro de las terminaciones sinápticas. Este tipo de cambio morfológico también se observa en animales que han sido sometidos a situaciones formales de aprendizaje (38).

Otro ejemplo notable de cambio plástico derivado de una experiencia lo constituye la potenciación de largo plazo. Este fenómeno es un incremento en la respuesta sináptica por la estimulación eléctrica de una vía nerviosa. La potenciación de largo plazo en el hipocampo produce dos tipos de cambios estructurales: se incrementa el número de un tipo de sinapsis, y las espinas sinápticas se tornan más redondas (13). Estos cambios se pueden producir con unos cuantos minutos de estimulación y pueden persistir por días y aún por meses. Por estas razones, la potenciación de largo plazo es un buen candidato para un mecanismo de memoria.

En resumen, entre los *mecanismos fisiológicos* que subyacen al establecimiento de la memoria tenemos:

1. cambios en la cantidad de mediador químico liberado en las sinapsis que participan en el proceso.

2. incremento en la síntesis de proteínas neuronales, que se traducen en:

- a) incremento en el peso y grosor de la corteza cerebral
- b) aumento en la longitud y grosor de las dendritas,
- c) incremento en el diámetro de las terminaciones sinápticas,
- d) incremento en el número de receptores sinápticos

En cuanto a las regiones cerebrales en las que radica la memoria, existen dos corrientes que parecen ser excluyentes: la localizacionista, que postula que el engrama se encuentra en áreas discretas e invariantes del cerebro, y aquella que sostiene que la memoria está distribuida en *sistemas* de estructuras.

De nuevo, este espacio es muy restringido como para ofrecer un panorama completo acerca de este problema. En lugar de ello, presentaremos una reseña acerca de una línea de investigación, encaminada a encontrar el sitio en el que reside la memoria. Esta línea representa un ejemplo de cómo las concepciones teóricas acerca de la localización del engrama son modificadas en función de los datos experimentales. Los resultados que se fueron acumulando a lo largo de más de 20 años de investigación nos han llevado de la mano, desde una posición teórica localizacionista,



pasando a través de la de sistemas, hasta llegar a una postulación más avanzada, similar a la expuesta, entre otros, por E. Roy John (18). Su concepto fundamental, en su expresión más amplia, es que la memoria debe estar difusamente distribuida en muchas áreas del cerebro; es decir, cualquier neurona puede participar en el almacenamiento de memorias específicas en una manera probabilística.

Existe una gran cantidad de datos que indican que la acetilcolina (ACh), un mediador químico, está íntimamente relacionada con procesos de adquisición y consolidación de eventos aprendidos. La aplicación sistémica de drogas que bloquean los receptores colinérgicos cerebrales produce un espectacular cuadro amnésico, mientras que drogas que incrementan el tono colinérgico revierten dicho cuadro e inducen una mejoría en la capacidad de retención (para revisiones recientes se recomiendan las referencias 1, 2, 12, 31 y 43).

Estos datos indican que algunas estructuras cerebrales cuyas neuronas producen ACh, o reciben aferencias colinérgicas, deben estar involucradas en procesos de memoria. Tal es el caso. Tanto la corteza cerebral, el hipocampo y la amígdala reciben axones que liberan ese neurotransmisor; también el núcleo caudado<sup>2</sup> o

-----  
2. En los mamíferos superiores, el núcleo caudado es una estructura independiente del resto de los núcleos que conforman los gánглиos basales. En los roedores este núcleo se encuentra fusionado con el putamen; estas estructuras fusionadas reciben el nombre de neostriado, o simplemente estriado. Ya que en el presente trabajo se describirán experimentos realizados primordialmente en felinos y roedores, usaremos como sinónimos los términos núcleo caudado, caudado, neostriado y estriado.

neostriado (NE) es un núcleo que tiene pequeñas neuronas que sintetizan ACh, la cual es liberada dentro del propio núcleo. En todos los casos, el bloqueo de receptores colinérgicos en estas estructuras producen amnesia (31).

Analizaremos el caso del neostriado. Esta estructura forma parte de los ganglios basales, y como tal, tiene funciones de regulación de la actividad motora. Sin embargo, también es una estructura polisensorial, es decir, es activado por la estimulación periférica (táctil, visual, nociceptiva) y participa en la modulación de dichas entradas sensoriales. En otras palabras, es un núcleo que puede integrar la información que se deriva de una situación de aprendizaje.

Estas características funcionales del neostriado dieron la justificación para tratar de determinar si estaba involucrado en procesos mnémicos. Ahora sabemos que la lesión de este núcleo produce marcadas deficiencias en la adquisición y la retención de muchos tipos de aprendizaje (9). Como se indicó anteriormente, el estriado contiene una población de interneuronas que sintetizan y liberan acetilcolina.

La participación de la ACh estriatal en procesos de memoria está bastante documentada. El bloqueo de los receptores muscarínicos, que son un tipo de receptores colinérgicos, del neostriado produce deficiencias en la adquisición (24) y ejecución (34) de una tarea de prevención activa. La participación del neostriado en la prevención pasiva (en la cual los animales aprenden a evitar que se les aplique un leve choque eléctrico en las patas) también ha sido extensamente estudiada.

Se ha encontrado, consistentemente, que la aplicación de atropina o escopolamina<sup>3</sup> en la región anterodorsal de este núcleo, poco después del entrenamiento, produce un estado amnésico significativo (15, 30). El efecto amnésico de las inyecciones intraestriatales de atropina es tanto dependiente de la dosis como del tiempo: conforme la dosis del bloqueador se incrementa también se incrementa la deficiencia en la retención (14); cuando las inyecciones se administran más cercanas en tiempo al momento del entrenamiento, el estado amnésico es mayor (33).

Consistentes con estos resultados encontramos los datos reportados por Sandberg *et al.* (39). Estudiaron los efectos que sobre la prevención pasiva tiene la aplicación, en el neostriado, de AF64A (droga neurotóxica que destruye selectivamente las neuronas colinérgicas). Encontraron una profunda interferencia en la adquisición y retención de la tarea. Por el contrario, la facilitación de la actividad de la ACh del neostriado, inducida por la inyección intraestriatal de colina (substancia precursora de la ACh), produce una mejoría significativa en la retención y ejecución de este aprendizaje (11, 40). Como una confirmación de los resultados anteriores, Barker *et al.* (3) demostraron que la síntesis de la ACh del

-----  
3. Cuando la acetilcolina es liberada por un axón, ésta ejerce su acción ocupando receptores que se encuentran los elementos con los que hace contacto (otra neurona o un músculo). Dicha acción puede ser bloqueada por drogas que también ocupan los receptores mencionados. La atropina y la escopolamina pertenecen a esta familia de drogas.

neostriado está incrementada después del entrenamiento de prevención pasiva.

Con respecto a otros tipos de aprendizaje, la inyección intraestriatal de drogas anticolinérgicas produce deficiencias en la adquisición y ejecución de una tarea que consiste en presionar una palanca, para así recibir alimento (4, 35). Como en el caso de la prevención pasiva, la inyección de colina o de acetilcolina en el caudado también mejora significativamente el desempeño en esta tarea (28).

Como hemos visto, existen suficientes evidencias experimentales que apoyan la hipótesis de que tanto el neostriado como la ACh son necesarios para el establecimiento de la memoria. Sin embargo, una serie de estudios indicó que esta postulación no es generalizable a todas las situaciones en las que el aprendizaje se lleva a cabo.

En 1977 Prado-Alcalá y Cobos-Zapaín reportaron que inyecciones de atropina en el núcleo caudado no alteraron la ejecución de gatos que habían sido entrenados a presionar una palanca (27). Un estudio previo había demostrado que este tratamiento producía un estado amnésico en la misma especie animal, que habían sido entrenados en la misma tarea (35). La única diferencia entre esos dos experimentos era que los animales del primer estudio habían sido sobrentrenados (es decir, habían sido entrenados durante 30 sesiones, en lugar de las 10 ó 15 sesiones habituales).

Experimentos subsecuentes han confirmado el efecto protector del sobrentrenamiento. Ratas entrenadas a presionar una palanca,

durante 5, 15 ó 25 sesiones, fueron inyectadas en el neocórtex con escopolamina. Se encontró una deficiencia significativa en la retención en los grupos entrenados durante 5 y 15 sesiones, pero no se encontró ninguna deficiencia en el grupo entrenado durante 25 sesiones (32).

En un intento para determinar la generalidad del efecto protector de una experiencia de aprendizaje incrementada, los efectos de la atropina y la escopolamina inyectadas en el neocórtex se determinaron en ratas que habían sido entrenadas en la tarea de prevención pasiva. Primero, el conocido efecto amnésico de la escopolamina fue confirmado. Con el fin de incrementar la experiencia de aprendizaje, algunos grupos de ratas fueron entrenadas utilizando choques eléctricos de intensidades dos o cuatro veces mayores que las necesarias para establecer el aprendizaje y obtener el efecto amnésico de la escopolamina. En estas condiciones, la escopolamina fue totalmente inefectiva para producir cambios en la retención de la tarea (8, 14).

Estos hallazgos resultaron ser un fenómeno importante, nunca antes descrito, que tiene importantes implicaciones teóricas acerca del funcionamiento del sistema nervioso. Es decir, estamos ante una situación en la cual un sistema neuroquímico que es esencial para el establecimiento de la memoria, deja de ser necesario para que se desarrolle ese proceso cuando la experiencia de aprendizaje se incrementa (por haberse incrementado el valor del reforzador empleado).

En otras palabras, este conjunto de datos indica que: a) la

ACh estriatal es necesaria para la adquisición, consolidación y ejecución de conductas aprendidas; y b) en condiciones de sobrentrenamiento (incremento en el número de sesiones de entrenamiento) o de sobrerreforzamiento (incremento en la estimulación nociceptiva), esas funciones mnémicas pueden desarrollarse sin la participación de la ACh del neostriado. Estos datos también indican que durante una experiencia incrementada otros sistemas neuroquímicos, localizados fuera del estriado, suplen las funciones que habían estado mediadas por la acetilcolina estriatal.

Para someter a la prueba experimental esta última posibilidad, decidimos producir una interferencia generalizada del funcionamiento del caudado, inyectando xilocaína o altas concentraciones de cloruro de potasio en esta estructura<sup>4</sup>. Como era de esperarse, estos tratamientos produjeron un marcado estado amnésico en animales sometidos a un entrenamiento "normal", pero fueron totalmente inefectivos para alterar la memoria cuando los animales fueron sobrentrenados o sobrerreforzados (26, 29, 32).

El efecto protector del incremento en la experiencia de aprendizaje también se ha encontrado al explorar otras áreas cerebrales. Por ejemplo, se han publicado reportes en los que se describe que la interferencia con la actividad sináptica de la

-----  
4.El cloruro de potasio, en altas concentraciones induce una desorganización en la actividad neuronal, lo cual impide que se realicen funciones integrativas, necesarias para la consolidación de la memoria. La xilocaína es un anestésico local que, al aplicarse en núcleos cerebrales, tiene un efecto equivalente al del cloruro de potasio.

amígdala (25, 42), el tálamo (23) y la sustancia nigra (6), produce deficiencias en la memoria, y que dicha interferencia es inocua cuando los sujetos de experimentación son sobrentrenados o sobrerreforzados.

¿Cómo podemos integrar toda esta información en el contexto de la localización del engrama? Desde nuestro punto de vista, estos datos son suficientes para permitir la propuesta de un modelo teórico que puede explicar los fenómenos que probablemente ocurren en el sistema nervioso central durante el aprendizaje de tareas mediadas por entrenamiento normal e incrementado (sobrentrenamiento y sobrerreforzamiento).

Proponemos que la actividad colinérgica estriatal es indispensable para la adquisición de respuestas condicionadas en las que el número de ensayos o sesiones de entrenamiento sea suficiente para que se logre una ejecución asintótica, así como para aquellas tareas en las que se aplican estímulos nociceptivos de intensidad suficiente para que los animales aprendan a evitarlos. En estas situaciones, como ya vimos, la actividad de otras estructuras cerebrales también es esencial para el establecimiento de la memoria (entre ellas, el hipocampo, la amígdala y la sustancia nigra). En otras palabras, estas estructuras estarían conectadas *en serie*, de tal manera que la lesión o cualquier otro tipo de manipulación que interfiera con el funcionamiento normal de cualquiera de ellas, tendrá como consecuencia la incapacidad para el establecimiento permanente de la memoria.

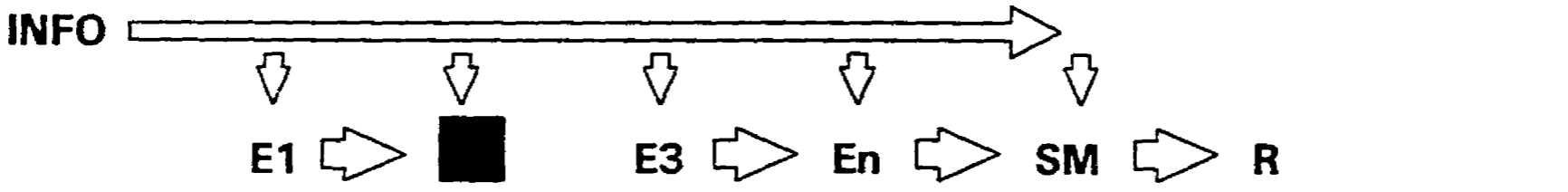
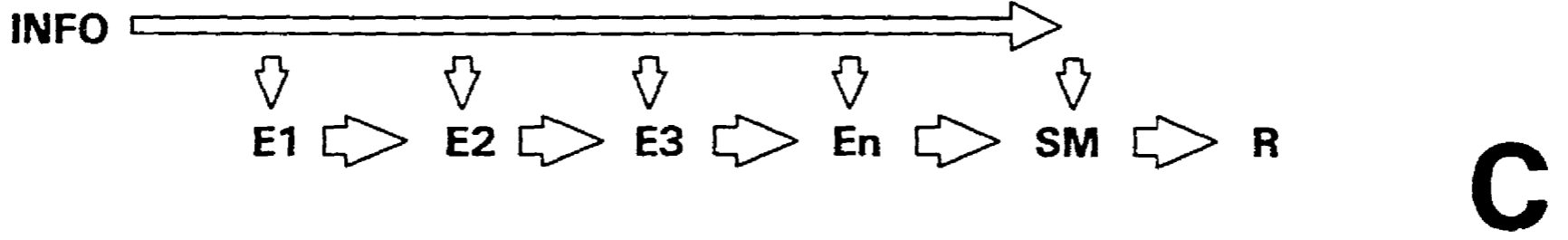
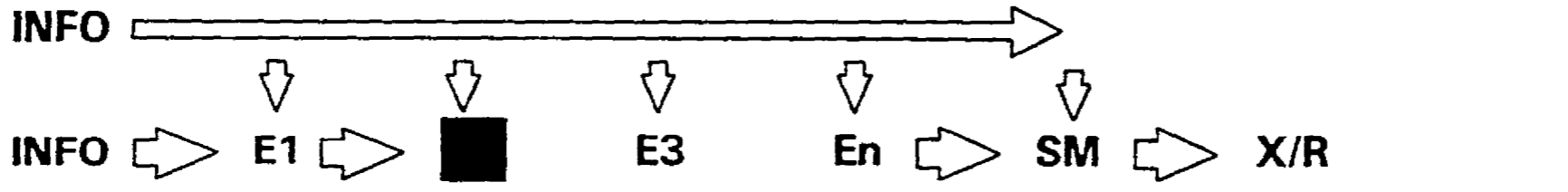
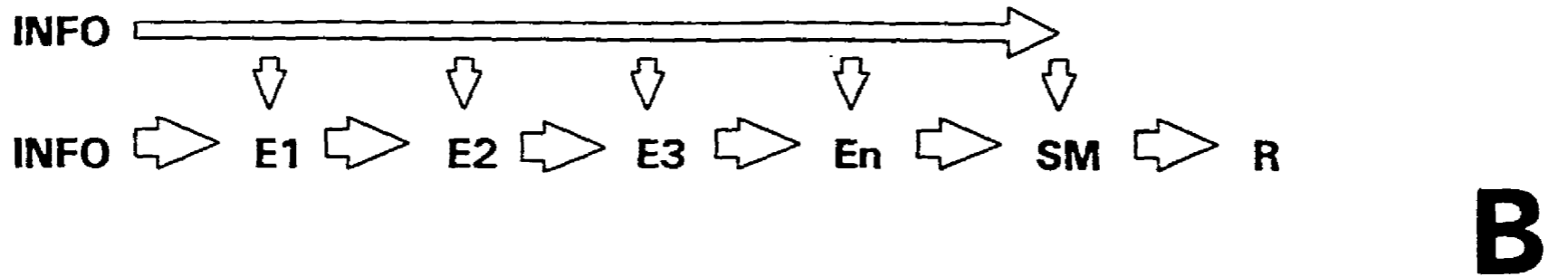
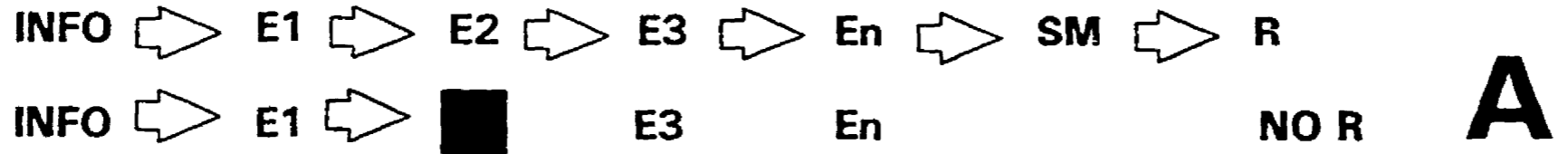
En la medida en que las experiencia de un aprendizaje

particular se repite (sobrentrenamiento), o cuando la intensidad de los estímulos adversivos que se aplican durante aprendizajes del tipo de la prevención pasiva se incrementa (sobrerreforzamiento), entonces las mismas estructuras (y probablemente algunas otras estructuras) también participan en la consolidación de la memoria. Sin embargo, en estas circunstancias ninguna de ellas es esencial para que se presente el fenómeno mnémico, ya que la activación de sólo algunas de ellas será suficiente. En otras palabras, cuando un sujeto es sometido a una experiencia incrementada de aprendizaje las estructuras involucradas sufren un rearrreglo funcional, comportándose como si estuviesen conectadas *en paralelo*. Así a pesar de que alguna o algunas de esas regiones cerebrales no tenga una actividad normal, la información derivada de la experiencia de aprendizaje podrá llegar a las otras estructuras, las cuales se encargarán de que los procesos mnémicos correspondientes se lleven a cabo. Este nuevo modelo que proponemos está representado esquemáticamente en la Figura 1.



### Figura 1

Representación esquemática del modelo propuesto, que explica la manera en que la memoria se establece en condiciones de bajo entrenamiento, y durante procesos de sobrentrenamiento y sobre-reforzamiento. En el caso A, durante la adquisición de un aprendizaje, las estructuras (E1, E2, E3... En) involucradas en el procesamiento y/o almacenamiento de la información (INFO) están conectadas funcionalmente *en serie*, de tal manera que es necesaria la participación de todas y cada una de ellas para que este proceso se lleve a cabo y así sea posible la ejecución de la respuesta aprendida (R) una vez que se han activado los sistemas motores correspondientes (SM). Cuando se interfiere con la actividad de cualquiera de ellas (■), cesa el flujo de información necesaria para la consolidación de la memoria y no es posible observar la respuesta aprendida (NO R). Conforme se incrementa la experiencia de aprendizaje, la información derivada de la situación sigue dos rutas: la original (a través de las estructuras conectadas en serie) y, en virtud de una reorganización funcional, parte de la información también sigue por una vía adicional, en paralelo con la anterior. Para que se consolide la memoria es necesario que ambas vías sean activadas, como se muestra en B. Cuando alguna de las estructuras del sistema deja de funcionar normalmente, entonces sólo se integrará la información que fluye a través de la nueva conexión funcional (en paralelo), de tal manera que se perderá parte de la información y sólo habrá una consolidación parcial, que se traducirá en una deficiencia en la ejecución de la respuesta (X/R). Por último, cuando el aprendizaje se ha establecido perfectamente, a través del sobrentrenamiento o sobre-reforzamiento, ocurre lo que se representa en C. Ahora la información ingresa al sistema sólo a través de las nuevas conexiones que dieron lugar a la activación en paralelo. Si en estas condiciones se interfiere con la actividad de alguna de las estructuras del sistema, el resto de las estructuras tendrá acceso a la información, estableciéndose la consolidación de la memoria y, por ende, se podrá manifestar la respuesta. En esta situación, a pesar de que todas las estructuras participan en el proceso, ninguna de ellas es *indispensable* para que éste se realice.



### REFERENCIAS

1. Bammer, G. (1982). Pharmacological investigations of neurotransmitter involvement in passive avoidance responding: A review and some new results. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 6:247-296..
2. Bartus, R. T., Dean, R. L., Pontecorvo, M. J. y Flicker, C. (1985). The cholinergic hypothesis: A historical overview, current perspectives, and future directions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 44:332-358.
3. Barker, L.A., Glick, S.A., Green, J.P. y Khandelwal, J. (1982). Acetylcholine metabolism in the rat hippocampus and striatum following one-trial passive training. *Neuropharmacology* 21:183-185.
4. Bermúdez-Rattoni, F., Mujica-Gonzalez, M. y Prado-Alcalá, R.A. (1986). Is cholinergic activity of the striatum involved in the acquisition of positively-motivated behaviors? *Pharmacol. Biochem. Behav.* 24:715-719.
5. Breasted, J.H. *The Edwin Smith Surgical Papyrus* (1930). The University of Chicago Press, Chicago.
6. Cobos-Zapalaín, G. G., y Prado-Alcalá, R. A. (1986). Aplicación de picrotoxina en la sustancia nigra reticulada: efectos sobre la memoria de largo plazo, en una tarea sobretrenada, XXIV Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas, México.
7. Davis, W. J. y Squire, L. R. Squire. (1984). Protein synthesis and memory: A review. *Psychol. Bull.* 96:518-559.
8. Díaz del Guante, M.A., Rivas-Arancibia, S., Quirarte, G. y Prado-Alcalá, R.A. (1990). Over-reinforcement protects against memory deficits induced by muscarinic blockade of the striatum. *Bol. Estud. Méd. Biol. Méx.* 38:49-53.
9. Divac, I. y Oberg, R. G. E. (1979). *The Neostriatum*. Oxford, Pergamon Press.
10. Ebbinghaus, H. (1913). *Memory, a Contribution to Experimental Psychology, 1885*. Traducido por H. A. Ruger y C. E. Bussenius. New York: Teachers College, Columbia University, New York.
11. Fernández, S. M., Solodkin, H. M. y Prado-Alcalá, R. A. (1977). Blockade and activation of caudate cholinergic activity. Effects on passive avoidance. *Neurosci. Abstr.* 3:232.

12. Fibiger, H. C. (1991). Cholinergic mechanisms in learning, memory and dementia: a review of recent evidence. *Trends Neurosci.* 14:220-223.
13. Greenough, W. T. (1984). Structural correlates of information storage in the mammalian brain: A review and hypothesis. *Trends in Neurosci.* 7:229-233.
14. Giordano, M. y Prado-Alcalá, R. A. (1986). Retrograde amnesia induced by post-trial injection of atropine into the caudate-putamen. Protective effect of the negative reinforcer. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 24:905-909.
15. Haycock, J. W., Deadwyler, S. A., Sideroff, S. I., y McGaugh, J. L. (1973). Retrograde amnesia and cholinergic systems in the caudate-putamen complex and dorsal hippocampus of the rat. *Exp. Neurol.* 41:201-213.
16. Hebb, D. O. (1949). *The Organization of Behaviour.* Wiley, New York.
17. James, W. (1890). *Principles of Psychology.* Holt, New York.
18. John, E. R. (1972). Switchboard versus statistical theories of learning and memory. *Science* 177:850-864.
19. Kandel, E. R. y Schwartz, J. H. (1982). Molecular biology of learning: Modification of transmitter release. *Science* 218:433-442.
20. Konorski, J. (1948). *Conditioned Reflexes and Neuron Organization.* Cambridge University Press, Cambridge.
21. Korsakoff, S. S. (1887). Disturbance of psychic function in alcoholic paralysis and its relation to the disturbance of the psychic sphere in multiple neuritis of non-alcoholic origin. *Vestn. Psichiatrii* 4:fascículo 2.
22. Lashley, K. S. (1950). In search of the engram. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 4:454-482.
23. Markowitsch, H. J., Kessler, J., y Streicher, M. (1985). Consequences of serial cortical, hippocampal, and thalamic lesions and of different lengths of overtraining on the acquisition and retention of learning tasks. *Behav. Neurosci.* 99:233-256.
24. Neill, D. B. y Grossman, P. S. (1970). Behavioral effects of lesions or cholinergic blockade of dorsal and ventral caudate of rats. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 71:311,317.

25. Parent, M. B., Tomaz, C. y McGaugh, J. L. (1992). Increased training in an aversively motivated task attenuates the memory-impairing effects of posttraining N-methyl-D-aspartate-induced amygdala lesions. *Behav. Neurosci.* 106:789-797.

26. Pérez-Ruiz, C. y Prado-Alcalá, R. A. (1989). Retrograde amnesia induced by lidocaine injection into the striatum: Protective effect of the negative reinforcer. *Brain Res. Bull.* 22:599-603.

27. Prado-Alcalá, R. A. y Cobos-Zapíaín, G. G. (1977). Learning deficits induced by cholinergic blockade of the caudate nucleus as a function of experience. *Brain Res.* 138:190-196.

28. Prado-Alcalá, R. A. y Cobos-Zapíaín, G. G. (1979a). Improvement of learned behavior through cholinergic stimulation of the caudate nucleus. *Neurosci. Lett.* 14:253-258.

29. Prado-Alcalá, R. A. y Cobos-Zapíaín, G. G. (1979b). Interference with caudate nucleus activity by potassium chloride. Evidence for a "moving" engram. *Brain Res.* 172:577-583.

30. Prado-Alcalá, R. A., Cruz-Morales, S. E., y López-Miro, F. A. (1980a). Differential effects of cholinergic blockade of anterior and posterior caudate nucleus on avoidance behaviors. *Neurosci. Lett.* 18:339-345.

31. Prado-Alcalá, R. A., Fernández-Ruiz, J. y Quirarte, G. L. (1993). Cholinergic neurons and memory. En: T. W. Stone (ed), *Synaptic Transmission 2*. Taylor and Francis, London, pp. 57-69.

32. Prado-Alcalá, R. A., Kaufmann, P. y Moscona, R. (1980b). Scopolamine and KCl injections into the caudate-putamen. Overtraining-induced protection against deficits of learning. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 12:249-253.

33. Prado-Alcalá, R. A., Signoret, L., y Figueroa, M. (1981). Time-dependent retention deficits induced by post-training injections of atropine into the caudate nucleus. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 15:633-636.

34. Prado-Alcalá, R. A., Cepeda, G., Verduzco, L., Jiménez, A. y Vargas-Ortega, E. (1984). Effects of cholinergic stimulation of the caudate nucleus on active avoidance. *Neurosci. Lett.* 51:31-36.

35. Prado-Alcalá, R. A., Grinberg, Z. J., Alvarez-Leefmans, F. J., Gómez, A., Singer, S. y Brust-Carmona, H. (1972). A possible caudate-cholinergic mechanism in two instrumental conditioned responses, *Psychopharmacologia (Berl.)* 25:339-346.

36. Ramón y Cajal, S. (1911). *Histologie du Systeme Nerveux de L'homme et des Vertebrates*. Maloine, Paris.

37. Ribot, T. (1881). *Les Maladies de la Memoire*. Germer Baillere, Paris. Traducido al inglés: (1882) *Diseases of Memory*. Appleton Century Crofts, New York).

38. Rosenzweig, M. R. (1979). Responsiveness of brain size to individual experience. Behavioral and evolutionary implication. En: M. E. Hahn, C. Jensen y B. Dudek (eds), *Development and Evolution of Brain Size: Behavioral Implications*. Academic Press, New York, pp. 263-294.

39. Sandberg, K., Sanberg, P. R., Hanin, I., Fisher, A. y Coyle, J. T. (1984). Cholinergic lesion of striatum impairs acquisition and retention of a passive avoidance response. *Behav. Neurosci.* 98:162-165.

40. Solana-Figueroa, R. y Prado-Alcalá, R. A. (1990). Retrograde amnesia produced by intrastriatal atropine and its reversal by choline. *Life Sci.* 46:679-686.

41. Squire, L. R. (1987). *Memory and Brain*. University Press, Oxford.

42. Thatcher, R. W., y Kimble, D. P. (1966). Effect of amygdaloid lesions on retention of an avoidance response in overtrained and non-overtrained rats. *Psychonomic Sci.* 6:9-10.

43. Warburton, D. M. y Wesnes, K. (1984). Drugs as research tools in Psychology: Cholinergic drugs and information processing. *Neuropsychobiology* 11:121-132.

## CAPITULO II

### OBJETIVO GENERAL DEL TRABAJO

En la introducción de este trabajo se estableció que el funcionamiento del sistema colinérgico del SNC no es necesario para que se establezca la consolidación de la memoria cuando los sujetos experimentales son sometidos a una situación de aprendizaje incrementado, es decir, a un sobrerreforzamiento o a un sobrentrenamiento. Estos resultados también han sido interpretados en el sentido de que las experiencias de aprendizaje incrementado protegen a los animales contra las intervenciones o tratamientos que habitualmente producen amnesia. Los únicos estudios sistemáticos a este respecto se refieren a tareas sobrerreforzadas o sobrentrenadas cuya consolidación fue probada bajo los efectos: a) del bloqueo generalizado de la actividad colinérgica; b) del bloqueo colinérgico del neostriado; c) del bloqueo generalizado del estriado (en todos estos casos se utilizó una tarea de prevención pasiva de un ensayo, y sólo en las condiciones de los incisos b y c también se analizó la conducta operante de presionar una palanca); y d) de la lesión permanente de la amígdala (en este caso se estudió una tarea de prevención pasiva de múltiples ensayos).

En una revisión exhaustiva de la literatura pertinente, no logramos encontrar trabajos en los que se haya estudiado la interacción entre entrenamientos con bajos niveles de

reforzamiento y tratamientos amnésicos. El único experimento relacionado con este problema es el descrito por Valle (1980), en el que describe el efecto de la microinyección de escopolamina en el neostriado de ratas con una ejecución muy baja, en una tarea de presionar una palanca. Encontró que el tratamiento no produjo cambio alguno en la ejecución, es decir, no produjo la amnesia esperada (que comunmente se encuentra en animales con un nivel normal de respuestas, como se explicó en el Capítulo I). Por lo anterior, resulta importante establecer la posible generalización de este importante hallazgo.

Los objetivos generales de esta tesis son: a) determinar si, al igual que el sobrerreforzamiento, el entrenamiento con bajos niveles de reforzamiento tiene un efecto protector de la memoria; b) corroborar el efecto protector del sobrerreforzamiento.

Para lograr ambos objetivos, se recurrió al estudio de los posibles efectos protectores de experiencias de aprendizaje bajo y de aprendizaje incrementado, en dos modelos típicos que se utilizan para estudiar procesos de amnesia: el bloqueo generalizado de la actividad colinérgica y la lesión irreversible de la amígdala. En ambos casos, los animales de experimentación fueron sometidos a un entrenamiento de prevención pasiva en un ensayo, utilizando niveles bajos, normales y altos de un reforzador negativo.

En las siguientes secciones se hará una revisión acerca de los modelos mencionados.



## ANTECEDENTES GENERALES DEL TRABAJO

### 2.1. LAS NEURONAS COLINERGICAS Y LA MEMORIA

(ver apéndice 1).

Esta sección no pretende presentar una revisión exhaustiva acerca de la literatura relacionada con la participación de neuronas colinérgicas en la memoria. Se presentarán ejemplos seleccionados que permiten postular que la acetilcolina (ACh) participa en los procesos superiores del sistema nervioso, aunque también se presentarán evidencias conflictivas; se recomienda leer las revisiones de Bammer (1982), Bartus et al. (1985), Fibiger (1991), Overstreet (1984), Prado-Alcalá (1985) y de Warburton y Wesnes (1984). Se argumentará que la ACh del sistema nervioso central no es necesaria para la consolidación de la memoria que involucra una experiencia incrementada, adquirida a través del sobrentrenamiento o el sobrerreforzamiento.

### 2.2. ALTERACION DE LA ACTIVIDAD COLINERGICA POR TRATAMIENTOS SISTEMICOS.

El trabajo pionero de Anthony Deutsch sugirió convincentemente que el establecimiento de la memoria es dependiente de un nivel óptimo de ACh en las sinapsis involucradas en este proceso: si el nivel de transmisor es bajo, como lo es en el caso de una conducta aprendida recientemente o durante el olvido, los inhibidores de la colinesterasa mejoran la memoria; si, por otro lado, el nivel de transmisor es alto (como podríamos esperar en el caso de respuestas bien aprendidas) un

exceso de ACh produce un deterioro en la memoria (Deutsch, 1971).

Existe una gran cantidad de reportes que demuestran que la administración de drogas anticolinérgicas producen amnesia. Una de las pruebas conductuales más comúnmente usadas en este campo es la prevención pasiva en un ensayo; en la mayoría de los casos se produce un profundo estado amnésico por inyecciones de escopolamina pre y post entrenamiento (e.g., Durán-Arévalo et al., 1990; Rush, 1988; Spignoli et al., 1987), aunque también se han publicado algunos resultados negativos (Lewis and Bregman, 1972; Myers, 1965).

En años recientes, los efectos de algunas manipulaciones colinérgicas sobre la memoria han sido probadas sobre la adquisición y ejecución de tareas entrenadas en laberintos convencionales, en el laberinto radial y en el laberinto acuático de Morris. Estos procesos superiores también han sido alterados importantemente por bloqueadores colinérgicos (Lamberty and Gower, 1991; Spangler et al., 1986). En este contexto hay, sin embargo, algunos resultados negativos (Hagan et al., 1986).

Dado que el bloqueo de receptores colinérgicos induce un estado amnésico, uno esperaría encontrar el efecto opuesto por la administración de drogas que facilitan la transmisión colinérgica. En efecto, este es el caso. Inyecciones de compuestos que estimulan la liberación de ACh, ya sea directamente o a través del bloqueo de autoreceptores muscarínicos (los cuales inhiben la liberación de ACh), mejoran significativamente la respuesta de prevención pasiva en ratas normales, así como la memoria de corto plazo en ratas viejas con

pobre ejecución. Efectos equivalentes sobre la prevención pasiva se han observado después de la administración de la anticolinesterasa fisostigmina (Davis et al., 1983; Gower, 1987).

Un hallazgo interesante fue el publicado recientemente por Packard et al. (1990). Ellos encontraron que la inyección aplicada después del entrenamiento de AF-DX116, un antagonista de los receptores muscarínicos M2, mejora la memoria de la tarea de el laberinto radial de ocho brazos en una forma dependiente del tiempo. Sus resultados junto con los de Gower (1987), demuestran que el mejoramiento de la memoria puede conseguirse no solo con la activación de los receptores de ACh, sino también por el bloqueo de los receptores muscarínicos. Esta es una aproximación novedosa al estudio de los desórdenes de la memoria, que debe ser investigada más a fondo.

Otra línea de experimentación que ha atraído la atención de trabajadores en esta área de investigación es el estudio de tratamientos que pueden aminorar los estados amnésicos. Se ha encontrado que las drogas que facilitan la actividad sináptica de la ACh revierten las disfunciones mnemónicas inducidas experimentalmente. De nuevo parece que la prueba conductual de elección es el aprendizaje de prevención pasiva.

Por ejemplo, se ha reportado que la administración de escopolamina antes del entrenamiento produce amnesia de la prevención pasiva. Los agonistas colinérgicos oxotremorina, arecolina y BM-5 antagonizan este efecto amnésico. Del mismo modo, inyecciones de AF64A (el ion aziridium de la mostaza de etilcolina, un inhibidor irreversible de la captura de colina de

alta afinidad en las terminales nerviosas colinérgicas; Fisher, 1986) en de los ventrículos cerebrales tiene como resultado deterioros en la retención de la tarea de prevención pasiva. La arecolina y la fisostigmina (Yamasaki et al., 1991), así como la AF102B (un agonista del tipo M1 de alta selectividad) revirtieron el deterioro producido por AF64A (Fisher et al., 1991). El deterioro inducido por la escopolamina fue también revertido por THA, un compuesto que inhibe la acetilcolinesterasa y bloquea la unión específica a los receptores tipo M<sub>1</sub> y M<sub>2</sub> (Nielsen et al., 1989).

Otras de las pruebas conductuales que han sido estudiadas en relación a la protección en contra de la amnesia son el laberinto acuático y el laberinto en T. Nuevamente, la AF102B y su transisomero AF102A revirtieron el deterioro producido por AF64A en las memorias de referencia y de trabajo, en el laberinto acuático de Morris (Fisher et al., 1991). De manera similar la inyección intraventricular de hemicolinium-3 deteriora el aprendizaje espacial en el laberinto acuático. La THA, fisostigmina, arecolina y oxotremorina antagonizan tal deterioro del aprendizaje (Hagan et al., 1989). Como se esperaba, la administración de AF64A deterioró significativamente las funciones de memoria relacionadas con la ejecución del laberinto en T de una tarea de alternación retardada. La AF102B fue efectiva en el mejoramiento de los deterioros en la adquisición y ejecución (Nakahara et al, 1989).

Tomados en conjunto, estos y otros datos nos permiten aceptar el concepto de que las neuronas que liberan ACh juegan un

papel muy importante en los procesos de memoria. La comprensión de los mecanismos a través de los cuales este neurotransmisor participa en la cognición está lejos de completarse. En un intento por definir los sitios de acción de aquellos compuestos que interfieren o mejoran las funciones de memoria, varios grupos de científicos han explorado los efectos de lesiones y manipulaciones farmacológicas de estructuras cerebrales sobre el aprendizaje y la memoria.

### 2.3. ALTERACION DE LA ACTIVIDAD COLINERGICA POR TRATAMIENTOS INTRACEREBRALES.

Mesulam (1990) ha identificado y clasificado ocho grupos neuronales que contienen ACh, los cuales proyectan a diferentes estructuras del sistema nervioso central.

El primer grupo colinérgico neuronal es llamado Ch1, y se encuentra en el núcleo septal medial. El segundo CH2 está representado por neuronas colinérgicas de la rama vertical del núcleo de la banda diagonal de Broca. Tanto Ch1 y Ch2 proyectan al hipocampo.

El grupo Ch3 se encuentra en la rama horizontal del núcleo de la banda diagonal de Broca, y sus axones llegan al bulbo olfatorio.

Las aferencias colinérgicas de la corteza cerebral y de la amígdala se originan en el grupo Ch4; en la rata, se identifica como núcleo basalis magnocelularis (NBM), y en el humano como núcleo basal de Meynert.

Los núcleos pedúnculo pontino y tegmental lateral dorsal

constituyen los grupos colinérgicos Ch5 y Ch6, respectivamente; estos grupos proyectan al tálamo y a regiones límbicas y corticales.

Finalmente, Ch7 y Ch8 se localizan, respectivamente, en el núcleo habenular medial el cual proyecta al núcleo interpeduncular, y en el núcleo parabigeminal que envía fibras eferentes al colículo superior.

Esta clasificación no toma en cuenta todas las neuronas colinérgicas. Existen estructuras con interneuronas colinérgicas, cuyos axones no van más allá de los límites de estas estructuras. Tal es el caso del neostriado.

Como se pudo ver, existen tres tipos de estructuras que contienen ACh: aquellas en las que residen los cuerpos celulares de neuronas colinérgicas, aquellas que son blancos de las fibras colinérgicas, y las que sintetizan y utilizan su ACh endógena.

Tres de los ocho grupos colinérgicos están involucrados de manera importante en funciones de memoria, que son los grupos Ch1, Ch2 y Ch4. Recientemente, se ha explorado la posible participación de los otros grupos, como es el caso del grupo Ch5 (núcleo pedúnculo pontino), cuyas lesiones producen deterioro en el laberinto acuático y radial (Dellu et al., 1991)

A continuación se presenta una pequeña revisión del papel de Ch1, Ch2 y Ch4 y sus respectivas estructuras colinoceptivas en el aprendizaje y la memoria. También se hará una revisión de la ACh estriatal en las funciones mnémicas.

### 2.3.1 Ch1, Ch2 E HIPOCAMPO

Los grupos Ch1 Y Ch2 representan las principales entradas colinérgicas al hipocampo. Lesiones del área septal inducen una reducción de la ACh hipocámpica y de la acetilcolintransferasa (ChAt). Estas lesiones producen deficiencias en aprendizaje y memoria, por ejemplo, bajo nivel de adquisición de una tarea de discriminación visual (Meyer et al., 1982) y ejecución pobre de tareas que involucran memoria de trabajo y memoria espacial de referencia (Riekkinen et al., 1991).

Las lesiones de la vía septo-hipocámpica también producen deterioro en el laberinto radial así como en el contenido de ACh en el hipocampo (Cassel et al., 1990; Howard et al., 1989), interfiere con la ejecución de pruebas de referencia espacial, navegación espacial y memoria de trabajo, las cuales se han correlacionado con la captura de alta afinidad (Tarricone et al., 1991). Las deficiencias de la memoria en monos, puestas de manifiesto por una mala ejecución en el "Wisconsin General Test Apparatus" también se han reportado después de las lesiones de esta vía (Ridley et al., 1991).

Otra aproximación al estudio de la participación de la ACh en procesos de memoria ha sido la utilización de la neurotoxina AF64A. La inyección intraventricular de AF64A produce deficiencias en la ACh hipocámpica, en los niveles de ACh y de acetilcolinesterasa y en un aprendizaje de prevención pasiva (Yamasaki et al., 1991) así como en la ejecución del laberinto radial (Ikegami et al., 1991). Cuando se inyectó esta toxina

directamente en el hipocampo, produjo un deterioro en la memoria de largo plazo, pero no en la memoria de corto plazo en una tarea de laberinto radial de ocho brazos (Blaker y Goodwin, 1987).

Las lesiones de los núcleos colinérgicos reducen la ACh en sus blancos colinoceptivos. Por lo que es razonable postular que la interrupción de las conexiones entre estas estructuras traería como resultado disfunciones mnémicas sin alterar las funciones de los núcleos de origen. Por ejemplo, se ha descrito que ratas viejas que muestran deterioro en la prevención pasiva también muestran deterioro en el funcionamiento normal de los receptores muscarínicos (Lippa et al., 1980), así como decrementos en la captura de alta afinidad de colina, dependiente del sodio, en el hipocampo (Sherman et al., 1981). Existen reportes de deficiencias que están relacionadas con bajos niveles de ChAT hipocampal en otro tipo de tareas aprendidas, tales como el laberinto y el laberinto acuático (Luine y Hearn, 1990; Tandon et al., 1991).

Manipulaciones experimentales de la neurotransmisión colinérgica en el hipocampo también han generado resultados que indican que la ACh está involucrada en los procesos de aprendizaje y memoria. Las inyecciones de antagonistas colinérgicos producen deterioros en la memoria representacional (Messer, 1990) y en prevención activa de una vía (Brito y Brito, 1990).

Es interesante mencionar que cuando las células del área septal son transplantadas en el hipocampo, se revierten los deterioros mnémicos de ratas viejas que aprendieron en un



laberinto de ocho brazos (Schenk et al., 1990). De la misma manera , los trasplantes hipocampales de células de la región de la banda diagonal septal producen un mejoría significativa en el laberinto acuático de Morris (Gage y Bjorklund, 1986). Se ha postulado que estos trasplantes son capaces de mejorar los deterioros conductuales quizás por la restauración de las sinapsis colinérgicas entre el tejido transplantado y el tejido huésped (Clarke y Bjorklund, 1989).

### 2.3.2. Ch2 Y CORTEZA

El importante hallazgo de que existe una degeneración del núcleo basal de Meynert en la enfermedad de Alzheimer dio lugar a numerosos estudios relacionados con esta proyección colinérgica. En roedores, las lesiones del núcleo equivalente, el NBM, producen deficiencias mnémicas, como en el caso de la prevención pasiva (Lo Contee et al., 1982).

El grupo celular Ch4 se encuentra en la zona ventromedial de el globo pálido. Debido a la localización de sus células, que se encuentran mezcladas con células del pálido, es bastante difícil producir lesiones electrolíticas específicas de la misma manera que es difícil lesionar las proyecciones corticales Ch4 debido a su disposición difusa. Una aproximación que se ha venido haciendo es la inyección local de neurotoxinas que dañan los cuerpos celulares dejando intactas a las fibras de paso, aunque no se puede descontar un daño a las células del pálido o de la zona incerta.

La inyección de ácido kainico en el pálido ventral produce

deterioros en prevención pasiva así como un decremento en los niveles de ChAT en la corteza cerebral (Friedman et al., 1983). La aplicación de una neurotoxina menos agresiva en el NBM, el ácido iboténico, también produce deterioros en la prueba del laberinto acuático (Mandel et al., 1989; Riekkinen et al., 1990) los cuales se han atribuido a las deficiencias colinérgicas, ya que la administración periférica de fisostigmina protege temporalmente contra los efectos amnésicos de las lesiones químicas (Mandel et al., 1989). Los deterioros en prevención pasiva fueron descritos cuando esta droga fue administrada en el NBM o la región dorso lateral del globo pálido, una región que no constituye parte de las proyecciones colinérgicas eferentes a la corteza (Flicker et al., 1983).

Sin embargo, a pesar de los efectos deletéreos producidos por ácido iboténico sobre la memoria y la ACh cortical, su utilidad ha sido recientemente cuestionada a la luz de hallazgos derivados del uso del ácido quisquálico. Cuando se inyecta en el NBM, esta neurotoxina produce una reducción severa en los niveles corticales de ACh y ligeros deterioros en la memoria comparados con los efectos del ácido iboténico. Por ejemplo, se ha encontrado que lesiones del NBM con ácido quisquálico inducen un 63 por ciento de reducción de la ChAT y un deterioro en la memoria de trabajo sin afectar la memoria de referencia (Biggan et al., 1991). Este efecto puede deberse a un daño menor e inespecífico de las neuronas del pálido producido por el ácido quisquálico siendo las deficiencias mnémicas debidas a una actividad colinérgica cortical disminuida. Una discusión más a

fondo sobre este problema va más allá de los alcances de esta revisión (para revisiones recientes léase a Dekker et al., 1991; Dunnett et al., 1991; Kesner et al., 1990).

Se ha demostrado que en ratas viejas se reduce el nivel de la ChAT en la base del cerebro anterior, en la corteza frontal y en el estriado, pero principalmente en animales con deficiencias de aprendizaje. Congruentemente, existe una correlación positiva entre los niveles de ChAT en el NBM y la ejecución de la prevención pasiva, independientemente de la edad de los sujetos (Riekkinen et al., 1990). Sin embargo en humanos con enfermedad de Parkinson y con una degeneración del 68 por ciento de neuronas del núcleo basal de Meynert, la cual es acompañada por una reducción de AChE cortical, y en algunos casos en la amígdala, no hay amnesia del tipo encontrado en la enfermedad de Alzheimer (Mufson et al., 1991).

Una aproximación diferente usada para la comprensión del papel de la ACh cortical en la memoria, es la manipulación directa de la transmisión colinérgica, de esta manera se evita el problema de la especificidad encontrado con el uso de neurotoxinas mencionado anteriormente. El bloqueo de receptores muscarínicos de la corteza frontal y parietal, pero no de la corteza occipital, produjo deterioros en la prevención pasiva (Fukuchi et al., 1987). El mismo deterioro se produjo por la inyección intracortical (fronto parietal) de AF64A, así como una reducción de los marcadores colinérgicos corticales (Mouton et al., 1988). Es interesante notar que a los seis meses después de las lesiones fronto parietales con AF64A hubo recuperación de la

hipofunción colinérgica, período durante el cual se habían observado deficiencias en la memoria (Crawley and Wenk, 1989).

Se debe enfatizar que el grupo Ch4 también envía fibras eferentes a la amígdala, y que esta estructura está involucrada de manera importante en procesos de aprendizaje y memoria. Dubois y sus colegas (1985) han demostrado que las lesiones de el NBM producen un deterioro en la memoria espacial, así como una reducción de los niveles de ChAT en amígdala y en las cortezas sensoriomotora y prefrontal. Kesner et al. (1990) han sugerido que los efectos amnésicos inducidos por las lesiones en el NBM podrían ser debidas fundamentalmente a lesiones de las proyecciones límbicas (principalmente a la amígdala) ya que las deficiencias mnémicas son más parecidas a las producidas por las lesiones de la amígdala que a las producidas por lesiones corticales (frontal y parietal).

### 2.3.3. ESTRIADO

La ACh en el estriado es endógena, y se produce por interneuronas que representan alrededor del 1 por ciento de su población celular.

La participación de la ACh estriatal en procesos de memoria esta bien documentada. El bloqueo de receptores muscarínicos del estriado provoca deterioros en la adquisición (Neill y Grossman, 1970) y en la ejecución (Prado-Alcalá et al., 1984) de la tarea de prevención activa de dos vías, sin embargo no se han detectado deterioros en la prevención activa de una vía (Prado-Alcalá et al., 1980a).

La participación del estriado en la prevención pasiva se ha estudiado exhaustivamente. Se ha encontrado consistentemente que la aplicación de atropina o escopolamina en la región anterodorsal del estriado inmediatamente después del entrenamiento produce un estado amnésico marcado (Haycock et al, 1973; Prado-Alcalá et al., 1980a). El efecto amnésico de las inyecciones de atropina en el estriado es tanto dosis como tiempo dependiente: conforme la dosis de la droga antimuscarínica se aumenta, aumenta también el deterioro en la retención (Giordano y Prado-Alcalá, 1986; Prado-Alcalá et al., 1985); cuando las inyecciones de atropina administradas después del ensayo en el estriado son más cercanas en tiempo al momento del entrenamiento, mayor es el estado amnésico que se produce (Díaz del Guante et al., 1991; Prado-Alcalá et al., 1981).

Consistentes con estos resultados son los datos publicados por Sanberg et al. (1984). Ellos estudiaron los efectos de la aplicación de AF64A en el estriado sobre la prevención pasiva; se encontró un profundo deterioro en la adquisición y en la retención. Contrariamente, se ha encontrado que la facilitación de la actividad colinérgica estriatal, a través de inyecciones intraestriatales de colina, mejoran significativamente la retención y la ejecución de la evitación activa (Prado-Alcalá et al., 1984) y de la prevención pasiva (Fernández et al., 1977). En un experimento reciente ratas que fueron entrenadas en una tarea de prevención pasiva las inyecciones intraestriatales de colina revirtieron el efecto amnésico de la aplicación intraestriatal de

atropina (Solana-Figueroa y Prado-Alcalá, 1990). Que el metabolismo de la ACh estaba aumentado durante el aprendizaje de prevención pasiva fue demostrado por Barker et al. (1982) en un experimento donde la síntesis de ACh en el estriado presentó valores más altos después del entrenamiento.

Con respecto a las tareas reforzadas positivamente, inyecciones intraestriatales de drogas antimuscarínicas producen deterioros significativos en la adquisición de una tarea de presión de palanca (Bermúdez-Rattoni et al., 1986) y en la ejecución de esta tarea (Prado-Alcalá, 1972). Contrariamente, la facilitación de la actividad colinérgica estriatal, a través de inyecciones intraestriatales de colina o ACh, mejoran significativamente la ejecución (Prado-Alcalá y Cobos-Zapíaín, 1979a) de presión de palanca.

Como hemos visto, existen múltiples evidencias que apoyan la hipótesis de que las neuronas colinérgicas son necesarias para el establecimiento de la memoria. Sin embargo como también se describió, existen casos donde la manipulación de la actividad colinérgica no produce cambios en las funciones mnémicas. En muchos casos, el fracaso para replicar estudios "positivos" o para encontrar modificaciones de conductas condicionadas por la aplicación de tratamientos que alteran la actividad de la ACh, se explica en términos de diferencias en los procedimientos, especies animales, parámetros de estimulación y así sucesivamente.

Una explicación alternativa para los hallazgos "negativos" (derivados de un número de estudios donde se usaron diferentes

procedimientos, especies animales y parámetros de estimulación) es que en efecto, la ACh no sea necesaria para el establecimiento de la memoria de tareas que han sido sobrentrenadas o sobrerreforzadas.

#### 2.4. EL SOBRENTRENAMIENTO Y EL SOBRRERFORZAMIENTO PROTEGEN CONTRA LA AMNESIA INDUCIDA POR EL BLOQUEO COLINERGICO.

Como se describió anteriormente, la disfunción colinérgica del estriado induce deterioros significativos en la adquisición, consolidación y ejecución de conductas condicionadas; lo mismo es cierto cuando el bloqueo colinérgico es producido por inyecciones sistémicas de drogas anticolinérgicas.

En 1977 Prado-Alcalá y Cobos-Zapíaín reportaron que las inyecciones de atropina dentro del núcleo caudado no alteraron la ejecución de gatos que fueron entrenados a presionar una palanca para recibir leche como reforzador. Un estudio previo había demostrado que este tratamiento produjo un estado amnésico en la misma especie, entrenada en la misma tarea (Prado-Alcalá et al., 1972). La única diferencia entre esos dos experimentos fue que los animales del primer estudio habían sido sobrentrenados (es decir, fueron entrenados durante 30 sesiones en vez de las 10 ó 15 sesiones habituales).

Experimentos subsecuentes han confirmado el efecto protector de sobrentrenamiento. Ratas entrenadas a presionar una palanca durante 5, 15 ó 25 sesiones se inyectaron con escopolamina intraestriatalmente; se encontró un deterioro significativo en la retención de los grupos entrenados con 5 y 15 sesiones, pero no

hubo deficiencias en el grupo entrenado con 25 sesiones (Prado-Alcalá et al., 1980). Resultados equivalentes fueron obtenidos cuando se estudió una tarea más compleja de alternación espacial (Prado-Alcalá et al., 1978).

En un intento para determinar la generalidad del efecto protector de una experiencia incrementada de aprendizaje, los efectos de la inyección de atropina y escopolamina en el estriado fueron valorados en ratas entrenadas en una tarea de prevención pasiva de una vía. Primero, el efecto conocido amnésico de la aplicación intraestriatal de drogas anticolinérgicas se replicó. Para incrementar la experiencia de aprendizaje, grupos de ratas fueron sometidas al entrenamiento usando intensidades de choque eléctrico en las patas del animal que fueron de dos y cuatro veces más altas que las necesarias para establecer el aprendizaje y para producir el efecto amnésico. Las inyecciones fueron completamente inefectivas para producir cambios en la retención de la tarea (Giordano y Prado-Alcalá, 1986; Díaz del Guante et al., 1990).

¿Cuál es entonces el papel de la actividad colinérgica estriatal con respecto a los procesos de memoria?

Los datos presentados anteriormente indican que: a) la ACh estriatal está involucrada de manera crítica en la adquisición, consolidación y ejecución de conductas condicionadas instrumentalmente; y b) bajo condiciones de sobrentrenamiento o sobrerreforzamiento, esas funciones mnémicas pueden llevarse a cabo sin la participación de la ACh estriatal. Estos datos también apuntan hacia la posibilidad de que durante una



experiencia de aprendizaje incrementada otros sistemas neuroquímicos, fuera del estriado, median esos aspectos de la función de la memoria que se habían llevado a cabo por la ACh estriatal.

Para probar experimentalmente esta hipótesis, se decidió producir una disfunción generalizada de el estriado usando inyecciones locales de una concentración alta de cloruro de potasio o de lidocaína. Como se esperaba, mientras estos tratamientos produjeron un estado amnésico marcado en animales entrenados "normalmente", no se encontró interferencia con la ejecución de la tarea de presión de palanca ni con la consolidación de prevención pasiva en los sujetos sobrentrenados o sobrerreforzados (Pérez-Ruiz y Prado-Alcalá, 1989; Prado-Alcalá y Cobos-Zapíaín, 1979b; Prado-Alcalá et al., 1980b).

Ya que las inyecciones sistémicas de drogas anticolinérgicas producen deterioros en la memoria, era de interés determinar si el bloqueo generalizado de los receptores muscarínicos también produciría amnesia en el aprendizaje de prevención pasiva sobrerreforzado. El tratamiento después del entrenamiento con escopolamina produjo la interferencia esperada con la consolidación. Sin embargo, cuando se incrementaron las intensidades de choque eléctrico dos y tres veces, los animales mostraron una ejecución casi perfecta (Durán-Arévalo et al., 1990). En un estudio subsecuente, se encontró que el efecto protector del sobrerreforzamiento no se establece en una manera gradual, sino en una forma de todo o nada, es decir con un aumento de menos del 5 por ciento de intensidad de choque

eléctrico suficiente para producir amnesia con la escopolamina (de 2.7 a 2.8 mA). Estos resultados sugieren que la ACh participa críticamente en la consolidación de la memoria, y que al incrementar la magnitud del reforzador negativo, se alcanza un umbral donde la actividad colinérgica del sistema nervioso no es necesaria para el desarrollo de los procesos de consolidación (Cruz-Morales et al., 1992)

Se necesitan nuevas investigaciones para determinar la manera en que los sistemas colinérgicos dejan de participar en las funciones de memoria, y para identificar los sistemas neuroquímicos que median la consolidación de la misma durante el sobrentrenamiento y el sobrerreforzamiento.

## 2.5 PARTICIPACION DE LA AMIGDALA EN LOS PROCESOS DE MEMORIA.

Numerosos hallazgos han demostrado la participación de la amígdala en procesos de aprendizaje y memoria (Sarter y Markowitsch, 1985; Weiskrantz, 1956).

Una de las hipótesis sobre el papel que juega esta estructura en los procesos de aprendizaje y memoria sugiere que la amígdala modula la plasticidad que ocurre en otro lugar del cerebro (McGaugh, Introini-Collison, Cahill, Kim y Liang, 1992). De acuerdo a este punto de vista, la amígdala juega un papel temporal en la regulación de cambios inducidos por el aprendizaje. Se ha sugerido que las representaciones creadas por la amígdala son temporales y que el almacenamiento de largo plazo ocurre en otro lugar, probablemente en la neocorteza (Kesner, 1992; Rolls, 1992).

Si la amígdala modula la plasticidad que ocurre en otro lugar del cerebro, entonces la amígdala se debe activar por estímulos presentes en situaciones de aprendizaje. Existen evidencias que sugieren que cambios en las contingencias del reforzamiento o de la atención que es producida por un estímulo incondicionado activan la amígdala a través de retroalimentación sensorial, visceral o humoral del sistema nervioso parasimpático (Gallagher y Holland, 1992; Gold y McGaugh, 1975, McGaugh, 1989; McGaugh y Gold, 1989; McGaugh et al., 1992). También se conoce que la amígdala está más involucrada en tareas que provocan emociones intensas, ya sea positivas o negativas (Cahill y McGaugh, 1990). Alternativamente se ha propuesto que la activación de la amígdala sirve como una señal para otras estructuras neurales involucradas en el almacenamiento de la memoria (McGaugh, 1989, McGaugh, Introini-Collison, Nagahara y Cahill, 1990, McGaugh et al., 1992).

Existen evidencias que sugieren el papel modulador temporal de la amígdala; éstas se basan en que los efectos de muchos tratamientos farmacológicos administrados después del entrenamiento de una tarea son dependientes del tiempo (Gold y McGaugh, 1975). Así como de efectos de lesiones realizadas después del entrenamiento que son también dependientes del tiempo de su inducción (Liang, McGaugh, Martínez, Jensen, Vasquez y Messing, 1982).

Una de estas evidencias involucra a la epinefrina, que se sabe es secretada durante ciertas experiencias de aprendizaje y

se piensa que estas experiencias inducen su liberación (McGaugh, 1989; McGaugh y Gold, 1989). Las inyecciones sistémicas de epinefrina administradas después del entrenamiento modulan la retención en una forma dependiente de la dosis y del tiempo (Gold y Van Burkirk, 1975; Introini-Collison y McGaugh, 1986; Izquierdo y Dias, 1985; McGaugh, 1989; McGaugh y Gold, 1989; Sternberg, Martínez, Gold y McGaugh, 1985). Estos efectos de la epinefrina son mediados en parte, por la liberación central de norepinefrina (Gold y Van Burskirk, 1978; Introini-Collison y McGaugh, 1991).

Las inyecciones periféricas de epinefrina afectan las concentraciones de norepinefrina de todo el cerebro; estos cambios en las concentraciones de norepinefrina permiten predecir el grado de amnesia o de mejoramiento en la memoria que es producido por las inyecciones periféricas de epinefrina (Gold y Burkirk, 1978).

Los efectos de la epinefrina sobre la memoria involucran a la amígdala (Cahill y McGaugh, 1991; Liang, Bennett y McGaugh, 1985; Liang y McGaugh, 1983). El deterioro en la memoria encontrado al estimular la amígdala después del entrenamiento (Liang, et al., 1985; McGaugh y Gold, 1976) se atenúa cuando los almacenes endógenos de epinefrina se agotan por la adrenodemedulación o adrenodeneriación (Liang, et al., 1985). Además, la administración exógena de epinefrina a ratas que fueron adrenodemeduladas restablece el deterioro de la memoria inducido por a la estimulación de la amígdala (Liang, et al., 1985). Los efectos de facilitación en la retención debidos a las inyecciones sistémicas de epinefrina administradas después del

entrenamiento son bloqueadas por lesiones de la amígdala o por lesiones de la estría terminalis (Cahill y McGaugh, 1991; Liang y McGaugh, 1983), que es una de las principales vías aferentes y eferentes de la amígdala (Price, Russchen y Amaral, 1987).

Los efectos de la epinefrina sobre la memoria, parecen en parte estar ejerciendo su acción debido a la activación de los receptores de norepinefrina en la amígdala. Las inyecciones de norepinefrina o de antagonistas noradrenérgicos en la amígdala después del entrenamiento afectan la memoria en una forma dependiente de las dosis y del tiempo (Ellis y Kensler, 1983; Izquierdo, Cunha, Rosat, Jerusalinsky, Feriera y Medina, 1992; Liang, Juler y McGaugh, 1986; Liang, McGaugh y Yao, 1990). En forma similar, al inyectar norepinefrina se atenúa el deterioro en la retención producido por la adrenalectomía (Liang, et al., 1986).

Los estudios acerca de los efectos de opioides sobre el aprendizaje y la memoria también sugieren el papel neuromodulador de la amígdala en estos procesos. La memoria para eventos recientes se deteriora cuando se administran inyecciones sistémicas de agonistas opioides endógenos o sintéticos (Introini y Baratti, 1984; Izquierdo, 1979; Martínez, Rigter, Jensen, Messing, Vasquez y McGaugh, 1981; McGaugh, Introini-Collison y Nagahara, 1988). De forma inversa las inyecciones sistémicas de antagonistas opioides después del entrenamiento producen una mejoría en la memoria (Gallagher y Kapp, 1978; Izquierdo, 1979; McGaugh, Introini-Collison y Nagahara, 1988). Los efectos tanto de los agonistas como de los antagonistas opioides sobre la

memoria son dependientes del tiempo y de la dosis (Castellano, 1975; Introini y Baratti, 1984; Izquierdo y Dias, 1981).

Los opioides parecen afectar la memoria al interactuar con los mecanismos centrales de la norepinefrina (Fanelli, Rosenberg y Gallagher, 1985; Introini-Collison y Baratti, 1986; Izquierdo y Dias, 1981). Por ejemplo, los efectos de la mejoría en la memoria por un antagonista opioide, la naloxona, son bloqueados cuando los almacenes centrales de norepinefrina son agotados con la neurotoxina selectiva a norepinefrina, la DSP4, o por las lesiones con 6-hidroxidopamina del haz dorsal noradrenérgico (Gallagher, Rapp y Fanelli, 1985; Introini-Collison y Baratti, 1986). Estos efectos de mejoría en la memoria por la naloxona son también bloqueados al inyectar antagonistas de norepinefrina, que actúan de manera central, no así de forma periférica (Introini-Collison, Baratti, 1986).

Cuando se inyectan antagonistas opioides directamente en la amígdala se produce un mejoramiento en la retención y se produce deterioro cuando se administran agonistas (Gallagher y Kapp, 1978, 1981; Introini-Collison, Nagahara y McGaugh, 1989).

Los efectos de mejoría en la memoria al inyectar naloxona tanto de forma sistémica como en la amígdala son bloqueados por inyecciones de propanolol, un antagonista a los receptores beta-noradrenérgicos (Introini-Collison et al., 1989; McGaugh, et al., 1988).

El sistema gabaérgico dentro de la amígdala también se encuentra involucrado en la modulación de la información adquirida. Las inyecciones sistémicas de agonistas de GABA

administradas después del entrenamiento deterioran la retención (Brioni y McGaugh, 1988; Brioni, Nagahara y McGaugh, 1989, Castellano y McGaugh, 1989) mientras que las inyecciones de antagonistas del GABA mejoran la retención (Bovet, McGaugh y Olivero, 1966; Brioni y McGaugh, 1988; Castellano y McGaugh, 1989) en forma dosis y tiempo dependientes. Sin embargo, sobre los efectos de los antagonistas GABAérgicos existen contradicciones, ya que en algunos casos se han encontrado deterioros en la retención (Nabeshima, Noda y Kameyama, 1988). Un reporte atribuye estos resultados contradictorios en parte a la diferencia de procedimientos utilizados y al modo de acción de las drogas (Cruz-Morales, Quirarte, Díaz del Guante y Prado-Alcalá, 1993).

Los efectos sistémicos de GABA sobre la memoria involucran a la amígdala. Al administrar en la amígdala agonistas o antagonistas de este neurotransmisor se producen los mismos efectos que de forma sistémica y cuando la amígdala es lesionada, los efectos sistémicos se atenúan (Ammassari-Teule, Pavone, Castellano y McGaugh, 1991).

Las benzodiazepinas también influyen la memoria; esta influencia puede involucrar procesos que la amígdala modula. La administración sistémica de benzodiazepinas induce amnesia en una variedad de aprendizajes motivados apetitivamente y aversivamente en forma dosis y tiempo dependientes (Jensen, Martinez, Vasquez y McGaugh, 1979). La administración de antagonistas a las benzodiazepinas mejora la adquisición y la retención (Kumar, Forster y Lal, 1988; Lal, Kumar y Forster,

1988; Periera, Rosat, Huang, Godoy, e Izquierdo, 1989). Cuando se inyectan en la amígdala antagonistas de las benzodicepinas se mejora la retención de un aprendizaje de evitación pasiva (Wolfman, Da Cunha, Jerusalinsky, Levi de Stein, Viola, Izquierdo y Medina, 1991). De manera inversa cuando se administran agonistas de las benzodicepinas en la amígdala como el diazepam y midazolam se deteriora la retención de la misma tarea. Cuando la amígdala es lesionada se bloquean los efectos amnésicos de la administración de agonistas a las benzodicepinas (Tomaz, Dickinson-Anson y McGaugh, 1991, 1992).

Si la amígdala es un sitio plástico para algunos tipos de aprendizaje y si este aprendizaje produce cambios más o menos duraderos, entonces la amígdala es necesaria para la expresión de la memoria. Si existen ciertos tipos de memoria que se almacenan en la amígdala, entonces las lesiones de la amígdala que se inducen después de el entrenamiento deberían prevenir completamente la expresión de la memoria de ese entrenamiento. Por otro lado, si como mencionamos anteriormente esta estructura modula la plasticidad que ocurre en otro lugar del cerebro entonces al ser lesionada después del entrenamiento, se debe deteriorar pero no necesariamente bloquear la expresión de la memoria. De acuerdo a este punto de vista de modulación, las lesiones de la amígdala después del entrenamiento deberían deteriorar la ejecución cuando las lesiones son inducidas inmediatamente después del aprendizaje y deberían tener un efecto menor cuando se inducen a intervalos más lejanos del momento del entrenamiento.



Las lesiones de la amígdala después del entrenamiento no producen deterioro o sólo muy pequeño, en la habilidad de los monos que reaprenden una tarea de reconocimiento visual, discriminación visual o de discriminación olfativa (Aggleton y Passingham, 1981; Bachevalier, Parkinson y Mishkin, 1985; Horel, Keating y Misantone, 1975; Mishkin, 1978; Zola-Morgan, Squire y Amaral, 1989; Zola-Morgan, Squire, Alvarez y Clower, 1991). Esta falta de deterioro sugiere que la amígdala no juega un papel crítico en la retención de patrones visuales, en la asociación de patrones visuales con reforzamiento, o en la representación de estas asociaciones. En 1956, Wiskrantz reportó que en el reaprendizaje de evitación condicionada y supresión condicionada en monos amigdalectomizados se muestra ahorro en el aprendizaje adquirido antes de la inducción de la lesión pero no presentaron deterioro en la ejecución de la retención. Estos resultados sugieren que la amígdala no es un sitio crítico para el almacenamiento de la memoria de estos aprendizajes aversivos y que los animales amigdalectomizados continúan respondiendo a castigos. De hecho, los monos con lesiones de la amígdala parecen quedar sensibles a las recompensas y los castigos (Gaffan, 1992). En muchos ejemplos los animales amigdalectomizados trabajan normalmente para recompensas con comida (Aggleton y Passingham, 1982; Gaffan, Gaffan y Harrison, 1989; Horel, et al., 1975; Schwartzbaum, 1960; Zola-Morgan y Squire, 1990). Por ejemplo Aggleton y Passingham (1982) encontraron que la amigdalectomía total después del entrenamiento

no afectó la ejecución de una tarea operante de razón fija progresiva para diferentes recompensas de comida. Tales resultados sugieren que las asociaciones aprendidas basadas en recompensas alimenticias no se ven afectadas por las lesiones. Además estos resultados sugieren que la comida continúa siendo reforzante aún cuando la amígdala no se encuentre intacta.

En contraste, Gaffan y Harrison (1987) demostraron un deterioro en las situaciones de aprendizaje reforzado con comida en monos con lesiones de la amígdala. En este experimento, los monos fueron entrenados hasta que alcanzaron un criterio de 80% en una tarea de discriminación visual que involucra trabajo que es recompensado por comida usando reforzamiento secundario auditivo. Después de que los monos alcanzaron el criterio, fueron amigdalotomizados. Después de la operación los monos tuvieron atenuación en la curva de aprendizaje pero no fue completamente plana. En comparación con la ejecución post-operatoria de los monos que recibieron lesiones unilaterales asimétricas tanto de la amígdala como de la corteza de asociación visual, los monos amigdalotomizados tuvieron significativamente más errores después de la operación. Los sujetos que no fueron operados o aquellos con lesiones falsas no se incluyeron en este estudio. Gaffan y Harrison (1987) concluyeron que el papel de la amígdala fue mantener una asociación entre el reforzador secundario auditivo y el valor del incentivo primario de la comida. Esta interpretación fue apoyada por hallazgos, en el mismo experimento, en donde la desconexión de la amígdala con la corteza auditiva no tuvo efecto. Estos resultados sugieren que la amígdala puede almacenar

asociaciones reforzadas por estímulos a largo plazo.

En suma, las lesiones de la amígdala después del entrenamiento producen un deterioro mediano en el reaprendizaje de discriminación visual, evitación condicionada y supresión condicionada. En casos en donde el deterioro se observa subsecuentemente a las lesiones de la amígdala después del entrenamiento, la retención y el reaprendizaje comunmente se atenúan, es decir no se bloquean. Estos hallazgos no apoyan la hipótesis de que la amígdala sirve como un sitio de plasticidad durante el almacenamiento de la memoria, porque las lesiones después del entrenamiento deberían bloquear completamente la retención. Estos resultados apoyan el papel modulador que juega la amígdala en el aprendizaje y la memoria. Sin embargo, hay evidencias que sugieren que la amígdala almacena la asociación entre el estímulo visual y el valor incentivo de la comida como reforzador (Gaffan y Harrison, 1987).

Uno de los primeros trabajos sobre los efectos de las lesiones realizadas después del entrenamiento es el reportado por Brady y sus colegas (1954). Encontraron que gatos lesionados de la amígdala no tuvieron deterioro en la retención de una respuesta de evitación condicionada que fue adquirida antes de inducir la lesión. Estos hallazgos, en conjunto con aquellos en donde las lesiones de la amígdala atenúan pero no previenen la adquisición de la respuesta de evitación contribuyeron a que estos investigadores propusieran que la amígdala juega un papel facilitador en la adquisición de tales respuestas, pero que ésta no parece constituir una condición necesaria para la adquisición

o la retención de tales conductas de evitación. Un trabajo posterior reporta también que las lesiones de la amígdala inducidas después del entrenamiento no afectaron la retención de un aprendizaje de evitación activa (Fonberg, Brutkowski y Mempel, 1962; Thatcher y Kimble, 1966).

Otras investigaciones indican que los efectos sobre la retención de lesiones realizadas en la amígdala después del entrenamiento, dependen del tiempo de la lesión. Liang y sus colegas (1982) investigaron los efectos de las lesiones de la amígdala inducidas después del entrenamiento de una respuesta de evitación inhibitoria. En este estudio las ratas fueron lesionadas inmediatamente después de la tarea o 2, 5 o 10 días después. Al comparar la ejecución de los animales control con la de los animales experimentales, durante la prueba de retención, se encontró que las lesiones realizadas inmediatamente después o 3 días después del entrenamiento tuvieron un deterioro significativo. La retención de los animales que fueron lesionados 5 días después del entrenamiento tuvieron una ejecución significativamente mejor que los lesionados inmediatamente después del entrenamiento. La retención de los animales que fueron lesionados 10 días después del entrenamiento no difirieron de los controles no lesionados. Los resultados de este estudio sugieren que la amígdala tiene un papel transitorio en la memoria que disminuye con el paso del tiempo. Sin embargo el papel transitorio que representa la amígdala en una asociación para la modulación del almacenamiento de información que ocurre en otro lugar del cerebro no esta claro.

Cuando las lesiones se realizan antes del sobrerreforzamiento o del sobrentrenamiento de una tarea, los efectos deletéreos sobre la memoria se pueden atenuar (Kim y Davis, 1992; Orbach y Fantz, 1958; Parent, Tomaz y McGaugh, 1992; Sullivan y Wilson, 1992; Thatcher y Kimble, 1966).

Varios investigadores han empleado recientemente lesiones reversibles para estudiar el papel de la amígdala en el aprendizaje aversivo. La inactivación neural reversible de una estructura puede ser llevada a cabo por medio de una infusión de un anestésico local o tetrodotoxina (TTX), (Bermúdez-Rattoni, Rusiniak y García, 1983; Sandkuhler, Maisch y Zimmerman, 1987). Bucherelli, Tassoni y Bures (1992) inyectaron TTX en la amígdala inmediatamente después o a varios intervalos después del entrenamiento de una tarea de evitación inhibitoria; la retención fue realizada a las 48 horas. Con el uso de lesiones reversibles estos investigadores fueron capaces de inactivar la amígdala durante el período de consolidación y dejar la amígdala intacta durante los períodos de aprendizaje y de evocación. Los resultados indican que la ejecución de los animales durante la sesión de retención se deterioró significativamente comparada con los animales a los que se les inyectó el vehículo; los efectos encontrados fueron tiempo-dependientes. Las inyecciones de TTX en la amígdala deterioraron la retención dentro de los 90 minutos después del entrenamiento y fueron menos efectivos cuando las lesiones se indujeron 6 horas después del entrenamiento, no se encontraron efectos al inducirse 24 horas después del

entrenamiento.

También se han estudiado los efectos de la inactivación reversible de la amígdala sobre una respuesta de congelamiento condicionado. Se apareó un tono con un choque eléctrico en las patas y se midió la respuesta de congelamiento 24 horas más tarde. En comparación con los animales controles, la conducta de congelamiento disminuyó significativamente en los lesionados 20 minutos antes de la prueba de retención (Helmstetter, 1992).

Como en el caso de las lesiones realizadas antes del entrenamiento, las lesiones en la amígdala inducidas después del entrenamiento no afectan la retención y la ejecución en respuestas motivadas apetitivamente. Por ejemplo existe un reporte en donde las lesiones de la amígdala después del entrenamiento no afectó la retención de una respuesta instrumental motivada apetitivamente (Fonberg, et al., 1962). De manera similar las lesiones de la amígdala realizadas después del entrenamiento no deterioraron la retención de una respuesta de discriminación en ratas (Raffaele y Olton, 1988; Slotnick, 1985; Sutherland y McDonald, 1990; Thompson y Schwartzbaum, 1964) o de un aprendizaje espacial (Becker, Walker y Olton, 1980). Sin embargo se han encontrado deterioros en una tarea de memoria de orden motivada apetitivamente (Kesner, Crutcher y Omana, 1990).

En suma, la participación transitoria de la amígdala en el almacenamiento de la memoria parece estar restringida a un período después del aprendizaje. Los efectos amnésicos inducidos por lesiones después del entrenamiento, pueden ser atenuados aumentando el entrenamiento.

#### REFERENCIAS

Aggleton, J.P. and Passingham, R.E. Syndrome produced by lesions of the amygdala in monkeys (*Macaca mulatta*). *The Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 95 (6): 961-977, 1981.

Aggleton, J.P. and Passingham, R.E. An assessment of the reinforcing properties of foods after amygdaloid lesions in rhesus monkeys. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 96(1):71-77, 1982.

Ammassari-Teule, M., Pavone, F., Castellano, C., and McGaugh, J.L. Amygdala and dorsal hippocampus lesions block the effects of GABAergic drugs on memory storage. *Brain Research*, 551:104-109, 1991.

Bachevalier, J., Parkinson, J.K. and Mishkin, M. Visual recognition in monkeys: Effects of separate vs. combined transection of fornix and amygdalofugal pathways. *Experimental Brain Research*, 57:554-561, 1985

Bammer, G. Pharmacological investigations of neurotransmitter involvement in passive avoidance responding: A review and some new results. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 6:247-296, 1982.

Barker, L.A., Glick, S.A., Green, J.P. and Khandelwal, J. Acetylcholine metabolism in the rat hippocampus and striatum following one-trial passive training, *Neuropharmacology*, 21: 183-185, 1982.

Bartus, R.T., Dean, R.L., Pontecorvo, M.J. and Flicker, C. The cholinergic hypothesis: A historical overview, current perspectives, and future directions, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 44:332-358, 1985.

Becker, J.T., Walker, J.A. and Olton, D.S. Neuroanatomical bases of spatial memory. *Brain Research*, 200:307-320, 1980.

Bermúdez-Rattoni, F., Mujica-Gonzalez, M. and Prado-Alcalá, R.A. Is cholinergic activity of the striatum involved in the acquisition of positively-motivated behaviors?, *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 24:715-719, 1986.

Bermúdez-Rattoni, F., Rusiniak, K.W. and Garcia, J. Flavor-illness aversions: Potentiation of odor by taste is disrupted by application of novocaine into amygdala. *Behavioral and Neural Biology*, 37:61-75, 1983.

Biggan, S.L., Beninger, R.J., Cockhill, J., Jhamandas, K. and Boegman, R.J. Quisqualate lesions of rat NBM: selective effects on working memory in a double Y-maze, *Brain Research Bulletin*, 26:613-616, 1991.

Blaker, W.D. and Goodwin, S.D. Biochemical and behavioral effects of intrahippocampal AF64A in rats, *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 28:157-163, 1987.

Bovet, D., McGaugh, J.L. and Olivero, A. Effects of posttrial administration of drugs on avoidance learning in mice. *Life Sciences*, 5:1309-1315, 1966.

Brady, J.V., Schreiner, L., Geller, I. and Kling, A. Subcortical mechanisms in emotional behavior: The effect of rhinencephalic injury upon the acquisition and retention of a conditioned avoidance response in cats. *Journal of Comparative Physiological Psychology*, 47:179-186, 1954.

Brioni, J.D. and McGaugh, J.L. Posttraining administration of GABAergic antagonist enhance retention of aversively motivated tasks. *Psychopharmacology*, 95:505-510, 1988.

Brioni, J.D. Nagahara, A.H. and McGaugh, J.L. Involvement of the amygdala GABAergic system in the modulation of memory storage. *Brain Research*, 487:105-112, 1989.

Brito, L.S. and Brito, G.N. Locomotor activity and one-way active avoidance after intrahippocampal injection of neurotransmitter antagonists, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 23:1015-1019, 1990.

Bucherelli, C., Tassoni, G., and Bures, J. Time-dependent disruption of passive avoidance by post-training intra-amygdala injection of tetrodotoxin in rats. *Neuroscience Letters*, 140: 231-234, 1992.

Cahill, L. and McGaugh, J.L. Amygdaloid complex lesions differentially affect retention of tasks using appetitive and aversive reinforcement. *Behavioral Neuroscience*, 104(4):532-543, 1990.

Cahill, L. and McGaugh, J.L. NMDA-induced lesions of the amygdaloid complex blocks the retention-enhancing effect of posttraining epinephrine. *Psychobiology*, 19 (3):206-210, 1991.

Castellano, C. Effects of morphine and heroin on discrimination learning and consolidation in mice. *Psychopharmacologia*, 42:235-242, 1975.

Castellano, C. and McGaugh, J.L. Retention enhancement with posttraining picrotoxin: Lack of state dependency. *Behavioral and Neural Biology*, 51:165-170, 1989.



Cassel, J.C., Kelche, C., Hornsperger, J.M., Jackisch, R. Hertting, G. and Will, B.E. Graft-induced learning impairment despite graft-enhanced cholinergic functions in the hippocampus of rats with septohippocampal lesions, *Brain Research*, 534: 295-298, 1990.

Clarke, D.J. and Bjorklund, A. Restoration of cholinergic circuitry in the hippocampus by foetal grafts, *Experientia, Supplementum*, 57:275-287, 1989.

Crawley, J.N. and Wenk, G.L. Co-existence of galanin and acetylcholine: is galanin involved in memory processes and dementia?, *Trends in Neurosciences*, 12:278-282, 1989.

Cruz-Morales, S.E., Durán-Arévalo, M., Díaz del Guante, M.A., Quirarte, G. and Prado-Alcalá, R.A. A threshold for the protective effect of over-reinforced passive avoidance against scopolamine-induced amnesia, *Behavioral and Neural Biology*, 57:256-259, 1992.

Cruz-Morales, S.E., Quirarte, G.L., Diaz del Guante, M.A. and Prado-Alcalá, R.A. Effects of GABA antagonists on inhibitory avoidance. *Life Sciences*, 53:1325-1330, 1993.

Davis, H.P., Idow, A. and Gibson, G.E. Improvement of 8-arm maze performance in aged Fischer 344 rats with 3,4-diaminopyridine. *Experimental Aging Research*, 9:211-214, 1983.

Dekker, A.J.A.M., Connor, D.J. and Thal, L.J. The role of cholinergic projections from the nucleus basalis in memory, *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 15:299-317, 1991.

Dellu, F., Mayo, W., Cherkaoui, J., Le Moal, M. and Simon-H. Learning disturbances following excitotoxic lesion of cholinergic pedunculo-pontino nucleus in the rat, *Brain Research*, 544: 126-132, 1991.

Deutsch, J.A. The cholinergic synapse and the site of memory, *Science*, 174:788-794, 1971.

Díaz del Guante, M.A., Cruz-Morales, S.E. and Prado-Alcalá, R.A. Time-dependent effects of cholinergic blockade of the striatum on memory, *Neuroscience Letters*, 122:79-82, 1991.

Díaz del Guante, M.A., Rivas-Arancibia, S., Quirarte, G. and Prado-Alcalá, R.A. Over-reinforcement protects against memory deficits induced by muscarinic blockade of the striatum, *Boletín de Estudios Médicos y Biológicos, México*, 38:49-53, 1990.

Quirarte, G.L.  
Tesis Doctoral

Dubois, B., Mayo, W., Agid, Y., Le Moal, M., and Simon, H. Profound disturbances of spontaneous and learned behaviors following lesions of the nucleus basalis magnocellularis in the rat, *Brain Research*, 338:249-58, 1985.

Dunnett, S.B., Everitt, B.J. and Robbins, T.W. The basal forebrain-cortical cholinergic system: interpreting the functional consequences of excitotoxic lesions, *Trends in Neurosciences*, 14:494-501, 1991.

Durán Arévalo, M., Cruz-Morales, S.E. and Prado-Alcalá, R.A. Is acetylcholine involved in memory consolidation of over-reinforced learning?, *Brain Research Bulletin*, 24:725-727, 1990.

Ellis, M.E. and Kesner, R.P. The noradrenergic system of the amygdala and aversive information processing. *Behavioral Neuroscience*, 97(3):399-415, 1983.

Fanelli, R.J., Rosenberg, R.A., and Gallagher, M. Role of noradrenergic function in the opiate antagonist facilitation of spatial memory. *Behavioral Neuroscience*, 99(4):751-755, 1985.

Fernández, S.M., Solodkin, H.M. and Prado-Alcalá, R.A. Blockade and activation of caudate cholinergic activity. Effects on passive avoidance. *Neuroscience Abstracts*, 3:232, 1977.

Fibiger, H.C. Cholinergic mechanisms in learning, memory and dementia: a review of recent evidence, *Trends in Neurosciences*, 14:220-223, 1991.

Fisher, A. Potential animal models for senile dementia of Alzheimer's type, with emphasis on AF64A-induced cholinotoxicity, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 26:161-181, 1986.

Fisher, A., Brandeis, R., Karton, I., Pittel, Z., Gurwitz, D., Haring, R., Sapir, M., Levy, A. and Heldman, E. (+)-cis-2-methyl-spiro(1,3-oxathiolane-5,3')quinuclidine, an M1 selective cholinergic agonist, attenuates cognitive dysfunctions in an animal model of Alzheimer's disease, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 257:392-403, 1991.

Flicker, C., Dean, R.L., Watkins, D.L., Fisher, S.K. and Bartus, R.T. Behavioral and neurochemical effects following neurotoxic lesions of a major cholinergic input to the cerebral cortex in the rat, *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 18: 973-81, 1983.

Fonberg, E., Brutkowski, S. and Mempel, E. Defensive conditioned reflexes and neurotic motor reactions following amygdectomy in dogs. *Acta Biologiae Experimentalis*, 22(1): 51-57, 1962.

Friedman, E., Lerer, B. and Kuster, J. Loss of cholinergic neurons in the rat neocortex produces deficits in passive avoidance learning, *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 19: 309-312, 1983.

Fukuchi, I., Kato, S., Nakahiro, M., Uchida, S., Ishida, R. and Yoshida, H. Blockade of cholinergic receptors by an irreversible antagonist propylbenzilylcholine mustard (PrBCM), in the rat cerebral cortex causes deficits in passive avoidance learning, *Brain Research*, 400:53-61, 1987.

Gaffan, D. Amygdala and the memory of reward. En: *The Amygdala: Neurobiological Aspects of Emotion, Memory and Mental Dysfunction*. J.P. Aggleton, (Eds.) Wiley-Liss, 1992, pp. 471-483.

Gaffan, D.G., Gaffan, E.A. and Harrison, S. Visual-visual associative learning and reward-association learning in monkeys: The role of the amygdala. *The Journal of Neuroscience*, 9(2): 558-564, 1989.

Gage, F.H. and Bjorklund, A. Cholinergic septal grafts into the hippocampal formation improve spatial learning and memory in aged rats by an atropine-sensitive mechanism, *Journal of Neuroscience*, 6:2837-2847, 1986.

Gallagher, M. and Holland P.C. Understanding the function of the central nucleus: Is simple conditioning enough? En: *The Amygdala: Neurobiological Aspects of Emotion, Memory and Mental Dysfunction*. J.P. Aggleton, (Eds.), Wiley-Liss, 1992, pp. 307-321.

Gallagher, M. and Kapp, B.S. Manipulation of opiate activity in the amygdala alters memory processes. *Life Sciences*, 23: 1973-1978, 1978.

Gallagher, M., Rapp, P.R. and Fanelli, R.J. Opiate antagonist facilitation of time-dependent memory processes: Dependence upon intact norepinephrine function. *Brain Research*, 347:284-290, 1985.

Giordano, M. and Prado-Alcalá, R.A. Retrograde amnesia induced by post-trial injection of atropine into the caudate-putamen. Protective effect of the negative reinforcer, *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 24:905-909, 1986.

Gold P.E. and McGaugh, J.L. A single-trace, two-process view of memory storage processes. En: *Short-term Memory*. D. Deutsch and J.A. Deutsch (Eds.). Academic Press, 1975, pp. 355-378.

Gold, P.E. and Van Burskirk, R.B. Facilitation of time-dependent memory processes with post-trial epinephrine injections. *Behavioral Biology*, 13:145-153, 1975.

Gower, A.J. Enhancement by secoverine and physostigmine of retention of passive avoidance response in mice, *Psychopharmacology*, 91:326-329, 1987.

Hagan, J.J., Jansen, J.H. and Broekkamp, C.L. Hemicholinium-3 impairs spatial learning and the deficit is reversed by cholinomimetics, *Psychopharmacology*, 98:347-356, 1989.

Hagan, J.J., Tweedie, F. and Morris, R. G. Lack of task specificity and absence of posttraining effects of atropine on learning, *Behavioral Neuroscience*, 100:483-493, 1986.

Haycock, J.W., Deadwyler, S.A., Sideroff, S.I., and McGaugh, J.L. Retrograde amnesia and cholinergic systems in the caudate-putamen complex and dorsal hippocampus of the rat, *Experimental Neurology*, 41:201-13, 1973.

Horel, J.A., Keating, E.G. and Misantone, L.J. Partial Kluver-Bucy syndrome produced by destroying temporal neocortex or amygdala. *Brain Research*, 94:347-359, 1975.

Howard, M, Gross, A., Grady, M.S., Langer, R.S., Mathiowitz, E., Winn, H.R. and Mayberg, H.R. Intracerebral drug delivery in rats with lesion-induced memory deficits, *Journal of Neurosurgery*, 71:105-112, 1989.

Ikegami, S., Nihonmatsu, I. and Kawamura, H. Transplantation of ventral forebrain cholinergic neurons to the hippocampus ameliorates impairment of radial-arm maze learning in rats with AF64A treatment, *Brain Research*, 548:187-195, 1991.

Introini-Collison, I.B. and Baratti, C. The impairment of retention induced by B-endorphin in mice may be mediated by a reduction of central cholinergic activity. *Behavioral and Neural Biology*, 41:152-163, 1984.

Introini-Collison, I.B. and Barratti, C.M. Opioid peptidergic systems modulate the activity of B-adrenergic mechanisms during memory consolidation processes. *Behavioral and Neural Biology*, 46:227-241, 1986.

Introini-Collison, I.B. and McGaugh, J.L. Epinephrine modulates long-term retention of an aversively-motivated discrimination task. *Behavioral and Neural Biology*, 45:358-365, 1986.

Introini-Collison, I.B. and McGaugh, J.L. Interaction of hormones and neurotransmitter systems in the modulation of memory storage. En: *Peripheral Signalling of the Brain: Role in Neural-Immune Interactions, Learning and Memory*. R.C. Fredrickson and J.L. McGaugh, D.L. Felten (Eds.) Hogrefe and Huber Publisher, 1991, pp. 275-302,

Introini-Collison, I.B. Nagahara, A.H. and McGaugh, J.L. Memory-enhancement with intra-amygdala post-training naloxone is blocked by concurrent administration of propranolol. *Brain Research*, 476:94-101, 1989.

Izquierdo, I. Effect of naloxone and morphine on various forms of memory in the rat: Possible role of endogenous opiate mechanisms in memory consolidation. *Psychopharmacology (Berlin)*, 66:199-203, 1979.

Izquierdo, I., DaCunha, C., Rosat, R., Jerusalinsky, D., Feriera, M.B.C. and Medina, J.H. Neurotransmitter receptors involved in post-training memory processing by the amygdala, medial septum and hippocampus. *Behavioral and Neural Biology*, 58: 16-26, 1992.

Izquierdo, I. and Dias, R.D. Retrograde amnesia caused by Met-, Leu-, and des-Tyr-met-enkephalin in the rat and its reversal by naloxone. *Neuroscience Letters*, 22(2):189-193, 1981.

Jensen, R.A., Martinez, J.L. Vasquez, B.J. and McGaugh, J.L. Benzodiazepines alter acquisition and retention of an inhibitory avoidance response in mice. *Psychopharmacology*, 64:125-126, 1979.

Kesner, R.P. Learning and memory in rats with an emphasis on the role of the amygdala. En: *The Amygdala: Neurobiological Aspects of Emotion, Memory and Mental Dysfunction*. J.P. Aggleton, (Eds.) Wiley-Liss, 1992, pp. 379-399.

Kesner, R.P., Crutcher, K.A. and Omana, H. Memory deficits following nucleus basalis magnocellularis lesions may be mediated through limbic, but not neocortical, targets, *Neuroscience*, 38: 93-102, 1990.

Kim, M. and Davis, M. Electrolytic lesions of the amygdala block acquisition and expression of conditioned fear even with extensive training, but do not prevent reacquisition. *Society for Neuroscience Abstracts*, 18:1563, 1992.

Kumar, B.A., Forster, M.J. and Lal, H. CGS 8216, a benzodiazepine receptor antagonist, enhances learning and memory in mice. *Brain Research*, 460:195-198, 1988.

Lal, H., Kumar, B. and Forster, J. Enhancement of learning and memory in mice by a benzodiazepine antagonist. *The FASEB Journal*, 52: 2707-2711, 1988.

Lamberty, Y. and Gower, A.J. Cholinergic modulation of spatial learning in mice in a Morris-type water maze, *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie*, 309:5-19, 1991.

Quirarte, G.L.  
Tesis Doctoral

Lewis, D.J. and Bregman, N.J. The cholinergic system, amnesia and memory, *Physiology and Behavior*, 8:511-514, 1972.

Liang, K.C. Pretest intra-amygdala injection of lidocaine or glutamate antagonists impairs retention performance in an inhibitory avoidance task. *Society for Neuroscience Abstracts*, 17:486, 1991.

Liang, K.C., Bennett, C. and McGaugh, J.L. Peripheral epinephrine modulates the effects of posttraining amygdala stimulation on memory. *Behavioral Brain Research*, 15:93-100, 1985.

Liang, K.C., Juler, R.G. and McGaugh, J.L. Modulating effects of posttraining epinephrine on memory: Involvement of the amygdala noradrenergic system. *Brain Research*, 368:125-133, 1986.

Liang, K.C. and McGaugh, J.L. Lesions of the stria-terminalis attenuate the enhancing effects of post-training epinephrine on retention of an inhibitory avoidance response. *Behavioral Brain Research*, 9:49-58, 1983.

Liang, K.C., McGaugh, J.L. Martinez, J.L Jr., Jensen, R.A., Vasquez, B.J. and Messing, R.B. Post-training amygdaloid lesions impair retention of an inhibitory avoidance response. *Behavioral Brain Research*, 4:237-249, 1982.

Liang, K.C. McGaugh, J.L. and Yao, H.Y. Involvement of amygdala pathways in the influence of post-training intra-amygdala norepinephrine and peripheral epinephrine on memory storage. *Brain Research*, 508:225-233, 1990.

Lippa, A.S., Pelham, R.W., Beer, B., Critchett, D.J., Dean, R.L. and Bartus, R.T., 1980, Brain cholinergic dysfunction and memory in aged rats, *Neurobiology of Aging*, 1:13-19, 1980.

LoConte, G, Bartolini, L., Casamenti, F. and Marconcini-Pepeu, I. and Pepeu, G. Lesions of cholinergic forebrain nuclei: changes in avoidance behavior and scopolamine actions, *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 17:933-937, 1982.

Luine, V. and Hearn, M. Spatial memory deficits in aged rats: contributions of the cholinergic system assessed by ChAT, *Brain Research*, 523:321-324, 1990.

Mandel, R.J., Chen, A.D., Connor, D.J. and Thal, L.J. Continuous physostigmine infusion in rats with excitotoxic lesions of the nucleus basalis magnocellularis: effects on performance in the water maze task and cortical cholinergic markers, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 251:612-619, 1989.

Quirarte, G.L.  
Tesis Doctoral

Martinez, J.L. Jr., Rigter, H., Jensen, R.A., Messing, R.B. Vasquez, B.J. and McGaugh, J.L. Endorphin and enkephalin effects on avoidance conditioning: The other side of the pituitary-adrenal axis. En: Endogenous Peptides and Learning and Memory Processes. J.L. Martinez, R.A. Jensen, R. Messing, H. Rigter and J.L. McGaugh (Eds.). Academic Press, 1981, pp. 305-323.

McGaugh, J.L. Involvement of hormonal and neuromodulatory systems in the regulation of memory storage. Annual Review of Neuroscience, 12:255-287, 1989.

McGaugh, J.L. and Gold, P.E. Modulation of memory by electrical stimulation of the brain. En: Neural Mechanisms of Learning and Memory. M.R. Rosenzweig and E.L. Bennet (Eds.). MIT Press, 1976, pp. 549-560.

McGaugh, J.L. and Gold, P.E. Hormonal modulation of memory. En: Psychoneuroendocrinology. R.B. Brush and S. Levine (Eds.). Academic Press, 1989, pp. 305-339.

McGaugh, J.L. Introini-Collison, I.B. Cahill, L. Kim, M. and Liang K.C. Involvement of the amygdala in neuromodulatory influences on memory storage. En: The Amygdala: Neurobiological Aspects of Emotion, Memory and Mental Dysfunction. J.P. Aggleton, (Eds.). Wiley-Liss, 1992, pp. 431-451.

McGaugh, J.L. Introini-Collison, I.B. and Nagahara, A.H. Memory-enhancing effects of posttraining naloxone: Involvement of beta-noradrenergic influences in the amygdaloid complex. Brain Research, 446:37-49, 1988.

McGaugh, J.L. Introini-Collison, I.B., Nagahara, A.H. and Cahill, L. Involvement of the amygdaloid complex in neuromodulatory influences on memory storage. Neuroscience and Biobehavioural Reviews, 14:425-431, 1990.

Meser, W.S. Jr., Bohnett, M. and Stibbe, J. Evidence for a preferential involvement of M1 muscarinic receptors in representational memory, Neuroscience Letters, 116:184-89, 1990.

Mesulam, M.M. Human brain cholinergic pathways, En: Progress in Brain Research. Aquilonius, S.M. and Gilberg, P.G. (Eds). Elsevier Science Publishers, 1990, Vol.84, pp. 231-241.

Meyer, U., Wenk, H., Ott, T. and Wetzel, W. Behavioral investigations following cholinergic deafferentiation of the hippocampus by septal lesions in rats, Journal Fur Hirnforschung, 23:1-12, 1982.

Mishkin, M. Memory in monkeys severely impairment by combined but not by separate removal of amygdala and hippocampus. Nature, 273:297-298, 1978.

Quirarte, G.L.  
Tesis Doctoral

Mouton, P.R., Meyer, E.M., Dunn, A.J., Millard, W. and Arendash, G.W. Induction of cortical cholinergic hypofunction and memory retention deficits through intracortical AF64A infusions, *Brain Research*, 444:104-118, 1988.

Mufson, E.J., Presley, L.N. and Kordower, J.H. Nerve growth factor receptor immunoreactivity within the nucleus basalis (Ch4) in Parkinson's disease: reduced cell numbers and co-localization with cholinergic neurons, *Brain Research*, 1991, 539:19-30, 1991.

Myers, B. Some effects of scopolamine on passive avoidance response in rats, *Psychopharmacologia*, 8:111-119, 1965.

Nabeshima, T.A., Noda, Y., and Kameyama, T. GABAergic modulation of memory with regard to passive avoidance and conditioned suppression task in mice. *Psychopharmacology* 94:69-73, 1988.

Nakahara, N., Iga, Y., Saito, Y., Mizobe, F. and Kawanishi, G. Beneficial effects of FKS-508 (AF102B), a selective M1 agonist, on the impaired working memory in AF64A-treated rats, *Japanese Journal of Pharmacology*, 51:539-547, 1989.

Neill, D.B. and Grossman, P.S. Behavioral effects of lesions or cholinergic blockade of dorsal and ventral caudate of rats, *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 71:311-317, 1970.

Nielsen, J.A., Mena, E.E., Williams, I.H., Nocerini, M.R. and Liston, D. Correlation of brain levels of 9-amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine (THA) with neurochemical and behavioral changes, *European Journal of Pharmacology*, 173:53-64, 1989.

Orbach, J. and Fantz, R.L. Differential effects of temporal neo-cortical resections on overtrained and non-overtrained visual habits in monkeys. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 51:126-129, 1958.

Overstreet, D.H. Behavioural plasticity and the cholinergic system, *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 8:133-151, 1984.

Packard, M.G., Regenold, W, Quirion, R. and White, N.M. Post-training injection of the acetylcholine M2 receptor antagonist AF-DX 116 improves memory, *Brain Research*, 524:72-76, 1990.

Parent, M.B., Tomaz, C. and McGaugh, J.L. Increased training in an aversively motivated task attenuates the memory-impairment effects of posttraining N-Methyl-D-Aspartate-induced amygdala lesions. *Behavioral Neuroscience*, 106(5):791-799, 1992.



Pérez-Ruiz, C. and Prado-Alcalá, R.A. Retrograde amnesia induced by lidocaine injection into the striatum: Protective effect of the negative reinforcer, *Brain Research Bulletin*, 22: 599-603, 1989.

Pereira, M.E., Rosat, R., Huang, C.H., Godoy, M.G.C. e Izquierdo, I. Inhibition by diazepam of the effect of additional training and of extinction on the retention of shuttle avoidance behavior in rats. *Behavioral Neuroscience*, 103(1):202-205, 1989.

Prado-Alcalá, R.A. Is cholinergic activity of the caudate nucleus involved in memory ?, *Life Sciences*, 37:2135-2142, 1985.

Prado-Alcalá, R.A., Bermúdez-Rattoni, F., Velázquez-Martínez, D. and Bacha, M.G. Cholinergic blockade of the caudate nucleus and spatial alternation performance in rats: Overtraining-induced protection against behavioral deficits, *Life Sciences*, 23:889-896, 1978.

Prado-Alcalá, R.A., Cepeda, G., Verduzco, L., Jiménez, A. and Vargas-Ortega, E. Effects of cholinergic stimulation of the caudate nucleus on active avoidance, *Neuroscience Letters*, 51: 31-36, 1984.

Prado-Alcalá, R.A. and Cobos-Zapíaín, G.G. Learning deficits induced by cholinergic blockade of the caudate nucleus as a function of experience, *Brain Research*, 138:190-196, 1977.

Prado-Alcalá, R.A. and Cobos-Zapíaín, G.G. Improvement of learned behavior through cholinergic stimulation of the caudate nucleus, *Neuroscience Letters*, 14:253-258, 1979a.

Prado-Alcalá, R.A. and Cobos-Zapíaín, G.G. Interference with caudate nucleus activity by potassium chloride. Evidence for a "moving" engram, *Brain Research*, 172:577-583, 1979b.

Prado-Alcalá, R.A., Cruz-Morales, S.E, and López-Miro, F.A. Differential effects of cholinergic blockade of anterior and posterior caudate nucleus on avoidance behaviors, *Neuroscience Letters*, 18:339-345, 1980a.

Prado-Alcalá, R.A., Fernández-Samblancat, M. and Solodkin-Herrera, M. Injections of atropine into the caudate nucleus impair the acquisition and the maintenance of passive avoidance, *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 22:243-247, 1985.

Prado-Alcalá, R.A, Grinberg, Z.J., Alvarez-Leefmans, F.J., Gómez, A., Singer, S. and Brust-Carmona, H. A possible caudate-cholinergic mechanism in two instrumental conditioned responses, *Psychopharmacologia*, 25:339-346, 1972.

Quirarte, G.L.  
Tesis Doctoral

Prado-Alcalá, R.A., Kaufmann, P. and Moscona, R. Scopolamine and KCl injections into the caudate-putamen. Overtraining-induced protection against deficits of learning, *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 12:249-253, 1980b.

Prado-Alcalá, R.A., Signoret, L., and Figueroa, M. Time-dependent retention deficits induced by post-training injections of atropine into the caudate nucleus, *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 15:633-636, 1981.

Price, J.L. Russchen, F.T. and Amaral, D.G. The limbic region. II. The amygdaloid complex. En: *Handbook of Chemical Neuroanatomy*. A. Bjorklund, T. Hokfelt and L.W. Swanson (Eds.), Elsevier Science Publishers, 1987, pp. 279-388.

Raffaella, K.C. and Olton, D.S. Hippocampal and amygdaloid involvement in working memory for nonspatial stimuli. *Behavioral Neuroscience*, 102(3):349-355, 1988.

Ridley, R.M., Thornley, H.D., Baker, H.F., Fine, A. Cholinergic neural transplants into hippocampus restore learning ability in monkeys with fornix transections, *Experimental Brain Research*, 83:533-538, 1991.

Riekkinen, P.Jr., Aaltonen, M., Sirvio, J., Riekkinen, P., Tetrahydroaminoacridine alleviates medial septal lesion-induced and age-related spatial reference but not working memory deficits, *Physiology and Behavior*, 49:1147-1152, 1991

Riekkinen, P.Jr., Miettinen, R., Sirvio, J., Aaltonen, M. and Riekkinen, P. The correlation of passive avoidance deficit in aged rat with the loss of nucleus basalis choline acetyltransferase-positive neurons, *Brain Research Bulletin*, 25: 415-417, 1990.

Riekkinen, P.Jr., Sirvio, J. and Riekkinen, P. Interaction between raphe dorsalis and nucleus basalis magnocellularis in spatial learning, *Brain Research*, 527:342-345, 1990.

Rolls, E.T. Neurophysiology and functions of the primate amygdala. En: *The Amygdala: Neurobiological Aspects of Emotion, Memory and Mental Dysfunction*. In J.P. Aggleton (Eds.). Wiley-Liss, 1992, pp. 143-165.

Rush, D.K. Scopolamine amnesia of passive avoidance: a deficit of information acquisition, *Behavioral and Neural Biology*, 50:255-278, 1988.

Sandberg, K., Sanberg, P.R., Hanin, I., Fisher, A. and Coyle, J.T. Cholinergic lesion of striatum impairs acquisition and retention of a passive avoidance response, *Behavioral Neuroscience*, 98:162-165, 1984.

Sandkuhler, J., Maisch, B. and Zimmerman, M. The use of local anesthetic microinjections to identify central pathways: A quantitative evaluation of the time course and extend of the neuronal block. *Experimental Brain Research*, 68:168-178, 1987.

Sarter, R.C. and Markowitsch, H.J. Involvement of the amygdala in learning and memory: A critical review, with emphasis on anatomical relations. *Behavioral Neuroscience*, 99(2):342-380, 1985.

Schenk, F., Contant, B. and Werffeli, P. Intrahippocampal cholinergic grafts in aged rats compensate impairments in a radial maze and in a place learning task, *Experimental Brain Research*, 82:641-650, 1990.

Schwartzbaum, J.S. Response to changes in reinforcing conditions of bar-pressing after ablation of the amygdaloid complex in monkeys. *Psychological Reports*, 6:215-221, 1960.

Sherman, K.A., Kuster, J.E., Dean, R.L., Bartus, R.T. and Friedman, E. Presynaptic cholinergic mechanisms in brain of aged rats with memory impairments, *Neurobiology of Aging*, 2:99-104, 1981.

Slotnick, B.M. Olfactory discrimination in rats with anterior amygdala lesions. *Behavioral Neuroscience*, 99(5): 956-963, 1985.

Solana-Figueroa, R. and Prado-Alcalá, R.A. Retrograde amnesia produced by intrastriatal atropine and its reversal by choline, *Life Sciences*, 46:679-686, 1990.

Spangler, E. L., Rigby, P. and Ingram, D. K. Scopolamine impairs learning performance of rats in a 14-unit T-maze. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 25:673-679, 1986.

Spignoli, G., Magnani, M., Giovannini, M.G. and Pepeu, G. Effect of pyroglutamic acid stereoisomers on ECS and scopolamine-induced memory disruption and brain acetylcholine levels in the rat, *Pharmacological Research Commun*, 19:901-12, 1987.

Sterberg, D.B., Martinez, J.L.J., Gold, P.E. and McGaugh, J.L. Age-related memory deficits in rats and mice: *Behavioral and Neural Biology*, 44:447-453, 1985.

Sullivan, R.M. and Wilson, D.A. The role of the amygdala complex in early olfactory associative learning. *Behavioral Neuroscience* 107 (2):254-263.

Sutherland, R.J. and McDonald, R.J. Hippocampus, amygdala, and memory deficits in rats. *Behavioral Brain Research*, 37:57-79, 1990.

Quirarte, G.L.  
Tesis Doctoral

Tarricone, B.J., Keim, S.R., Simon, J.R., and Low, W.C. Intrahippocampal transplants of septal cholinergic neurons: high-affinity choline uptake and spatial memory function, *Brain Research*, 548:55-62, 1991.

Thatcher, R.W. and Kimble, D.P. Effect of amygdaloid lesions on retention of an avoidance response in overtrained and non-overtrained rats. *Psychonomic Science*, 6(1):9-10, 1966.

Thompson, J.B. and Schwartzbaum, J.S. Discrimination localized lesions in the amygdala and putamen. *Psychological Reports*, 15: 587-606, 1964.

Tilson, H.A. Age-dependent changes in receptor-stimulated phosphoinositide turnover in the rat hippocampus, *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 38:861-867, 1991.

Tomaz, C., Dickinson-Anson, H. and McGaugh, J.L. Amygdala lesions block the amnesic effects of diazepam. *Brain Research*, 568:85-91, 1991.

Tomaz, C., Dickinson-Anson, H. and McGaugh, J.L. Basolateral amygdala lesions block diazepam-induced anterograde amnesia in an inhibitory avoidance task. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89:3615-3619, 1992.

Verloes, R., Scotto, A.M., Gobert, J. and Wulfert, E. Effects of nootropic drugs in a scopolamine-induced amnesia model in mice, *Psychopharmacology*, 95:226-230, 1988.

Warburton, D.M. and Wesnes, K. Drugs as research tools in Psychology: Cholinergic drugs and information processing, *Neuropsychobiology*, 11:121-32, 1984.

Weiskrantz, L. Behavioral changes associated with ablation of the amygdaloid complex in monkeys. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 49:381-391, 1956.

Wolfman, C., Da Cunha, C., Jerusalinsky, D., Levi de Stein, M., Viola, H., Izquierdo, I., and Medina, J.H. Habituation and inhibitory avoidance training alter brain regional levels of benzodiazepine-like molecules and are affected by intracerebral flumazenil microinjection. *Brain Research*, 548:74-80, 1991.

Yamasaki, N., Kato, K., Kurihara, E. and Nagaoka, A. Cholinergic drugs reverse AF64A-induced impairments of passive avoidance learning in rats, *Psychopharmacology*, 103:215-222, 1991.

Zola-Morgan, S. Squire, L. The primate hippocampal formation: Evidence for a time-limited role in memory storage. *Science*, 250:288-290, 1990.

Quirarte, G.L.  
Tesis Doctoral

Zola-Morgan, S. Squire, L. and Amaral, D.G. Lesions of the amygdala that spare adjacent cortical regions do not impair or exacerbate the impairment following lesions of the hippocampal formation. *The Journal of Neuroscience*, 9 (6):1922-1936, 1989.

Zola-Morgan, S. Squire, L., Alavarez-Royo, P. and Clower, R. Independence of memory functions and emotional behavior: Separate contributions of the hippocampal formation and the amygdala. *Hippocampus*, 1(2):207-220, 1991.

### CAPITULO III

#### INTERACCIONES ENTRE LA MAGNITUD DEL REFORZAMIENTO Y TRATAMIENTOS QUE PRODUCEN MODIFICACIONES DE LA MEMORIA.

Existen en la literatura datos contradictorios referentes a los procesos de aprendizaje y memoria, ya que aún cuando el objetivo de conocer el funcionamiento del cerebro con respecto a dichos procesos es el mismo, y se emplean tratamientos similares, los resultados obtenidos frecuentemente son inconsistentes. Las contradicciones encontradas pueden ser explicadas en términos de las especies utilizadas, la edad de los sujetos, la forma de administración de los tratamientos y los procedimientos de aprendizaje.

En el presente capítulo revisaremos algunos estudios, en donde un mismo tratamiento produce efectos diferenciales sobre la memoria, dependiendo de los niveles de reforzamiento que se utilizaron durante el aprendizaje de los sujetos, habiéndose mantenido constantes el resto de los factores.

Hay que aclarar que la magnitud real de un reforzador negativo (choque eléctrico) percibido por un animal experimental depende de varios factores: intensidad (corriente), voltaje, frecuencia, duración del choque, resistencia de las parrillas o paredes a través de las que se aplica el choque, resistencia de las patas del animal, etc. Es costumbre que al reportar experimentos de esta índole, los autores solamente definan dos de los parámetros del choque utilizado: la intensidad y duración del

choque; rara vez se especifica el voltaje utilizado; casi nunca se habla acerca de los otros parámetros. Por lo anterior, los efectos de diferentes grados de reforzamiento solamente pueden compararse directamente dentro de un estudio o laboratorio particular, en los que se hayan utilizado el mismo estimulador, cámara de condicionamiento, especie animal, etc. En otras palabras, difícilmente pueden hacerse comparaciones directas entre diferentes estudios realizados en laboratorios diferentes.

Citaremos un ejemplo de nuestro laboratorio. Para obtener una conducta y efecto farmacológico determinados, se debe aplicar un choque eléctrico de 0.2 mA, con un estimulador determinado (Nucleoelectrónica, S.A.), mientras que para obtener lo mismo utilizando otro estimulador (BRS/LVE), se debe aplicar un estímulo de 4.0 mA (¡20 veces más corriente!). El primer aparato suministra corriente constante y directa (DC), generada por 1,300 voltios mientras que la corriente constante del segundo es de pulsos cuadrados, con 150 voltios.

En la mayoría de los estudios que se discuten a continuación, por las razones expuestas en los párrafos anteriores, se describirán los reforzadores negativos de diferentes magnitudes con los términos de "altos", "medianos" o "bajos", sin especificar las intensidades utilizadas.

Esta revisión estará formada por dos apartados, en función de la manera en que se aplicaron los tratamientos: sistémicamente o intracerebralmente.

### 3.1 INTERACCIONES ENTRE LA MAGNITUD DEL REFORZAMIENTO Y LOS EFECTOS DE TRATAMIENTOS APLICADOS SISTEMICAMENTE

Existen evidencias que señalan los efectos amnésicos producidos por la cloropromazina administrada en forma intraperitoneal sobre la ejecución de una respuesta condicionada instrumental (presionar una palanca). Los efectos de esta droga son marcados cuando los sujetos son entrenados con altos niveles de reforzamiento (Singh, 1964).

Se ha demostrado también que otro tipo de tratamientos como el choque electroconvulsivo administrado después del entrenamiento de una tarea de evitación pasiva produce amnesia y ésta es dependiente del intervalo de tiempo entre el entrenamiento y la administración del choque electroconvulsivo; además, estos factores interactúan con la intensidad del choque eléctrico recibido durante el entrenamiento. Los efectos amnésicos se produjeron cuando el intervalo de tiempo fue corto y el entrenamiento se realizó utilizando intensidades relativamente bajas (Ray y Bivens, 1968).

En otros estudios se demostró que la aplicación sistémica de escopolamina (una droga bloqueadora de los receptores colinérgicos muscarínicos), produjo efectos amnésicos cuando el reforzador negativo empleado en el entrenamiento de una tarea de evitación pasiva fue bajo en intensidad, y que cuando se aumentó la intensidad se produjo un efecto protector en contra de la amnesia. Los efectos amnésicos fueron dependientes de la dosis y del tiempo (Durán-Arévalo, Cruz-Morales y Prado-Alcalá, 1990;



Cruz-Morales, Durán-Arévalo, Díaz del Guante, Quirarte y Prado-Alcalá, 1992).

Otro experimento tuvo como objetivo conocer la participación del sistema colinérgico, pero en relación a la memoria de trabajo (MT) y la de referencia (MR) dependiente de diferentes niveles de entrenamiento. Se entrenaron ratas en un laberinto radial de ocho brazos, se inyectó escopolamina antes de la prueba y se registraron los errores durante ésta. No se encontraron errores entre los grupos controles. El bloqueo colinérgico produjo un aumento en los errores de la MT, pero no en la MR cuando el criterio de aprendizaje fue bajo. Cuando las ratas se entrenaron con un criterio alto de aprendizaje, se encontró deterioro en la MT y en la MR. Estos experimentos sugieren que el nivel de entrenamiento es la explicación de las discrepancias en los estudios que exploran los efectos anticolinérgicos sobre estos tipos de memoria (Lyndon y Nakajima, 1992).

También se sabe que algunos tratamientos hormonales administrados después del entrenamiento pueden influenciar los procesos de memoria (Gold y van Burskirk, 1976a y 1976b). Cuando se inyectan diferentes hormonas inmediatamente después del entrenamiento se observan efectos similares, en cierta forma, a los producidos por la aplicación de un choque de alta intensidad. En esos estudios se encontró que las inyecciones periféricas postentrenamiento de epinefrina, norepinefrina y hormona adrenocorticotrófica (ACTH) mejoran la retención cuando se realizan con un intervalo corto entre el entrenamiento y la administración, mientras que son inefectivas cuando se hace más

largo este intervalo (Gold y Van Burskirk, 1975, 1976).

En el mismo trabajo se realizó una serie de estudios encaminados a examinar algunas de las condiciones experimentales bajo las cuales las inyecciones de ACTH después del entrenamiento con diferentes parámetros de estimulación influyen los procesos de memoria. Los animales fueron entrenados en un ensayo de evitación pasiva y se probó la retención 24 horas después.

En el primer experimento se entrenaron con un choque débil (0.7 mA, 0.35 segundos duración, 60 Hz onda sinusoidal) e inmediatamente después se inyectaron tres dosis: 0.03, 0.3 y 3.0 IU. Con las primeras dos dosis se produjo una mejoría en la retención y con la dosis más alta amnesia, es decir, se obtuvo una curva dosis respuesta en forma de U invertida. Tanto el mejoramiento como el deterioro fue dependiente del tiempo, ya que estos efectos no se encontraron al inyectar dos horas después.

En el segundo experimento, los animales fueron entrenados y probados en la mañana, mostrando pobre retención comparados con los que se entrenaron y probaron en la tarde. Las inyecciones de ACTH sólo mejoraron la retención en las condiciones de la tarde. En un tercer experimento se estudiaron las interacciones entre los parámetros del choque eléctrico (0.4 mA/0.25 segundos, 0.5 mA/0.35 segundos, 0.7 mA/0.35 segundos, 2.0 mA/0.4 segundos) y el efecto de la ACTH, usando la dosis más alta. Se encontró mejoría en la retención con un choque débil y deficiencia con un choque más intenso.

Los resultados apoyan la idea general de que la ACTH puede modular el almacenamiento de información y sus efectos varían

con la dosis, el tiempo de inyección después del entrenamiento, el nivel de choque eléctrico usado durante el entrenamiento y la hora del día. Además pueden sugerir la posibilidad de que otros tratamientos postensayo puedan facilitar o entorpecer los procesos de memoria a través de mecanismos hormonales (Gold y Van Buskirk, 1976).

Se conoce que otras hormonas como la arginina-vasopresina modulan los procesos de memoria (De Wied, 1980). Con el propósito de evaluar su participación en diferentes condiciones experimentales, se midieron las concentraciones de arginina-vasopresina inmunoreactiva (IR-AVP) en el líquido cefalorraquídeo durante la adquisición y retención de una conducta de evitación pasiva. Se encontró que inmediatamente después de la prueba de retención, había niveles altos de IR-AVP en los sujetos entrenados con un choque de baja intensidad, pero los niveles de IR-AVP de los sujetos entrenados con un alto choque estuvieron por debajo del límite de detección. Los resultados sugieren una asociación entre la liberación central de AVP y la ejecución de una tarea de evitación pasiva entrenada con bajos niveles de reforzamiento. Además indican el papel de este péptido en los mecanismos neuronales subyacentes a los procesos de aprendizaje y memoria (Laczi, Gaffori, Fekete, Kloet, Wied, 1984).

La influencia de la administración subcutánea de otra hormona, la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH), se probó en la retención de evitación activa y pasiva en ratas. La inyección de LHRH inmediatamente después de la adquisición de

una respuesta de evitación activa en una caja de dos vías mejoró la retención probada 7 días después. Cuando el neuropéptido fue inyectado inmediatamente después de un condicionamiento de evitación pasiva, los efectos variaron de acuerdo a la intensidad del choque eléctrico usado. La LHRH aumentó la retención con un choque débil (0.20 y 0.35 mA) pero deterioró la retención cuando se uso un choque fuerte (0.70 y 1.0 mA). Los efectos de la LHRH parecen ser inespecíficos ya que se han observado efectos similares con diferentes hormonas. Estos resultados se discuten con base en las interacciones entre las inyecciones de hormonas periféricas y sustancias endógenas liberadas después del choque eléctrico.

Con respecto a neurotransmisores específicos, se ha propuesto que las vías monoaminérgicas podrían estar involucradas en el almacenamiento de la memoria (Mora y Díaz-Véliz, 1985), ya que se ha reportado que la retención de una respuesta adquirida puede ser influenciada al tratar a los sujetos con una variedad de drogas que alteran el metabolismo de las catecolaminas cerebrales, ya sea administradas antes o después del entrenamiento (Gorelick, Bozewicz y Bridger, 1975). Asimismo, se sabe que la reducción farmacológica de las catecolaminas centrales produce una interrupción de la ejecución de conductas que han sido bien aprendidas, como en las de evitación de dos vías, supresión condicionada de beber y apretón de palanca (Corrodi y Hanson, 1966; Hanson, 1965; Moore, 1960). Asimismo, se ha descrito que los efectos de tratamientos amnésicos pueden ser atenuados por la administración de norepinefrina (NE) (Stein,

Belluzi y Wise, 1975). Estos hallazgos han apoyado la hipótesis de que las catecolaminas juegan un papel neuromodulador en los procesos que subyacen al almacenamiento de información.

Experimentos subsecuentes reportan los efectos de la administración realizada después del entrenamiento, tanto central como periférica, de NE en la retención de ratas, a las cuales se les había administrado un inhibidor de la dopamina beta hidroxilasa, la dietilditiocarbamina (DDC) antes del entrenamiento. Los efectos encontrados dependieron de la intensidad del choque utilizado durante el entrenamiento de la tarea. Cuando la NE se administró centralmente se atenuaron los efectos inducidos por la DDC en los sujetos que fueron entrenados con un choque alto, pero no cuando se entrenaron con el choque bajo. Los efectos periféricos de la dosis más baja de NE atenuaron los efectos amnésicos del DDC, cuando el entrenamiento se realizó con choque alto e inyectando inmediatamente después del entrenamiento. Cuando los animales se entrenaron con choque bajo se requirieron altas dosis de NE para atenuar los efectos del DDC (Meligeni, Ledergerber y McGaugh, 1978).

En otro estudio se determinaron los efectos de la carencia de norepinefrina y dopamina, producida por el tratamiento de alfa metil-para-tirosina (AMPT), un inhibidor de la hidroxilación de la tirosina, sobre la adquisición y la retención de una respuesta de evitación pasiva. Además se midió la actividad espontánea en un campo abierto en forma de laberinto y la reactividad al choque eléctrico en las patas. Se hicieron también determinaciones de NE y dopamina.

La retención de la tarea de prevención pasiva fue menor cuando los animales se entrenaron con un choque alto, mientras que al ser entrenados con un choque bajo la droga produjo facilitación de la memoria. Las determinaciones espectrofotofluorométricas encontraron los niveles de norepinefrina y dopamina significativamente más bajos que los controles. No se encontraron diferencias significativas en la prueba de reactividad al choque en las diferentes intensidades utilizadas, y tampoco se encontraron diferencias en la prueba de campo abierto, por lo que los datos sugieren que la AMPT ejerce diferentes efectos en el condicionamiento de acuerdo a la fuerza con la que se aprendió la tarea (Hall y Meyer, 1975).

Otra demostración en relación a la importancia que tienen los parámetros experimentales durante la adquisición de una tarea sobre los efectos amnésicos y sobre la facilitación de la memoria es un trabajo reportado por Classen y Mondadori (1984), en el que demostraron porqué los efectos de la administración de morfina después del entrenamiento resultaban controversiales. Por un lado la administración de morfina después del entrenamiento producía facilitación de la memoria, mientras que otros trabajos reportaban deterioro. Con la finalidad de investigar esta diferencia, plantearon un experimento en donde estudiaron diferentes parámetros experimentales, tales como la intensidad del choque eléctrico utilizado para entrenar a los animales en una tarea de evitación pasiva así como diferentes dosis de morfina. Encontraron que la administración de dosis medianas y

relativamente altas de morfina produjeron facilitación de la memoria en la interacción con niveles bajos y moderados de choque eléctrico, bajo otras condiciones de dosis y de choque, la droga fue inefectiva o se encontró deterioro.

Entre las drogas que interfieren con la transmisión sináptica y que modifican algunos aspectos del aprendizaje y la memoria, se encuentran los nootrópicos del tipo del piracetam. Un experimento que se realizó con la finalidad de conocer la relación entre las variaciones del choque eléctrico aplicado durante el entrenamiento de una tarea de evitación pasiva y los efectos facilitatorios de la memoria no reveló diferencias entre cuatro sustancias diferentes que se usaron; los efectos de facilitación se encontraron cuando la administración se realizó después del entrenamiento y con choques bajo y moderado, no así con el choque alto. Los efectos los atribuyeron a las variaciones del nivel de estrés producido por el choque (Mondadori, Ducret y Borkowski, 1989).

### **3.2 INTERACCIONES ENTRE LA MAGNITUD DEL REFORZAMIENTO Y TRATAMIENTOS APLICADOS EN ESTRUCTURAS CEREBRALES**

Otra forma de abordar el estudio de los diferentes niveles de entrenamiento y su relación con la facilitación o el deterioro de los procesos de aprendizaje y memoria se ha hecho estudiando alguna estructura en particular, que se conoce que interviene en dichos procesos.

Una de las primeras aproximaciones fue la realizada por Orbach y Fantz (1956), cuyo diseño experimental tuvo la finalidad

de probar la posibilidad de que el aumento de la práctica pueda ser un parámetro que determina los efectos de las secciones bilaterales temporales neo-corticales en los monos rhesus. Algunos animales fueron entrenados y otros sobrentrenados en una tarea de discriminación visual. Cuando se concluyó el criterio de eficiencia en la ejecución se hicieron resecciones bilaterales temporales neocorticales y dos semanas después de esta operación los animales fueron reentrenados. Los resultados indicaron que la tarea entrenada fragilmente sufrió decremento post-operatorio y que los hábitos visuales practicados intensamente se vieron menos afectados después de la operación, mientras que no se observó deterioro en las discriminaciones visuales sobrentrenadas. Similarmente, la ejecución en la tarea de retardo a la respuesta no se vio afectada por la operación.

En 1966 Thatcher y Kimble llevaron a cabo un estudio sobre los efectos de lesiones electrolíticas en la amígdala sobre la retención de una respuesta de evitación activa en ratas sobrentrenadas y no sobrentrenadas. El choque eléctrico que los animales evitaban era constante, la variación del nivel de reforzamiento consistió en el número de ensayos. Encontraron que las ratas sobrentrenadas tuvieron una retención normal, mientras que en las no sobrentrenadas hubo deterioro. Estos resultados han sido corroborados recientemente en un experimento que también estuvo diseñado para examinar los efectos de las variaciones de reforzamiento sobre la retención de una tarea de evitación pasiva, en ratas a las que se les lesionó la amígdala con una neurotoxina después del entrenamiento. Como era de esperarse, el



aumento en el número de ensayos en la tarea atenúa el efecto amnésico producido por la lesión (Parent, Tomaz, McGaugh, 1992).

Por otro lado, una serie de hallazgos indican que la estimulación de la amígdala después del entrenamiento produce amnesia retrógrada. En estos estudios, los animales fueron entrenados en una variedad de tareas de evitación, incluyendo la evitación pasiva (Gold, Edwards, McGaugh, 1975; Gold, Macri, y McGaugh, 1973; Ilyutchenok y Vinnitsky, 1971; McDonough y Kesner, 1971), la evitación activa de un solo ensayo (Handwerker, Gold y McGaugh, 1974), y el entrenamiento de escape por discriminación visual (Gold, Rose, Hankins, Spanis, 1976).

Este efecto modulador sobre la memoria depende de los parámetros empleados en la tarea, específicamente del nivel de choque eléctrico usado durante el entrenamiento. Cuando se utilizó un nivel alto de choque se interfirió con la retención, pero cuando se entrenó con un nivel bajo, se encontró una facilitación (Gold, Hankins, Edwards, Chester y McGaugh, 1975). Sin embargo el efecto amnésico de la estimulación de la amígdala después del entrenamiento es atenuado por las lesiones de la estría terminalis (ST) o inyectando naloxona en el núcleo basal (bed nucleus) de la ST (Liang, y McGaugh, 1983; Liang, Messing y McGaugh, 1983).

Algunos estudios han reportado que el aprendizaje y la retención son deteriorados por la demedulación adrenal (Borrell, de Kloet, Versteeg y Bohus, 1983; Caldwell, 1962; Silva, 1974). Sin embargo, otros no reportan deterioros (Martinez, Rigter y Van der Gugten, 1980; Martinez, Vasquez, Rigter, Messing, Jensen,

Liang y McGaugh, 1980; Moyer y Bunnell, 1959; Silva, 1973).

Se ha propuesto que para la corteza adrenal y el sistema central noradrenérgico (Ogren y Fuxe, 1977; Robertson y Fibiger, 1976), las influencias de la médula adrenal y las de la amígdala modulan la formación de los procesos de memoria. Con este propósito se estudió el efecto de las lesiones de la ST y de la demedulación adrenal, solas o en combinación, sobre la retención de un entrenamiento de evitación pasiva variando la intensidad del choque eléctrico utilizado durante el entrenamiento. Los resultados mostraron que cuando se removió la médula adrenal se deterioró la retención de la tarea, pero sólo bajo condiciones de bajo entrenamiento. Las lesiones de la ST produjeron únicamente deficiencias con la más baja intensidad con la que los animales fueron entrenados. La combinación de la lesiones de ST y la demedulación adrenal no potenciaron los efectos de las lesiones de ST. Estos resultados apoyan la idea de que los parámetros de la tarea de aprendizaje son importantes para determinar las influencias sobre los procesos de la formación de la memoria (Liang y McGaugh, 1987).

Otra de las estructuras que se ha demostrado está involucrada en procesos de aprendizaje y de memoria, es el estriado (Divac y Oberg, 1979; Polgar, Sanberg y Kirby, 1981). Existen estudios que demuestran que su participación depende del nivel de reforzamiento con el cual los animales fueron entrenados. Las inyecciones de una droga anticolinérgica en el núcleo caudado de gatos que fueron entrenados a presionar una palanca produjo efectos amnésicos, sin embargo cuando el nivel de

entrenamiento se modificó aumentando el número de ensayos, la respuesta aprendida no se vio afectada (Prado-Alcalá, Cobos-Zapíaín, 1977). Efectos equivalentes fueron encontrados cuando este tipo de entrenamiento se realizó en otras especies y con otro tipo de tratamientos (Prado-Alcalá, Cobos-Zapíaín, 1979; Prado-Alcalá, Kaufmann, Moscona, 1980), así como en otro tipo de tarea más compleja, como la alternancia espacial (Prado-Alcalá, Bermúdez-Rattoni, Velázquez-Martínez, Bacha, 1978).

Existen estudios donde los efectos amnésicos de la atropina administrada en el estriado de ratas entrenadas en una tarea de evitación pasiva depende de los diferentes niveles de choque utilizados durante el entrenamiento de la tarea. El efecto amnésico se produjo sólo en los entrenados con un nivel bajo de choque. Cuando los animales fueron entrenados con un choque alto no se encontró el efecto amnésico (Giordano, Prado-Alcalá, 1986).

Otro experimento en el que se exploró el bloqueo de esta estructura, variando los niveles de choque y con la finalidad de explorar si algún sistema neuroquímico estriatal, diferente del colinérgico, participaba en la consolidación de la memoria, se realizó inyectando un anestésico local (el efecto de este tratamiento ha sido considerado como una lesión reversible) después del entrenamiento. Los resultados mostraron que aquellos animales entrenados con niveles bajos presentaron amnesia mientras que los entrenados con niveles altos mostraron una retención tan efectiva como los animales a los que no se les aplicó el tratamiento (Pérez-Ruiz y Prado-Alcalá, 1989).

En otro estudio (Cobos-Zapalaín y Prado-Alcalá, 1986) se demostró que la aplicación de picrotoxina en una estructura diferente, la sustancia nigra, produce un profundo estado amnésico de la tarea de evitación pasiva; cuando el mismo tratamiento se aplica a sujetos entrenados con niveles altos de choque eléctrico no se observan deficiencias en la memoria.

Otra estructura del sistema nervioso central que participa en procesos de memoria, es el núcleo parabraquial (NPB) (Ivanova, Bures, 1990a; Ivanova, Bures, 1990b; Tassoni, Bucherelli, Bures, 1992).

Se estudió el posible deterioro producido por la inyección de tetrodotoxina (TTX) en el NPB. La toxina se inyectó con diferentes intervalos (inmediatamente después del entrenamiento hasta 96 horas) y con diferentes intensidades de choque eléctrico, después de la adquisición de una tarea de evitación pasiva. Se encontró que cuando el choque fue bajo la TTX produjo una amnesia retrógrada sin importar el intervalo entre la adquisición y el tratamiento. Cuando los animales se entrenaron con choque alto se encontró efecto de la lesión cuando ésta se realizó inmediatamente después y a las 24 horas. A las 48 y 96 horas fue inefectiva.

Estos hallazgos suponen que el tiempo de consolidación de la memoria puede ser significativamente más corto al incrementar el número e intensidad de los estímulos aversivos. Por otro lado cuando se usan choques más moderados la consolidación del engrama necesita más tiempo (Bucherelli, Tassoni, 1992).

Como se desprende de la revisión presentada en los párrafos anteriores, parece ser que los efectos de facilitación de la memoria o los amnésicos dependen de las variaciones en la magnitud del reforzamiento, interactuando con el tipo de entrenamiento y el tratamiento empleado. Sin embargo, encontramos algunas excepciones en trabajos que reportan no haber encontrado efectos diferenciales sobre la memoria al variar los niveles de reforzamiento.

Un ejemplo de ellos fue el realizado por Weisman y Hamilton (1972); en esa investigación se lesionó el hipotálamo ventromedial (HVM) de ratas que después fueron entrenadas en una tarea de evitación de dos vías usando cuatro intensidades de choque eléctrico. Las ratas lesionadas tuvieron una retención significativamente mayor que las controles, y esta facilitación no estuvo relacionada con la intensidad del choque, ya que ejecutaron de igual forma en todos los niveles de estimulación aversiva. Las ratas controles ejecutaron mejor cuando fueron entrenadas con choque bajo que con alto. Parece ser que las lesiones del HVM deterioran la tendencia normal a inhibir el regreso al compartimiento de choque en este tipo de tarea.

#### REFERENCIAS

Borrell, J., De Kloet, Versteeg, D.H.G., and Bohus, B. Inhibitory avoidance deficit following short-term adrenalectomy in the rat: The role of adrenal catecholamines. *Behavioral and Neural Biology*, 39: 241-258, 1983.

Bucherelli, C., and Tassoni, G. Duration of retrograde amnesia induced by tetrodotoxin inactivation of the parabrachial nuclei is inversely related to the intensity of footshock in rat's passive avoidance response. *Behavioral Brain Research*, 49: 175-180, 1992.

Caldwell, D.F. Effects of adrenal demedullation on retention a conditioned avoidance response in the mouse. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 55:1079-1081, 1962.

Classen, W. and Mondadori, C. Facilitation or inhibition of memory by morphine: a question of experimental parameters. *Experientia*, 40:506-509, 1984.

Corrodi, H. and Hanson, D.L.F. Central effects of an inhibitor of tyrosine hydroxylation. *Psychopharmacologia*, 10: 116-125, 1966.

Cruz-Morales, S.E. Durán-Arévalo, M., Díaz del Guante, M.A. Quirarte, G. and Prado-Alcalá, R.A. A threshold for the protective effect of over-reinforced passive avoidance against scopolamine-induced amnesia. *Behavioral and Neural Biology*, 57: 256-259, 1992.

De Wied, D. Behavioral actions of neurohypophysial peptides. *Proceedings of the Royal Society of London*, 210:183-194, 1980.

Divac, I. and Oberg, R.G.E. *The neostriatum*. Oxford: Pergamon Press, 1979.

Durán-Arévalo, M., Cruz-Morales, S.E. and Prado-Alcalá, R.A. Is acetylcholine involved in memory consolidation of over-reinforced learning?. *Brain Research Bulletin*, 24:725-727, 1990.

Giordano, M. and Prado-Alcalá, R.A. Retrograde amnesia induced by post-trial injection of atropine into the caudate-putamen. Protective effect of the negative reinforcer. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 24:905-909, 1986.

Gold, P.E., Edwards, R., and McGaugh, J.L. Amnesia produced by unilateral, subseizure electrical stimulation of the amygdala in rats, *Behavioral Biology*, 15:95-105, 1975.

Gold, P.E., Hankins, L., Edwards, R.M., Chester, J., and McGaugh, J.L. Memory interference and facilitation with posttrial amygdala stimulation: effect on memory varies with footshock level. *Brain Research*, 86:509-513, 1975.

Gold, P.E., Macri, J., and McGaugh, J.L. amnesia produced by subseizure amygdala stimulation, *Behavioral Biology*. 9: 671-680, 1973.

Gold, P.E., Rose, R., Hankins, L., and Spanis, C. Impaired retention of visual discriminated escape training produced by subseizure amygdala stimulation. *Brain Research*, 118:73-85, 1976.

Gold, P.E. and Van Burskirk, R. Facilitation of time-dependent memory processes with post-trial epinephrine injections. *Behavioral Biology*, 13:145-153, 1975.

Gold, P.E. and Van Burskirk, R. Effects of posttrial hormone injections on memory processes. *Hormone and Behavior*, 7:509-517, 1976a.

Gold, P.E. and Van Burskirk, R. Enhancement and impairment of memory processes with posttrial injections of adrenocorticotrophic hormone. *Behavioral Biology*, 16:387-400, 1976b.

Gorelick, D.A. Bozewicz, T.R. and Bridger, W.H. The role of catecholamines in animal learning and memory. En: A.J. Friedhoff (Ed.), *Catecholamines and Behavior*, Vol. 2, Plenum Press, New York, 1975, pp. 1-30.

Hall, M.E. and Mayer, M.A. Effects of alpha methyl-para-tyrosine on the recall of a passive avoidance response. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 3:579-582, 1975.

Handwerker, M.J., Gold, P.E., and McGaugh, J.L. Impairment of active avoidance learning with post-training amygdala stimulation. *Brain Research*, 75:324-327, 1974.

Hanson, L.C.F. Disruption of conditioned avoidance responding following selective depletion of brain catecholamines. *Psychopharmacology*, 8:100, 1965.

Ilyutchenok, R.Y., and Vinnitsky, I.M. Influence of high-frequency stimulation of the amygdaloid complex on memory in rats, *Jurnal. Visshchei Nervnoi Deyatelnosti*, 21:1220-1222, 1971.

Ivanova, S.F. and Bures, J. Acquisition of conditioned taste aversion in rats is prevented by tetrodotoxin blockade of a small midbrain region centered around the parabrachial nuclei, *Physiology and Behavior*, 48:543-549, 1990a.

Ivanova, S.F. and Bures, J. Conditioned taste aversion is disrupted by prolonged effects of intracerebral injection of tetrodotoxin in rats. *Behavioral Neuroscience*, 104:948-954, 1990b.

Laczi, F., Gaffori, O., Fekete, M., de Kloet, E.R. and de Wied, D. Levels of arginine-vasopressin in cerebrospinal fluid during passive avoidance behavior in rats. *Life Sciences*, 34: 2385-2391, 1984.

Liang, K.C., and McGaugh, J.L. Lesions of the stria terminalis attenuate the amnesic effect of amygdaloid stimulation on avoidance responses. *Brain Research*, 274:309-318, 1983.

Liang, K.C. and McGaugh, J.L. Effects of adrenal demedullation and stria terminalis lesions on retention of an inhibitory avoidance response. *Psychobiology*, 15 (2):154-160, 1987.

Liang, K.C., Messing, R.B., and McGaugh, J.L. Naloxone attenuates amnesia caused by amygdaloid stimulation: The involvement of a central opioid system. *Brain Research*, 271: 41-49, 1983.

Lyndon, R.G. and Nakajima, S. Differential effects of scopolamine on working and reference memory depend upon level of training. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 43:645-650, 1992.

Martinez, J.L., Jr., Rigter, H., and Van Der Gugten, J. Enkephalin effects on avoidance conditioning are dependent on adrenal glands. In: *Endocrinology, neuroendocrinology, neuropeptides*. E. Stark, G.B. Makara, Zs. Acs, and E. Endroczi (Eds.). Pergamon/Akademia: Kiado. Vol. 13, 1980, pp. 273-277.

Martinez, J.L. Jr., Vasquez, B.J. Rigter, H., Messing, R.B., Jensen, R.A., Liang, K.C., and McGaugh, J.L. Attenuation of amphetamine induced enhancement of learning by adrenal demedullation. *Brain Research*, 195:433-443, 1980.

Meligeni, J.A., Ledergerber, S.A. and McGaugh, J.L. Norepinephrine attenuation of amnesia produced by diethyldithiocarbamate. *Brain Research*, 149:155-164, 1978.

McDonough, J.H., and Kesner, R.P. Amnesia produced by brief electrical stimulation of the amygdala or dorsal hippocampus in cats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 77: 171-178, 1971.

Mondadori, K., Ducret, T. and Borkowski, J. The memory-enhancing effects of the piracetam-like nootropics are dependent on experimental parameters. *Behavioral Brain Research*, 33:79-82, 1989.



Moore, E.K. Effects of Alpha methyltyrosine of brain catecholamines and conditioned behaviors in guinea pigs. *Life Sciences*, 5:142-143, 1960).

Mora, S. and Díaz-Véliz, G. Luteinizing-hormone-releasing hormone modifies retention of passive and active avoidance responses in rats. *Psychopharmacology*, 85:315-318, 1985.

Moyer, K.E., and Bunnell, B.N. Effect of adrenal demedullation on an avoidance response in the rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 52:215-216, 1959.

Ogren, S.O. and Fuxe, K. On the role of brain NA and the pituitary-adrenal axis in avoidance learning: I Studies with corticosterone. *Neuroscience Letters*, 5:291-296, 1977.

Orbach, J. and Fantz, R.L. Differential effects of temporal neo-cortical resections on overtrained and non-overtrained visual habits in monkeys. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 51:126-129, 1956. (chechar año)

Parent, M.B., Tomaz, C., and McGaugh, J.L. Increased training in an aversively motivated task attenuates the memory-impairing effects of posttraining N-Methyl-D-Aspartate-induced amygdala lesions. *Behavioral Neuroscience*. 106(5):789-797, 1992.

Pérez-Ruiz, C. and Prado-Alcalá. Retrograde amnesia induced by lidocaine injection into the striatum: Protective effect of the negative reinforcer. *Brain Research Bulletin*, 22:599-603, 1989.

Polgar, S., Sanberg, P.R. and Kirby, R.J. Is the striatum involved in passive avoidance behavior? A commentary. *Physiology, Psychology*, 9:354-358, 1981.

Prado-Alcalá, R.A., Bermúdez-Rattoni, F., Velázquez-Martínez, D. and Bacha, M.G. Cholinergic blockade of the caudate nucleus and spatial alternation performance in rats: overtraining-induced protection against behavioral deficits. *Life Sciences*, 23:889-896, 1978.

Prado-Alcalá, R.A. and Cobos-Zapalaín, G.G. Learning deficits induced by cholinergic blockade of the caudate nucleus as a function of experience. *Brain Research*, 138:190-196, 1977.

Prado-Alcalá, R.A. and Cobos-Zapalaín, G.G. Interference with caudate nucleus activity by potassium chloride. Evidence for a "moving" engram. *Brain Research*. 172:577-583, 1979.

Quirarte, G.L.  
Tesis Doctoral

Prado-Alcalá, R.A., Kaufmann, P., Moscona, R. Scopolamine and KCL injections into the caudate-putamen. Overtraining induced protection against deficits of learning. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 12:249-253, 1980.

Ray, O.S. and Bivens L.W. Reinforcement Magnitude as a determinant of performance decrement after electroconvulsive shock. *Science*, Vol 160:330-332, 1968.

Roberts, D.C.S. and Fibiger, H.C. Conditioned taste aversion induced by diethylthiocarbamate (DDC). *Neuroscience Letters*, 2:339-342, 1976.

Silva, M.T.A. Extinction of a passive avoidance response in adrenalectomized and demedullated rats. *Behavioral Biology*, 9: 553-562, 1973.

Silva, M.T.A. Effects of adrenal demedullation and adrenalectomy on an active avoidance response of rats. *Physiological Psychology*, 2:171-174, 1974.

Singh, S.D. Habit strength and drug effects. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 58:468-469, 1964.

Stein, L., Belluzi, J. and Wise, D.C. Memory enhancement by central administration of norepinephrine. *Brain Research*, 84: 329-335, 1975.

Tassoni, G. Bucherelli, C. and Bures, J. Post-acquisition injection of tetrodotoxin into the parabrachial nuclei elicits partial disruption of passive avoidance reaction in rats. *Behavioral and Neural Biology*, 57:116-123, 1992.

Thatcher, R.W. and Kimble, D.P. Effect of amygdaloid lesions on retention of an avoidance response in overtrained and non-overtrained rats. *Psychonomic Science*, 6:9-10, 1966.

Weisman, R.N. and Hamilton, L.W. Two-way avoidance responding following VMH lesions: Effects of varying shock intensity. *Physiology and Behavior*, 9:243-246, 1972.

## CAPITULO IV

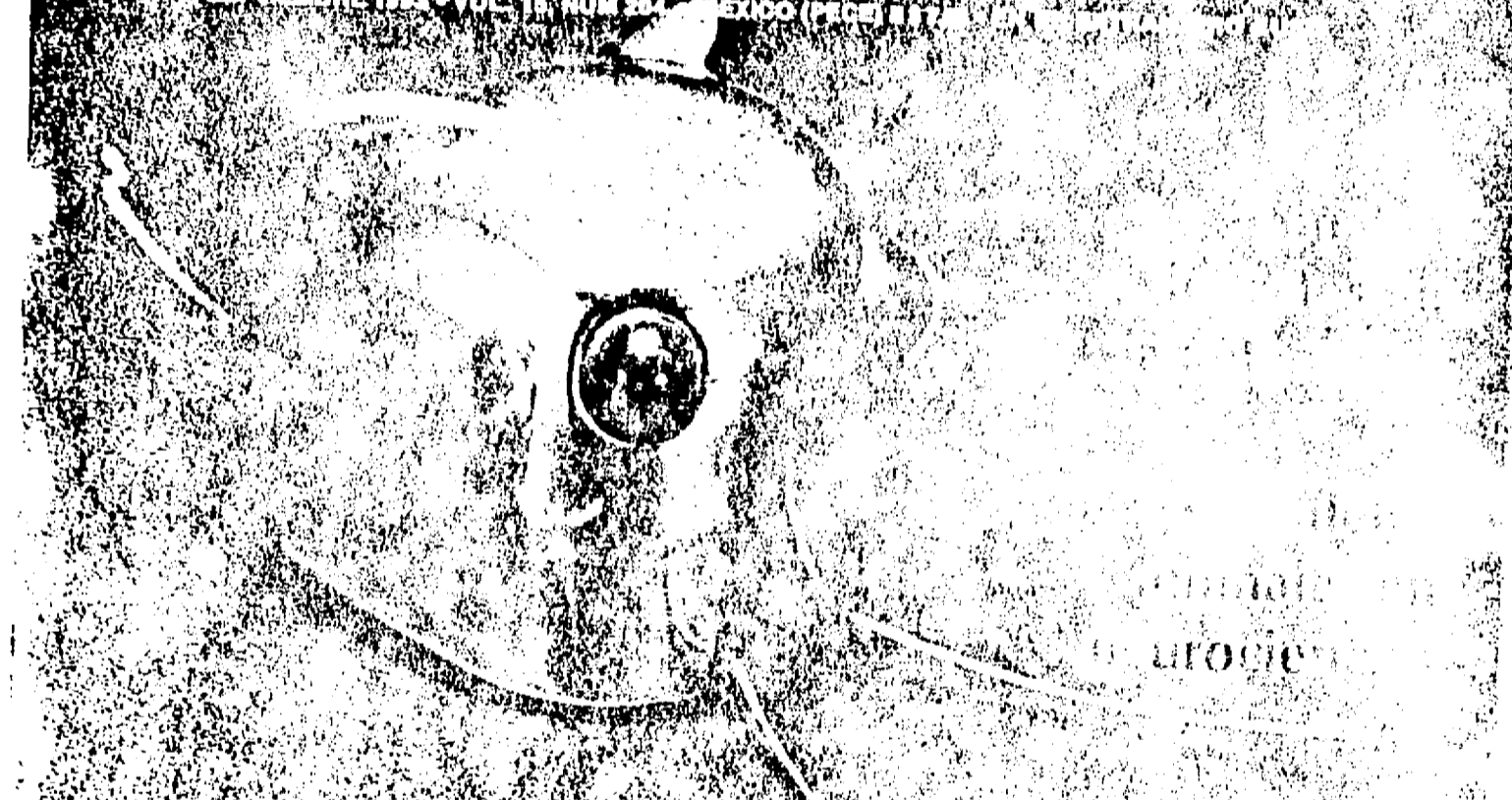
### EL CONDICIONAMIENTO DE PREVENCION PASIVA EN UN ENSAYO COMO HERRAMIENTA PARA EL ESTUDIO DE LA MEMORIA.

Una de las herramientas conductuales más utilizadas para estudiar procesos de memoria es el condicionamiento de prevención pasiva en un ensayo. Esta técnica fue utilizada en el presente trabajo y sus ventajas se describen en el artículo que se presenta a continuación.

INFORMACION •

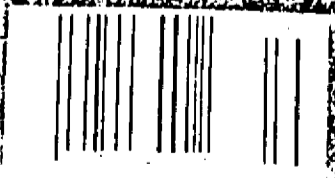
# CIENTIFICA Y TECNOLOGICA

SEPTIEMBRE 1984 VOL. 15 NUM. 264 25100 (P. 0-11) 11/84



## EL ROBOT MAS PEQUENO DEL MUNDO

ISSN 0188-5464



Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

26

FALLA DE ORIGEN



## La conducta y la mente

ROBERTO A. PRADO-ALCALÁ<sup>1</sup> Y  
GINA L. QUIRARTE<sup>2</sup>

El dilema de estudiarlos y entenderlos.

**E**l conocimiento de las funciones mentales del ser humano se ha basado principalmente en el estudio de sus patologías cognitivas. Sin embargo, este tipo de estudio habitualmente no nos permite hacer manipulaciones experimentales, con las que se pudieran establecer claramente interrelaciones (causa-efecto) entre estructuras cerebrales, eventos fisiológicos y funciones mentales.

Una alternativa para el estudio experimental de las bases biológicas de dichas funciones es el uso de modelos en animales infrahumanos. Sin embargo, el estudio en ellos también presenta serias dificultades, ya que difícilmente nos puede proveer de datos que puedan re-

lacionarse directamente con la actividad nerviosa superior que es característica de la especie humana.

Así pues, estamos ante una situación que actualmente no tiene una solución adecuada: podemos realizar estudios descriptivos y de correlación en el humano, con los que difícilmente podremos definir aspectos fisiológicos; o bien podemos hacer estudios experimentales en animales, que nos permiten conocer mecanismos, pero que dificultan el estudio de funciones mentales propias del humano.

A pesar de las limitaciones referidas, ambas aproximaciones han hecho importantes aportaciones al campo de los procesos cognitivos. En este ensayo haremos referencia a un modelo, desarrollado para animales infrahumanos, que es de uso corriente en los laboratorios dedicados al estudio de las bases biológicas del aprendizaje y la memoria.

Probablemente la dificultad más grande que encontramos con la utiliza-

<sup>1</sup> Doctor en psicología, es Profesor Titular C del Departamento de Fisiología de Facultad de Medicina de la UNAM y miembro del Sistema Nacional de Investigadores (SNI).

<sup>2</sup> Maestra en Ciencias (Sicobiología), es Profesora Titular de la Facultad de Psicología de la U. de G. y miembro del SNI.

ción de animales para determinar los procesos neurales subyacentes a la cognición, radica en el hecho de que, en contraste con el humano, no podemos tener una comunicación, a través del lenguaje, con los sujetos de experimentación.

Nos es imposible tener acceso a los contenidos intelectuales derivados de sus experiencias. Es por esto que el investigador ha tenido que desarrollar técnicas que le permitan inferir, con cierto grado de certeza, que al menos algunas especies animales son capaces de adquirir, procesar, almacenar y evocar información en forma equivalente a como lo hace el humano. Es decir, se trabaja bajo la suposición de que estas complejas funciones tienen una misma base fisiológica, y que las diferencias en capacidad que existen entre el ser humano y el resto del reino animal son simplemente diferencias en la cantidad y calidad de elementos cerebrales que participan en dichas funciones.

¿Cómo podremos preguntar a un animal infrahumano si es capaz de aprender, y cómo nos contestará esa pregunta? ¿Cómo podremos medir su capacidad para memorizar? ¿En qué regiones cerebrales se almacena la información adquirida a través de la experiencia? ¿Cuál es el sustrato neuroquímico de estos procesos? Este es el tipo de problemas a los que se enfrenta el neurocientífico conductual. Para resolverlos, tiene que echar mano de las herramientas propias del psicólogo, del biólogo, del fisiólogo, del farmacólogo y del bioquímico, y algunas veces (al tratar de compaginar sus hallazgos con su imagen del mundo que le rodea), con las del filósofo.

El aprendizaje es un cambio más o menos permanente de la conducta, derivado de cuando menos una experiencia previa, y que no depende de procesos de maduración, fatiga o de efectos pasajeros de fármacos. Es esta capacidad de aprendizaje la que nos permite comunicarnos con otras especies de animales.

Por ejemplo, podemos preguntarnos



¿Cómo podremos preguntarle si es capaz de aprender y cómo nos responderá?

si una rata es capaz de diferenciar entre dos estímulos visuales (digamos un triángulo y un círculo). Podemos colocar al roedor, previamente privado de comida durante algunas horas, frente a dos palancas; sobre una de ellas ponemos una tarjeta con la figura del trián-

gulo y sobre la otra una con la de un círculo. Cada vez que presione la primera palanca le damos acceso a una porción de comida; al presionar la segunda le aplicamos un leve choque eléctrico a través del piso de la cámara de entrenamiento. Encontraremos que des-

pués de unas cuantas sesiones de práctica, el roedor aprenderá a accionar la palanca con el triángulo y a evitar la otra palanca. Si después intercambiamos las tarjetas, el animal "seguirá" a la tarjeta asociada a la comida. De esta manera, nos está indicando que definitivamente puede diferenciar entre los dos estímulos visuales. Dependiendo del ingenio del investigador, se pueden establecer estrategias para obtener respuestas a preguntas más complejas.

Uno de los objetivos de las neurociencias conductuales es determinar las bases biológicas de la memoria, considerándola como un proceso que probablemente tenga los mismos fundamentos a lo largo de toda la escala filogenética. Es por ello que los científicos interesados en el conocimiento de las funciones cerebrales del humano, y debido a las restricciones éticas para utilizarlo como objeto directo de estudio, se valen de otras especies de mamíferos, cuyo sistema nervioso es similar al del humano.

Para ejemplificar lo anterior, supongamos que deseamos saber si alguna región cerebral particular está involucrada en la memoria. También podríamos preguntarnos si alguna sustancia química que se encuentra en esa estructura (neurotransmisor) es necesaria para que tal proceso se lleve a cabo.

Aunque este problema pudiera pa-

recer sencillo, dista mucho de serlo. Regresemos al ejemplo de la rata que aprendió a distinguir entre el triángulo y el círculo. Es evidente que en alguna parte de su anatomía (seguramente en su cerebro) se almacenó la información derivada de la experiencia con las tarjetas, comida y choque eléctrico. Supongamos que planteamos la hipótesis de que la acetilcolina del neocóstriado es necesaria para el almacenamiento de información. El neocóstriado es una estructura cerebral que se encuentra dañada en la enfermedad de Parkinson y la acetilcolina es uno de los principales neurotransmisores del neocóstriado.

Para someter a prueba experimental esta hipótesis, inyectaríamos en el neocóstriado un fármaco que bloquee la acción de la acetilcolina durante un tiempo prolongado; durante este bloqueo someteríamos a los sujetos al entrenamiento descrito. Supongamos que después de un buen número de sesiones, los animales fueran incapaces de ejecutar adecuadamente la tarea: podrían no presionar la palanca adecuada o presionarla aleatoriamente (unas veces la que le brinda comida y otras la que electrifica el piso de la cámara), o de plano podría ser incapaz de manipular cualquiera de las palancas.

¿Cómo interpretaremos este tipo de resultado? En principio parecería adecuado concluir que efectivamente la es-

tructura estudiada representa un almacén de información y, además, que la acetilcolina contenida en ella es indispensable para que se realice tal función, ya que al interferir con su funcionamiento normal, los animales no dan muestras de recordar la consecuencia que acarrea presionar cada una de las palancas. En otras palabras, nuestra hipótesis sería aceptada.

Sin embargo, un análisis más cuidadoso de los procedimientos utilizados nos impedirá aceptar aquellas conclusiones. Debemos tomar en consideración el hecho de que el aprendizaje al que fueron sometidas las ratas, implica la interacción de varios sistemas sensoriales: el visual (que permite al animal ver el círculo y el triángulo, las palancas, la comida y el resto del ambiente experimental), el gustativo (que se activa por la comida obtenida), el olfatorio, etc. Es claro que para accionar las palancas, la rata debe hacer uso de su buena coordinación motora. Otra condición que debe cumplirse es que el animal debe estar motivado para realizar la tarea, es decir, debe apetecer el alimento que le ofrecemos a cambio de presionar la palanca adecuada y, ante el choque eléctrico, deben activarse los receptores y centros nerviosos correspondientes, que mantendrán a la rata alejada de la palanca que electrifica el piso.

Habiendo hecho las consideraciones anteriores, ¿podemos aceptar la hipótesis propuesta? Pudiera ser que la memoria del animal siguiera intacta después de la inyección del fármaco, y que este tratamiento haya producido una distorsión de la información visual (impidiendo que el animal vea bien las palancas), gustativa u olfativa (alterando el sabor y olor del alimento), o bien un aumento en el umbral sensitivo (haciendo que no sienta la estimulación nociceptiva), o un problema de coordinación motora (incapacitándolo para manipular las palancas), un estado de anorexia (que lo llevaría a no desear el alimento); o bien, alguna combinación de los factores mencionados. Es decir, cualesquiera de los posibles efectos at-



El aprendizaje depende de los sistemas sensoriales.



## CONCIENCIA

teriores podrían interferir con la ejecución de la respuesta, sin que ello quiera decir que hemos encontrado un lugar de almacenamiento de información.

Así pues, aunque la estrategia elegida nos respondió la pregunta acerca de si un animal puede discriminar figuras, no sirvió para determinar si una estructura cerebral particular interviene en la memoria. Por lo tanto, es menester recurrir a un modelo que nos permita hacer interpretaciones inequívocas de los resultados.

Este modelo debe permitir el establecimiento del aprendizaje en un tiempo definible con precisión; de esta manera, se podrán aplicar tratamientos a intervalos específicos antes o después del aprendizaje, y así poder estudiar las diferentes etapas de la memoria. Además, deberá permitir que los tratamientos que se apliquen realmente actúen sobre los procesos de almacenamiento de información y no sobre el funcionamiento de sistemas de los que depende la mera ejecución de la respuesta aprendida (sistemas sensoriales, motores y motivacionales). En la mayoría de los modelos experimentales de aprendizaje, el entrenamiento se lleva a cabo a lo largo de múltiples sesiones; en consecuencia, la adquisición de la respuesta es gradual, lo que refleja un establecimiento gradual de la memoria. Por este motivo es difícil estudiar dicho proceso cognitivo. En cambio, un modelo que reúne aquellos requisitos es el de *prevención pasiva en un ensayo*.

En la prevención pasiva, el sujeto de experimentación aprende a evitar un evento desagradable inhibiendo su movimiento. Esta conducta la adquiere en un solo ensayo. En la situación típica, el entrenamiento se realiza en una cámara con dos compartimientos, separados por una puerta deslizante. Uno de los compartimientos, que se conoce como "de seguridad", generalmente está más iluminado que el otro, al que se le llama "de castigo"; el piso de este último tiene una rejilla metálica que puede ser electrificada.

Para iniciar la *única* sesión de entre-



Nosotros somos también animales de entrenamiento...

namiento, se coloca al animal en el compartimiento de seguridad y unos segundos más tarde se abre la puerta que separa ambos compartimientos. En el caso de las ratas, más del 95 por ciento pasan rápidamente al compartimiento opuesto. Esta conducta se debe a su alto grado de curiosidad, que las lleva a explorar nuevos ambientes, y a que son fotofóbicas, es decir, se alejan de la luz (recuérdese que el compartimiento de seguridad está más iluminado que el de castigo). Una vez que ha pasado, se cierra la puerta y se le aplica un choque en las patas, a través de la rejilla; inmediatamente después se abre la puerta de nuevo, permitiendo escapar a la rata al lugar de seguridad, y allí se le traslada a su jaula-habitación. Esta sesión tiene una duración promedio de menos de dos minutos. ¿Cómo podrá "decirnos" la rata si guardó esa experiencia en su memoria? Nos lo puede decir cuando cierto tiempo después (generalmente 24

horas) la regresamos al compartimiento de seguridad y luego abrimos la puerta; esta rata no pasará de nuevo al compartimiento de castigo, por lo que podemos inferir que *recuerda* que allí recibió una descarga eléctrica. A esta segunda sesión se le conoce como de retención o de prueba y durante ella ya no se aplica el evento aversivo.

¿Qué tiene de especial este modelo para el estudio de la memoria? En virtud de que el entrenamiento se lleva a cabo en una sola sesión de corta duración, se reduce considerablemente la posibilidad de que los resultados experimentales se compliquen por la intervención de factores incontrolables, tales como variaciones ambientales térmicas, de humedad, etc., que en el caso de entrenamientos de larga duración, pueden afectar la ejecución de los sujetos. Ya que el evento que asociará el animal para aprender es un choque eléctrico, se puede asegurar que el factor motivacio-



nal es razonablemente constante para todos los animales que sean entrenados; este factor motivacional puede variar cuando se utilizan tareas en las que se utiliza como evento asociativo.

En el caso de entrenamientos de múltiples ensayos, cada animal adquirirá la respuesta a un ritmo diferente del resto de los animales. Si el investigador quisiera igualar la experiencia de los sujetos, deberá entrenarlos durante un número fijo de sesiones; en este caso serán más diestros que otros (habrán almacenado la información más rápidamente). Si, por el contrario, los sujetos son entrenados hasta que todos alcancen el mismo criterio de ejecución, entonces tendremos animales que han sido entrenados con un número diferente de sesiones. En cualquiera de estas dos instancias no podremos tener un diseño experimental en el cual el factor principal (la memoria) pueda ser controlada adecuadamente.

Regresemos a la hipótesis planteada anteriormente: la acetilcolina del neocórtex es necesaria para el almacenamiento de información. En nuestro laboratorio hemos demostrado que esta hipótesis es correcta, haciendo experimentos como los que se describen a continuación.

Primero, mediante una sencilla operación quirúrgica, se coloca en forma permanente un par de cánulas, cuyas puntas quedan alojadas en el neocórtex de ratas. Después de una semana (suficiente para la recuperación del trauma quirúrgico) se somete a estos animales al entrenamiento de prevención pasiva y cinco minutos después se les inyecta, a través de las cánulas, una pequeña cantidad de una droga que bloquea la acción de la acetilcolina. Después de 24 horas, el entrenamiento se hace la prueba de retención (memoria) de la tarea, colocando al sujeto en el compartimiento de seguridad y abriendo la puerta de acceso al compartimiento de castigo.

Revisemos este procedimiento. Lo esencial radica en que los tratamientos son aplicados *después* del entrena-

to, y mucho antes de hacer la prueba de retención o memoria. Así, los animales tienen todas sus capacidades cerebrales intactas, ya que se encuentran libres de los efectos de la droga, tanto durante el aprendizaje como durante la sesión de retención, de tal manera que cualquier efecto que el tratamiento tuviera sobre la ejecución de la tarea no puede ser atribuido a defectos motores, perceptuales o sensoriales ni motivacionales (ya que la acción farmacológica directa de la droga dura una cuantas horas). Por lo tanto, esa posible deficiencia solamente puede achacarse a la producción de una interferencia y traerá como resultado el establecimiento de la memoria.

Hemos encontrado que con las dosis más altas de las drogas bloqueadoras, las ratas se comportan como si nunca hubieran recibido el choque eléctrico, es decir, regresan rápidamente al compartimiento en el que el día anterior fueron castigadas, presentando una total amnesia (o falta de memoria); si la dosis aplicada se reduce gradualmente, en diferentes grupos de ratas, veremos que la latencia para entrar al compartimiento de castigo es cada vez mayor, hasta que en dosis cero (correspondientes a la inyección del líquido en el que se disuelve la droga) no tienen efecto alguna sobre la memoria; en otras palabras, estos animales se comportan como aquellos que no fueron inyectados, no regresando al compartimiento aversivo.

Este modelo también ha servido para definir el límite temporal entre dos tipos de memoria: de corto y de largo plazo. En diferentes grupos de animales se inyectó en el neocórtex una dosis amnésica de un bloqueador de la acetilcolina a tiempos crecientes a partir del momento del entrenamiento (1.0, 3.5, 7.0, 15.0, 30.0 ó 60.0 minutos) y 24 horas más tarde se midió la retención. Encontramos un estado amnésico significativo en los animales inyectados en los primeros tres intervalos y una deficiencia en la retención de alrededor del 50 por ciento en aquellos inyectados quince minutos después del entrena-

miento. A los 30 y 60 minutos se encontraron retenciones perfectas. Estos datos indican que la memoria lábil o de corto plazo tiene una duración menor a 30 minutos, que a partir de este intervalo la memoria se consolida en forma permanente y que en la consolidación está involucrada la acetilcolina del neocórtex.

Con este sencillo y confiable modelo conductual se han podido identificar estructuras cerebrales así como diferentes neurotransmisores que intervienen en la memoria.



El animal ¿factor controla?

#### FE DE ERRATAS

Los números de las páginas de la fe de erratas se refieren a la numeración del artículo original.

pág. 22, 3er párrafo dice: subestrato; debe decir: substrato.

pág. 24., 2da columna, renglón 18, dice: y allí se le traslada a ....; debe decir: y de allí se le traslada a ...

pág. 25, 1era columna, 4to renglón, dice: este factor motivacional puede variar cuando se utilizan tareas en las que se utiliza como evento asociativo; debe decir: este factor motivacional puede variar cuando se utilizan tareas en las que se utiliza alimento como evento asociativo.

pág. 25, 2do párrafo, 7mo renglón dice: en este caso, serán más diestros que otros (habrán almacenado la información más rápidamente); debe decir: en este caso, en virtud de sus diferencias individuales, algunos animales serán más diestros que otros (habrán almacenado la información más rápidamente)

pág. 25, 4to párrafo, 12avo renglón dice: Después de 24 horas, el entrenamiento se hace la prueba de retención ...; debe decir: Después de 24 horas del entrenamiento, se hace la prueba de retención.....

pág 25, 2da columna, 14avo renglón dice: Por lo tanto, esa posible deficiencia solamente puede achacarse a la producción de una interferencia y traerá como resultado el establecimiento de la memoria; debe decir: Por lo tanto, esa posible deficiencia solamente puede achacarse a la producción de una interferencia con los procesos que se desencadenan después de la experiencia y que traerán como resultado el establecimiento de la memoria.

## CAPITULO V

### PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La finalidad del presente trabajo fue determinar si distintos grados de entrenamiento afectan diferencialmente los estados amnésicos producidos con tratamientos que típicamente interfieren con el establecimiento de la memoria (consolidación, mantenimiento o evocación). En otras palabras, se determinó si existe una correlación entre el nivel de entrenamiento y el grado de amnesia producida por la aplicación sistémica de un antagonista muscarínico y por la lesión irreversible de la amígdala.

### ANTECEDENTES RELEVANTES PARA LAS HIPOTESIS DE TRABAJO DEL EXPERIMENTO I.

Evidencias experimentales involucran al sistema colinérgico central en procesos de aprendizaje y de memoria, ya que cuando se bloquea su actividad se provoca un deterioro en dichos procesos, mientras que cuando se facilita su funcionamiento se encuentra una mejoría significativa tanto en la capacidad de aprendizaje como en la de memoria de una variedad de respuestas condicionadas, especialmente en la de prevención pasiva.

Existen hallazgos que confirman la idea de que la magnitud del reforzador está relacionada con la retención de la tarea en

mayor es la intensidad del reforzador, mayor es la protección contra el efecto amnésico provocado por los anticolinérgicos (ver Capítulo II).

Estos datos indican que en situaciones de sobrerreforzamiento, otros sistemas neuroquímicos se encuentran involucrados en la consolidación de la memoria, aunque se desconocen los efectos del bloqueo de la actividad colinérgica central cuando los sujetos son entrenados con intensidades bajas.

Existe solamente un reporte en el que se demuestra que cuando se aplican agentes bloqueadores colinérgicos en el estriado de ratas, que después de haber sido entrenadas para recibir un reforzador positivo alcanzan niveles de respuestas condicionadas significativamente más bajos que animales normales, dichas respuestas no sufren deterioro alguno. En otras palabras, parece ser menester que los sujetos de experimentación adquirieran un nivel mínimo de maestría en la ejecución de la respuesta condicionada para que el sistema colinérgico intervenga en los procesos de memoria (Valle, 1980; cita bibliográfica en la sección de referencias del Capítulo 7).

Este importante hallazgo no ha sido explorado con más detalle. En caso de que este fenómeno se repitiera, utilizando un reforzador distinto (reforzador negativo), nos encontraríamos ante un panorama que cambiaría completamente nuestra concepción acerca de la manera en que el sistema colinérgico, en particular, y probablemente los sistemas neuroquímicos cerebrales, en general, participan en los procesos mnémicos.

Basándonos en las consideraciones anteriores y con el propósito de explorar la posibilidad de que el bloqueo de la actividad colinérgica no produzca deterioros en la consolidación de la memoria, cuando los animales son entrenados en una tarea de prevención pasiva, utilizando intensidades de reforzador negativo (choque eléctrico) que estén por debajo de los niveles utilizados comúnmente en este tipo de aprendizaje, se planteó el presente experimento.

### HIPOTESIS

1. El bloqueo generalizado de la actividad colinérgica no producirá deterioros en la consolidación de la memoria, en animales entrenados en una tarea de prevención pasiva, utilizando intensidades bajas de estímulo nociceptivo.

2. El bloqueo generalizado de la actividad colinérgica producirá deterioros en la consolidación de la memoria, en animales entrenados en una tarea de prevención pasiva, utilizando intensidades intermedias de estímulo nociceptivo.

3. El bloqueo generalizado de la actividad colinérgica no producirá deterioros en la consolidación de la memoria, en animales entrenados en una tarea de prevención pasiva, utilizando intensidades altas de estímulo nociceptivo.

Estas hipótesis fueron sometidas a la prueba experimental que se presenta en el siguiente artículo.

# Protective Effect of Under-reinforcement of Passive Avoidance Against Scopolamine-induced Amnesia

GINA L. QUIRARTE,\* SARA E. CRUZ-MORALES,† MIGUEL A. DIAZ DEL GUANTE,‡  
MARITZA GARCIA§ AND ROBERTO A. PRADO-ALCALA§<sup>1</sup>

\**Facultad de Psicología, Universidad de Guadalajara; †ENEP-Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México; ‡Centro de Estudios Psicológicos, Universidad Veracruzana; and §Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-250, México, D.F. 04510, México*

QUIRARTE, G. L., 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(5) 521-524, 1993.—Administration of antimuscarinic drugs induces amnesia of aversively motivated behaviors. However, when relatively high intensities of footshock are used during training (over-reinforcement), animals become protected against such amnesic state. Moreover, the protective effect is established in a none-or-all fashion, i.e., within a series of increasing intensities a minute augmentation of footshock intensity is sufficient to reach the protective threshold. In the present experiment it was found that very low intensities of aversive stimulation (under-reinforcement), sufficient to produce learning, also protected animals from scopolamine-induced amnesia. These results suggest that acetylcholine is critically involved in memory consolidation of passive avoidance, but only within a limited range of training intensities.

Scopolamine-induced amnesia    Passive avoidance learning    Over-reinforcement    Under-reinforcement  
Memory consolidation

THERE is an abundance of reports showing that administration of anticholinergic drugs produces amnesia (2,5,10,15). One of the most used behavioral tests in this field is one-trial passive avoidance; in the majority of cases a profound amnesic state is produced by both pre- and posttraining injections of scopolamine [e.g., (1,4,12,14)], although some negative results have also been published (8,9).

There is also a growing body of evidence that suggests that in those cases where amnesia is produced by application of antimuscarinic drugs, either systemically or into specific areas of the brain, overtraining and over-reinforcement protect against amnesia [for references see (3)]. In the case of passive avoidance, it was reported that posttraining treatment with scopolamine produced the expected interference with consolidation. When footshock intensities were increased two- and threefold, however, the animals showed near-perfect responding (4). In a subsequent study, it was found that the protective effect of over-reinforcement is established, not in a gradual manner, but in an all-or-none fashion (3). These results suggest that by increasing the magnitude of the negative reinforcer, a threshold is reached where cholinergic activity of the nervous system is not necessary for the development of the consolidation process.

Taken together, these results indicate that central acetylcholine is involved in memory consolidation of tasks that had been

learned within certain parameters of training, which are below those corresponding to overtraining and over-reinforcement. There is a conspicuous lack of reports dealing with the effects of interference with cholinergic-synaptic activity (or with any kind of synaptic activity) on memory consolidation of under-reinforced learning. The purpose of the present experiment was threefold: a) to further validate the amnesic effect of antimuscarinic treatment; b) to replicate the protective effect of over-reinforcement; and c) to determine the effects of cholinergic blockade on the consolidation of under-reinforced passive avoidance.

## GENERAL METHOD

### Animals

Experimentally naive male Wistar rats, weighing between 250 and 350 g were used. They were individually housed in a temperature-controlled environment, and had free access to solid food and tap water in their home cages. They were kept in these conditions starting at least 5 days before the experiments were initiated.

### Apparatus

Training and testing were carried out in a wooden box with two compartments of the same size (30 × 30 × 30 cm), separated

<sup>1</sup>To whom requests for reprints should be addressed.

by a guillotine door. The lid of each compartment and the guillotine door were made of orange-colored lucite. The floor of one of the compartments was a grid made of aluminum bars (6 cm in diameter), separated 1.5 cm center to center. The V-shaped lateral walls of the second compartment were stainless steel, and each was continuous with half the floor; there was a 1.5 cm slot separating each half floor. Thus, when in this compartment, the rats were in contact with both walls, which could be electrified with the use of a square-pulse stimulator (Grass Instruments Co., model S-44) connected in series with a constant current unit (Grass Instruments Co., model CCU1). Illumination was provided by a 10 W light bulb located in the center of the lid of the compartment with the grid. The conditioning box was located inside a dark, sound-deadening room, provided with background masking noise (BRS/LVE, model AU-902).

#### Training and Testing

During training each animal was put inside the gridded compartment of the conditioning box; 10 s later the door between the compartments was opened and the latency to enter the darker (electrifiable) compartment with all four paws was measured. Once in the second compartment the door was closed and a footshock was delivered through the stainless steel plates (footshock intensities will be specified below); after 5 s the door was reopened, thus allowing the animal to escape to the first compartment and to remain there for 30 s before being put back in its home cage. After escaping, the footshock was turned off. Twenty-four hours later a test of retention was programmed exactly as the training session, except that the footshock was omitted. If a rat did not cross within 300 s to the compartment where the shock had been given the session was ended and a score of 300 was assigned.

#### Statistics

The data derived from the retention tests were not distributed normally because of the cut-off point of 300 s. Because the nature of the data did not allow the use of parametric statistics, the Kruskal-Wallis analysis of variance was computed on retention latencies among the groups. Where appropriate, the Mann-Whitney *U*-test was used to compare performances between pairs of groups (13).

### EXPERIMENT 1

As mentioned in the introduction, although there are many reports showing that scopolamine treatment induces amnesia of passive avoidance, some authors have not found this effect (8,9). This experiment was designed to further test the effects of this antimuscarinic drug on consolidation of passive avoidance, and to determine the appropriate dose to be used in Experiment 2.

#### Treatments

Independent groups of rats were studied ( $n = 10$  rats per group). These animals were trained with 0.7 mA. There were seven groups of animals: untreated, injected with isotonic saline solution, with 8.0 mg/kg of methylscopolamine (Sigma), or with 2.0, 4.0, 6.0, or 8.0 mg/kg of scopolamine hydrobromide (Sigma). All drugs were dissolved in isotonic saline, and doses refer to the salts; injections were administered intraperitoneally, 5 min after training. These doses of scopolamine were chosen because in previous experiments it was found that 2.0 and 4.0 mg/kg did not produce memory impairments, 6.0 mg/kg produced a

50% deficit in retention, while 8.0 and 12.0 mg/kg induced a profound amnesic state (4).

#### Results and Discussion

Highly significant differences became evident when comparing retention scores,  $H(6) = 29.67$ ,  $p < 0.0001$ . The *U*-tests showed that during retention testing there were no significant differences among the groups, except for the animals that had been injected with 8.0 mg/kg of scopolamine, which showed a marked amnesic state and differed from each of the rest of the groups ( $p$ 's ranging from 0.001 to 0.0001); the group that had been treated with 6.0 mg/kg of scopolamine showed a retention score between those of the animals treated with 4.0 and 8.0 mg/kg of scopolamine ( $p$ 's = 0.02 and 0.001, respectively), which is very similar to that reported earlier (4). Figure 1 depicts these results.

The amnesic effects of scopolamine (1) were replicated, and strengthen the view that central acetylcholine is importantly involved in memory consolidation. The fact that the animals that had been injected with saline showed as good retention scores as the animals that did not receive any treatment indicates that those deficits observed after drug injection were not due to possible stress reactions derived from the injection procedure.

It has been reported that small doses of muscarinic blockers, given before training of passive avoidance, produce significant retention deficits, as compared with relatively high doses needed to produce amnesia when administered posttraining (e.g., 0.3 mg/kg vs. 10 to 30 mg/kg of scopolamine) (1). In our case, amnesia was obtained with 6 and 8 mg/kg, but not when 2 or 4 mg/kg had been injected. It is likely that pretraining administration is more effective because animals are trained when muscarinic receptors are blocked, and, thus, the possibilities of impeding the consolidation process, in which acetylcholine is presumably involved is greater; in contrast, when the drugs are given after training, a number of acetylcholine-receptors had been activated, and a higher dose is needed to counterbalance this process.

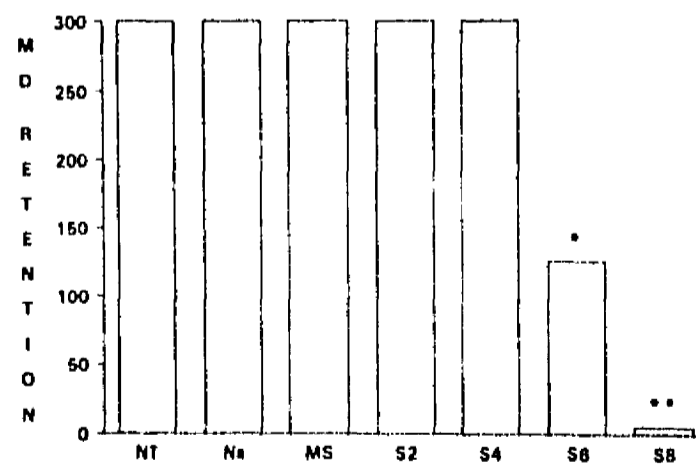


FIG. 1. Bars represent median retention scores (in seconds) of the groups that were trained with 0.7 mA. Abbreviations are as follows: NT, not treated; the rest of the groups were injected, intraperitoneally, 5 min after training with: Na, isotonic saline solution; MS, methylscopolamine (8.0 mg/kg); or scopolamine hydrobromide (S2, S4, S6, and S8; 2.0, 4.0, 6.0, and 8.0 mg/kg, respectively). \* $p < 0.02$  vs. S4; \*\* $p < 0.001$  vs. each of the rest of the groups.

That the interference with consolidation of the task was due to blockade of central muscarinic receptors can be inferred from the fact that the injection of methylscopolamine, which does not readily cross the blood-brain barrier, did not produce retention deficits. The lack of effect of the methylscopolamine (3,7) and of the lower doses of scopolamine had been earlier demonstrated (4); these findings suggest that a certain number of central muscarinic receptors must be blocked to impede the consolidation process.

#### EXPERIMENT 2

It has been consistently found that both overtraining and over-reinforcement protect against the amnesic effects of systemic and central administration of muscarinic blockers [e.g., (3,4,6,11)]. These findings prompted us to explore the effects of anticholinergic treatment on memory consolidation of a task learned under conditions of low levels of reinforcement.

#### Treatments

Eleven groups of rats ( $n = 20$  per group) were studied. Each group was trained with one of the following footshock intensities: 0.0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, or 1.0 mA. Half the groups was injected, 5 min after training, with 8.0 mg/kg of scopolamine hydrobromide (Sigma), dissolved in isotonic saline solution (this dose refers to the salt). The data referring to the animals trained with 0.7 mA were taken from Experiment 1.

#### Results and Discussion

There were highly significant differences during retention testing,  $H(21) = 132.03$ ,  $p < 0.0001$ . Figure 2 shows that, for the untreated groups, as the intensity of footshock used during training was increased, a correlative increment in retention latencies was produced until, starting at 0.6 mA, optimal performance was achieved. However, there was no indication of learning in the groups trained with 0.1 and 0.2 mA, inasmuch as their performances did not differ significantly from that of the group that did not receive any footshock during training (0.0 mA group). Starting at 0.3 mA, all groups showed significantly higher retention scores than the latter group ( $p$ 's ranging from 0.03 to 0.0001).

With respect to the effects of scopolamine treatment, no differences in retention were found within any given intensity, except for those groups that had been trained with 0.7 and 0.8 mA, where the drugged animals showed a significant impairment in retention relative to their respective controls ( $p < 0.02$ ).

It is interesting to note that when a footshock of 0.6 mA was used during training, both the control and the scopolamine-treated groups showed perfect retention; thus, it can be postulated that, although behaviorally these animals showed excellent memory—and because scopolamine did not interfere with retention—the aversive experience was not intense enough to drive cholinergic neurons to produce consolidation, and that other neurochemical systems intervened in this function; alternatively, acetylcholine may participate in under-reinforced learning, but is not indispensable for its establishment.

No motor, perceptual, or motivational interferences can be postulated to explain these results, because for every intensity retention latencies of the scopolamine-treated animals did not differ significantly from the controls (except for the 0.7 and 0.8 mA groups); thus, if the drug had affected some nonassociative functions then the same latencies should have been found in all of the scopolamine-treated groups; such was not the case. Another argument against possible nonassociative interference with

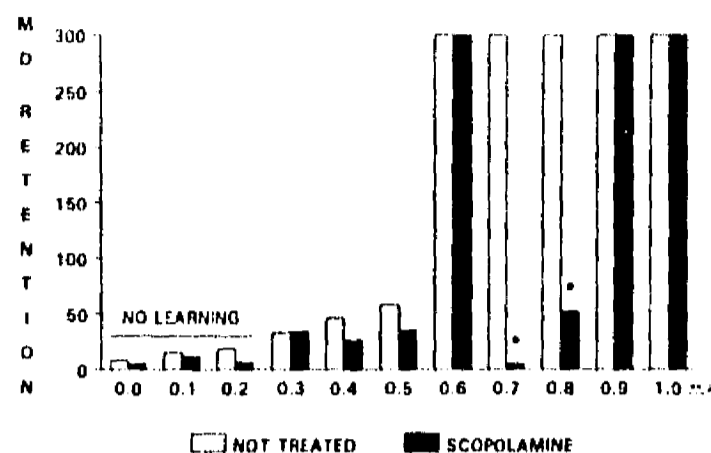


FIG. 2. Bars represent median retention scores (in seconds). Figures under bars represent intensity of footshock (mA) used during training. The experimental groups (SCOPOLAMINE) were injected with scopolamine hydrobromide (8.0 mg/kg). All treatments were administered 5 min after training. The retention scores of the groups that had been trained with 0.1 and 0.2 mA did not differ significantly from that of the groups that was not given footshock (NO LEARNING). \* $p < 0.02$  vs. its control group.

performance is the fact that all animals were trained and tested in a nondrugged state, i.e., the antimuscarinic drug was injected after training, and retention testing was conducted 24 h later.

Consistent with the literature, the results of Experiment 2 validate, once again, the reported amnesic effects of scopolamine (1,2,5,10,15); they also represent a replication of the protective effect of over-reinforcement against antimuscarinic-induced amnesia (3,4); memory consolidation was disrupted when scopolamine was injected after training with 0.7 and 0.8 mA, but it was totally ineffective when the footshock intensity was increased to 0.9 and 1.0 mA.

The main finding of this experiment was that scopolamine did not produce retention deficits when the animals had been submitted to under-reinforced learning (0.3–0.6 mA). This surprising outcome suggests that just as there is a threshold for the protective effect of over-reinforcement against scopolamine-induced amnesia (3), there also seems to be a minimal amount of aversive stimulation that must be reached to activate the cholinergic mechanisms that are involved in memory consolidation.

Taken together, these findings suggest that within a certain—rather limited—range of aversive intensities, acetylcholine receptors must be active so that consolidation may occur; however, in conditions of under-reinforcement, when the properties of environmental stimulation seem not to be threatening to the integrity of the organism, acetylcholine is not essential for the storing of information derived from that stimulation. At the other end of the intensity scale, once a threshold is reached (in the present case, an increment of one-tenth of a milliamper, i.e., from 0.8 to 0.9), cholinergic blockade is also ineffective in producing amnesia because, probably, other neurochemical systems take over the mnemonic functions that had been played by acetylcholine.

This proposition does not imply that in conditions of over-reinforcement or of under-reinforcement the cholinergic systems are not involved in memory consolidation. What is implied is that several systems may be simultaneously involved, in such a way that when one system is functionally hindered the concurrent activity of other systems is sufficient for the development of memory.



## REFERENCES

1. Hammer, G. Pharmacological investigations of neurotransmitter involvement in passive avoidance responding: A review and some new results. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 6:247-296; 1982.
2. Bartus, R. T.; Dean, R. L.; Pontecorvo, M. J.; Flicker, C. The cholinergic hypothesis: A historical overview, current perspectives, and future directions. *Ann. NY Acad. Sci.* 44:332-358; 1985.
3. Cruz-Morales, S. E.; Durán-Arévalo, M.; Díaz del Cuante, M. A.; Quirarte, G.; Prado-Alcalá, R. A. A threshold for the protective effect of over-reinforced passive avoidance against scopolamine-induced amnesia. *Behav. Neural Biol.* 57:256-259; 1992.
4. Durán-Arévalo, M.; Cruz-Morales, S. E.; Prado-Alcalá, R. A. Is acetylcholine involved in memory consolidation of over-reinforced learning? *Brain Res. Bull.* 24:725-727; 1990.
5. Fibiger, H. C. Cholinergic mechanisms in learning, memory and dementia: A review of recent evidence. *Trends Neurosci.* 14:220-223; 1991.
6. Giordano, M.; Prado-Alcalá, R. A. Retrograde amnesia induced by posttrial injection of atropine into the caudate-putamen. Protective effect of the negative reinforcer. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 24:905-909; 1986.
7. Glick, S. D.; Zimmerberg, B. Amnesic effects of scopolamine. *Behav. Biol.* 7:245-254; 1972.
8. Lewis, D. J.; Bregman, N. J. The cholinergic system, amnesia and memory. *Physiol. Behav.* 8:511-514; 1972.
9. Myers, B. Some effects of scopolamine on passive avoidance response in rats. *Psychopharmacologia* 8:111-119; 1965.
10. Overstreet, D. H. Behavioural plasticity and the cholinergic system. *Prog. NeuroPsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 8:133-151; 1984.
11. Prado-Alcalá, R. A.; Cobos-Zapata, G. G. Learning deficits induced by cholinergic blockade of the caudate nucleus as a function of experience. *Brain Res.* 138:190-196; 1977.
12. Rush, D. K. Scopolamine amnesia of passive avoidance. A deficit of information acquisition. *Behav. Neural Biol.* 50:255-278; 1988.
13. Siegel, S. *Nonparametric statistics for the behavioral sciences*. Tokyo: McGraw-Hill Kogakusha, Ltd.; 1956.
14. Spignoli, G.; Magnani, M.; Giovannini, M. G.; Pepen, G. Effect of pyroglutamic acid stereoisomers on ECS and scopolamine-induced memory disruption and brain acetylcholine levels in the rat. *Pharmacol. Res. Commun.* 19:901-912; 1987.
15. Warburton, D. M.; Wesnes, K. Drugs as research tools in psychology: Cholinergic drugs and information processing. *Neuropsychobiology* 11:121-132; 1984.

## CAPITULO VI

El siguiente paso en el desarrollo experimental de esta tesis fue determinar si, al igual que en el caso anterior (Capítulo V), la aplicación de un reforzador negativo de baja y alta intensidad es capaz de impedir los efectos amnésicos típicos producidos por la lesión irreversible de la amígdala.

### ANTECEDENTES RELEVANTES PARA LAS HIPOTESIS DE TRABAJO DEL EXPERIMENTO II.

Existen hallazgos que demuestran la participación de la amígdala en procesos de aprendizaje y memoria. Al parecer el almacenamiento de la memoria en esta estructura está restringido a un período crítico después del aprendizaje

Algunas evidencias sugieren que la amígdala tiene un papel modulador en los procesos de aprendizaje y memoria, ya que los efectos de muchos tratamientos farmacológicos y de lesión administrados después del entrenamiento son dependientes del tiempo.

Existen controversias en experimentos diseñados a investigar los efectos de lesiones en la amígdala después del entrenamiento. Algunos de estos experimentos indican que las lesiones en la amígdala realizadas después del entrenamiento deterioran la retención de la tarea entrenada, mientras que otros estudios indican que la retención no se altera.

Algunas evidencias sugieren que estos datos contradictorios

obtenidos en diferentes experimentos, pueden deberse en parte a las diferencias en la magnitud del reforzamiento administrado durante el entrenamiento (ver Capítulo II).

Un experimento reciente que fue diseñado para examinar los efectos de las variaciones de reforzamiento sobre la retención de una tarea de evitación pasiva, en ratas a las que se les lesionó la amígdala con una neurotoxina después del entrenamiento. Las variaciones en el reforzamiento consistieron en dar 1, 10 o 20 ensayos. El aumento en el número de ensayos en la tarea atenuó el efecto amnésico producido por la lesión (Parent, Tomaz, McGaugh, 1992; cita bibliográfica en la sección de referencias del Capítulo 7).

Este hallazgo no ha sido explorado con más detalle. Si este fenómeno se repitiera, utilizando como variaciones en el reforzamiento diferentes magnitudes de choque eléctrico en las patas del animal se podría apoyar la hipótesis de que la amígdala no es un sitio de cambios permanentes subyacente a los aprendizajes motivados aversivamente, lo cual ampliaría el conocimiento de la participación de esta estructura en los procesos de memoria.

Basándonos en las consideraciones anteriores y con el propósito de explorar la posibilidad de que las lesiones de la amígdala produzcan diferentes grados de la retención de una tarea de prevención pasiva, utilizando en el entrenamiento de los animales diferentes intensidades de reforzador negativo (choque eléctrico), se planteó el presente experimento.

## HIPOTESIS

1. La lesión irreversible de la amígdala, inducida por la aplicación de NMDA no producirá deterioros en la evocación de la memoria, en animales entrenados en una tarea de prevención pasiva, utilizando intensidades bajas de estímulo nociceptivo.

2. La lesión irreversible de la amígdala, inducida por la aplicación de NMDA producirá deterioros significativos en la evocación de la memoria, en animales entrenados en una tarea de prevención pasiva, utilizando intensidades intermedias de estímulo nociceptivo.

3. La lesión irreversible de la amígdala, inducida por la aplicación de NMDA no producirá deterioros en la evocación de la memoria, en animales entrenados en una tarea de prevención pasiva, utilizando intensidades altas de estímulo nociceptivo.

Estas hipótesis fueron sometidas a la prueba experimental que se presenta en el siguiente manuscrito.

## BRIEF COMMUNICATIONS

### Spared Retention of Inhibitory Avoidance Learning

#### Following Posttraining Amygdala Lesions

Marise B. Parent, Gina L. Quirarte\*, Larry Cahill & James L. McGaugh

Center for the Neurobiology of Learning and Memory &

Department of Psychology, University of California, Irvine

\*Department of Physiology, Faculty of Medicine,

Universidad Nacional Autonoma de Mexico, Mexico

This research was supported by a 1967 Natural Science and Engineering Research Council of Canada fellowship to Marise B. Parent, a PADEP-UNAM Grant 012312 to Gina L. Quirarte, NIA National Research Service Award AG00096 to Larry Cahill, and a USPHS Grant MH12526 from NIMH & NIDA to James L. McGaugh. We thank Dr. Ines Introini-Collison for her helpful comments on an earlier version of this manuscript, Mary West for her technical assistance, and Nancy Collet for her assistance in the preparation of this article. Correspondence concerning this article should be addressed to Marise B. Parent, Dpt. of Psychology, Gilmer Hall, University of Virginia, Charlottesville, VA 22903; e-mail: mbp4m@virginia.edu; phone (804) 982-4753; fax (804) 982-4785.

### Abstract

Previous findings from this laboratory indicate that the memory impairing effects of posttraining amygdala lesions are attenuated by increasing the number of training trials given prior to the induction of the lesion. The aim of the present experiment was to determine whether the degree of impairment is also influenced by the footshock intensity used during training. Rats were given one trial of inhibitory avoidance (IA) training with either no footshock or a footshock at one of three intensities. One week later, sham or neurotoxic amygdala lesions were induced. On a retention test performed 4 days after surgery, the performance all amygdala-lesioned rats given footshock training, including those given the lowest training footshock, was better than that of amygdala-lesioned rats given no training footshock. These findings of preserved retention of IA learning in rats given posttraining amygdala lesions do not support a general hypothesis that the amygdala is a locus of permanent changes underlying aversively motivated learning.

It is well established that the amygdala is involved in aversively-motivated learning and memory (Aggleton, 1992; Sarter & Markowitsch, 1985). There is, however, conflicting evidence concerning the long term participation of the amygdala in the changes underlying fear-motivated learning. On one hand, there is ample evidence suggesting that the amygdala may serve as a long term locus for the memory of fear. For example, lesions of the amygdala block the expression of several conditioned fear responses, including conditioned freezing, (Helmstetter, 1992; LeDoux, Cicchetti, Xagoraris, & Romanski, 1990; Phillips & LeDoux, 1992), shock sensitization of startle (Hitchcock, Sananes, & Davis, 1989; Sananes & Davis, 1992) and fear potentiated startle (Hitchcock & Davis, 1986; Kim & Davis, 1993; Sananes & Davis, 1992). On the other hand, other evidence suggests that the amygdala may only be temporarily involved in the changes induced by fear-motivated learning. Posttraining amygdala lesions impair inhibitory avoidance retention performance if the lesions are induced 2 days after training, but have no effects if the lesions are induced 10 days after training (Liang, McGaugh, Martinez, Jensen, Vasquez, & Messing, 1982). Similarly, reversible inactivation of the amygdala impairs inhibitory avoidance retention performance when retention is assessed 2 days after learning, but has no effect when retention is assessed 21 days later (Liang, 1991).

If the amygdala permanently mediates the changes underlying inhibitory avoidance learning, then amygdala lesions induced after training should impair retention performance, regardless of the degree of prior training. However, there is evidence that the memory-impairing effects of posttraining amygdala lesions are attenuated by increasing the amount of preoperative training (Goldstein, 1974; Parent, Avila, & McGaugh, submitted; Parent, Tomaz, & McGaugh, 1992; Parent, West, & McGaugh, in press; Thatcher & Kimble, 1966). For example, we have found that the retention performance deficit produced by amygdala lesions is attenuated by giving rats an increased number of escape training trials prior to the induction of the lesion (Parent, Avila, & McGaugh, submitted; Parent, Tomaz, & McGaugh, 1992; Parent, West, & McGaugh, in press). The present experiment further examined the

effect of degree of training on the memory-impairing effects of posttraining amygdala lesions. In this experiment, the rats received only one training trial and the intensity of the footshock was varied.

### Materials and Method

#### *Subjects*

One hundred and two male Sprague-Dawley rats (Charles River Labs., Wilmington, MA), weighing between 175 to 200g upon arrival, individually housed in a temperature- and light- controlled vivarium (22 °C 12:12-hr light dark cycle; lights on at 7:00 a.m.), were used. The rats were provided with food and water ad lib and acclimatized to laboratory conditions for one week prior to behavioral training.

#### *Behavioral apparatus and procedure*

The training apparatus was a trough-shaped alley (91 cm long, 20 cm wide at the top, 6.4 cm wide at the floor, 15 cm deep) that was separated into two compartments by a guillotine door that opened by retracting into the floor. The starting compartment (31 cm long) was illuminated by a tensor lamp (14W), whereas the shock compartment (60 cm) was dark. The apparatus was located in a sound-attenuated, non-illuminated room. Each rat was placed into the lighted compartment with its head facing away from the door. When the rat turned around and faced the door, the door was opened. Immediately after the rat entered the dark, shock compartment with all four paws, the door was closed and a footshock was delivered through stainless steel floor plates for 3 sec. The rat was then removed from the apparatus and returned to its home cage. Different groups of rats received the one-trial training using either a 0.45, 0.75, or 1.25 mA footshock. An additional group of rats received no footshock upon entering the dark compartment.

One week following the inhibitory avoidance training, sham or amygdala lesions were induced. Four days after surgery (11 days after training), inhibitory avoidance retention performance was assessed. Each rat was placed in the lighted, safe compartment with its head facing away from the door. Thirty seconds later, the door was opened and the latency to enter



the dark, shock compartment and the total time spent in the lighted, safe compartment were recorded for 600 sec.

### *Surgical procedure*

The rats received atropine sulfate (0.4 mg/kg ip) and were then anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg ip). The skull of the rat was fixed to a stereotaxic frame (Kopf Instruments, Tujunga, CA). Bilateral amygdala lesions were induced by injecting the neurotoxin *N*-Methyl-D-Aspartic acid (NMDA; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) through an injection needle that was lowered into the amygdala (anterior-posterior = -2.3 mm from bregma, medial-lateral =  $\pm$ 4.40 mm from midline, dorsal-ventral = -7.7 mm from dura, nose bar = -3.30 mm from interaural line; Paxinos & Watson, 1986). The NMDA was dissolved in phosphate-buffered saline (pH = 7.4; 0.119 g sodium phosphate monobasic hydrate and 0.029 g sodium phosphate dibasic in 100 ml 0.9% NaCl) and injected (10  $\mu$ g/ $\mu$ l, 0.8  $\mu$ l/4 min) through a needle (30 gauge, 17 mm) which was attached to a 10  $\mu$ l micro syringe (Hamilton Co., Reno, NV) via polyethylene tubing (PE-20) using an automated Sage syringe pump (Orion Research, Inc., Boston, MA). To minimize dorsal diffusion, the injection needle was kept in place for 3 min following the injection. The bilateral lesions were induced sequentially, the burr holes were sealed with bone wax, and the scalp incision was sealed with surgical silk. Sham animals received the same surgical treatment, with the exception that the injection needle was lowered to the level of the caudate-putamen dorsal to the amygdala (dorsal-ventral = -4.0 mm from dura) for 7 min on each side and no solution was infused.

### *Histology*

Following the completion of the behavioral tests, the rats were anesthetized with an overdose of sodium pentobarbital (150 mg/kg ip) and perfused intracardially with 0.9% saline followed by 10% phosphate-buffered formalin. The brains were removed and placed in a 20% sucrose-10% formalin solution, refrigerated at 5 °C for approximately one week, and then were sectioned at a thickness of 40  $\mu$ m with a freezing microtome and stained with thionin.

The sections were examined under a light microscope (Olympus BH-2) by an observer that was not aware of the behavioral results.

### *Statistics*

Retention latencies and time spent in the lighted, safe compartment were analyzed using the nonparametric Kruskal Wallis and Mann Whitney U statistics. An alpha level of 0.05 was used as a criterion of statistical significance.

## Results

### *Histology*

Examination of the brain sections revealed decreased neuronal density and the presence of gliosis in the lesioned areas. Also, vacuoles were present in the lesioned areas of several rats, suggesting that there may have been some minimal damage to fibers passing through the amygdala. Figure 1 shows a photomicrograph of a large NMDA-induced amygdala lesion observed in the present experiment (A) 20X and (B) 100X magnification. The arrows identify a border of the lesion for both magnifications. Large amygdala lesions were defined as those lesions that encompassed both the basolateral complex and the central nucleus bilaterally, whereas small lesions were defined as those lesions that encompassed only the central nucleus or basolateral complex, but not both bilaterally. Histological analyses indicated that 18 lesioned rats had large bilateral amygdala lesions, 7 lesioned rats had small bilateral amygdala lesions, and 32 rats had a large lesion in one hemisphere and a small lesion in the other. In some brains, damage was also observed in the corticomедial amygdala region ( $n = 46$ ), the adjoining cortex lateral to the amygdala ( $n = 21$ ), or the caudate dorsal to the amygdala ( $n = 20$ ) in at least one hemisphere. Statistical analysis of the retention performance of rats with bilaterally large or bilaterally small lesions indicated that there was no relationship between lesion size and the retention performance of lesioned rats given footshock during training (retention latency:  $F(5, 15) = 1.57$ ;  $p > .05$ ; time in lighted compartment:  $F(5, 15) = 1.14$ ;  $p > .05$ ).

---

Insert Figure 1 about here

---

### *Retention latencies*

The results of the retention test are shown in Figure 2. Overall, the groups differed significantly in retention latencies (Figure 2A;  $H(7,102) = 35.19$ ;  $p < .001$ ). The administration of a footshock during training significantly affected the retention performance of sham rats: Sham rats trained with the higher footshock intensities had longer retention latencies than did sham rats trained with the lower footshock intensities [ $H(3,45) = 13.88$ ;  $p < .01$ ]. The retention latencies of sham rats given a 1.25 mA footshock (SHAM-1.25) were significantly longer than those of sham rats given a 0.45 mA (SHAM-0.45) footshock or no footshock (SHAM-NO SHOCK;  $ps < .01$ ). Similarly, the retention latencies of sham rats given a 0.75 mA footshock during training (SHAM-0.75) were significantly longer than those of SHAM-NO SHOCK rats ( $p < .05$ ).

---

Insert Figure 2 about here

---

The administration of a footshock during training also significantly affected the retention latencies of amygdala-lesioned rats [ $H(3,57) = 11.51$ ;  $p < .01$ ]. The retention latencies of lesioned rats given a 0.45 mA (LESION-0.45), 0.75 mA (LESION-0.75), or 1.25 mA (LESION-1.25) training footshock were longer than those of lesioned rats given no training footshock (LESION-NO SHOCK;  $ps < .05$ ). Although there was a tendency for enhanced retention performance in amygdala-lesioned rats trained with the highest footshock, the retention latencies of LESION-0.45, LESION-0.75, and LESION-1.25 rats did not significantly differ ( $ps > .05$ ). In addition, the retention latencies of SHAM-NO SHOCK and LESION-NO SHOCK rats did not differ ( $p > 0.05$ ).

The amygdala lesions significantly impaired retention performance. The retention latencies of LESION-1.25 rats were significantly shorter than those of SHAM-1.25 rats ( $p < .01$ ). However, the amygdala lesions did not impair the retention performance of all groups: the retention latencies of SHAM-0.45 and LESION-0.45 rats and those of SHAM-0.75 and LESION-0.75 rats did not significantly differ ( $ps > .05$ ).

*Time in the lighted, safe compartment*

Overall, the groups differed significantly in the amount of time spent in the lighted, safe compartment (Figure 2B;  $H(7,102) = 35.19$ ;  $p < .001$ ). The administration of a footshock during training significantly increased the total amount of time sham rats spent in the lighted, safe compartment. Sham rats trained with the higher footshock intensities spent more time in the lighted compartment than did sham rats trained with the lower footshock intensities [ $H(3,45) = 12.19$ ;  $p < .01$ ]: SHAM-1.25 rats spent more time in the lighted, safe compartment than did SHAM-0.45 and SHAM-NO SHOCK rats ( $ps < .01$ ).

Overall, the administration of a footshock during training did not significantly affect the total amount of time amygdala-lesioned rats spent in the lighted, safe compartment [ $H(3,57) = 6.22$ ;  $p > .05$ ]. However, post hoc analyses with a Mann Whitney U test indicated that LESION-0.45 and LESION-1.25 rats spent more time in the lighted, safe compartment than did LESION-NO SHOCK rats ( $ps < .05$ ). Although there was a tendency for better retention in amygdala-lesioned rats trained with the highest footshock, LESION-0.45, LESION-0.75, and LESION-1.25 rats did not significantly differ in the total amount of time spent in the lighted, safe compartment ( $ps > .05$ ). SHAM-NO SHOCK and LESION-NO SHOCK rats also did not differ ( $p > 0.05$ ).

The amygdala lesions significantly impaired retention performance. LESION-1.25 rats spent less time in the lighted, safe compartment than did SHAM-1.25 rats ( $p < .01$ ). This impairment was not observed in all lesioned groups. SHAM-0.45 and LESION-0.45 rats did not differ in total amount of time spent in the lighted, safe compartment ( $p > .05$ ). Similarly, SHAM-0.75 and LESION-0.75 rats did not differ ( $p < .05$ ).

## Discussion

The present findings indicate that the administration of a training footshock influenced the inhibitory avoidance retention performance of both sham and amygdala-lesioned rats. In both groups, the retention performance of groups given footshock during training was significantly better than that of groups that were not given footshock. Such findings indicate that there was spared retention of the training experience in the lesioned groups. Consistent with previous reports (Bucherelli, Tassoni, & Bures, 1992; Liang, et al., 1982; Parent, Tomaz, & McGaugh, 1992), large amygdala lesions induced following training impaired retention performance. However, compared to rats given a low footshock, there was a tendency for increased retention performance in amygdala-lesioned rats given a higher training footshock, although the increase was not comparable to that observed in sham rats and was not statistically significant.

The finding that some retention is spared in amygdala-lesioned rats is congruent with numerous reports indicating that posttraining amygdala lesions attenuate, but do not completely block, the expression of memory (Brady, Schreiner, Geller, & Kling, 1954; Bucherelli, Tassoni, & Bures, 1992; Cahill & McGaugh, 1990; Parent, Tomaz, & McGaugh, 1992; Parent, West, & McGaugh, in press; Weiskrantz, 1956; Werka & Zeilinski, 1978). It remains possible that amygdala regions that were not affected by the lesions may have mediated the spared retention observed in lesioned rats. However, the finding that lesion size did not correlate with retention performance makes this possibility less likely. The present findings are also consistent with previous data indicating that the memory-impairing effects of posttraining amygdala lesions are influenced by the degree of preoperative training (Goldstein, 1974; Parent, Avila, & McGaugh, submitted; Parent, Tomaz, & McGaugh, 1992; Parent, West, & McGaugh, in press; Thatcher & Kimble, 1966). We have found that the degree of inhibitory avoidance retention impairment produced by posttraining amygdala lesions is influenced by the number of trials received during training (Parent, Avila, & McGaugh, submitted; Parent, Tomaz, & McGaugh, 1992; Parent, West, & McGaugh, in press). The

finding that increased footshock intensity did not completely eliminate the memory-impairing effects of amygdala lesions is in contrast to finding that increased footshock intensity during inhibitory avoidance training completely eliminates the memory impairing effects of posttraining reversible inactivation of the caudate-putamen (Perez-Ruiz & Prado-Alcala, 1989) or posttraining antagonism of the caudate-putamen cholinergic system (Giordano & Prado-Alcala, 1986). Such differences suggest that the amygdala and the caudate putamen have different roles in the retention of inhibitory avoidance learning.

In summary, the present findings indicated that memory of inhibitory avoidance training is partially preserved in rats that received amygdala lesions one week following training. All lesioned rats, including those that were trained with the lowest footshock intensity, had significantly better retention performance than lesioned rats that did not receive footshock. Such findings do not support a general hypothesis that the amygdala is a locus of permanent changes underlying aversively motivated learning. The present findings do not, however, address the hypothesis that the amygdala may mediate the changes underlying other types of less complex fear conditioning (Kim & Davis, 1993).

## References

- Aggleton, J. P. (1992). The Amygdala: Neurobiological Aspects of Emotion, Memory, and Mental Dysfunction. New York: Wiley-Liss.
- Brady, J.V., Schreiner, L., Geller, I., & Kling, A. (1954). Subcortical mechanisms in emotional behavior: The effect of rhinencephalic injury upon the acquisition and retention of a conditioned avoidance response in cats. Journal of Comparative and Physiological Psychology, 47, 179-186.
- Bucherelli, C., Tassoni, G., & Bures, J. (1992). Time-dependent disruption of passive avoidance by post-training intra-amygdala injection of tetrodotoxin in rats. Neuroscience Letters, 140, 231-234.
- Cahill, L., & McGaugh, J.L. (1990). Amygdaloid complex lesions differentially affect retention of tasks using appetitive and aversive reinforcement. Behavioral Neuroscience, 104(4), 532-543.
- Giordano, M. & Prado-Alcala, R.A. (1986). Retrograde amnesia induced by post-trial injection of atropine into the caudate-putamen. Pharmacology, Biochemistry, and Behavior, 24, 905-909.
- Goldstein, M.L. (1974). The effect of amygdectomy on long-term retention of an undertrained classically conditioned fear response. Bulletin of the Psychonomic Society, 4(6), 548-550.
- Helmstetter, F.J. (1992). The amygdala is essential for the expression of conditioned hypoalgesia. Behavioral Neuroscience, 106(3), 518-528.
- Hitchcock, J., & Davis, M. (1986). Lesions of the amygdala, but not of the cerebellum or red nucleus, block conditioned fear as measured with the potentiated startle paradigm. Behavioral Neuroscience, 100(1), 11-22.

- Hitchcock, J. M., Sananes, C. B., & Davis, M. (1989). Sensitization of the startle reflex by footshock: Blockade by lesions of the central nucleus of the amygdala or its efferent pathway to the brainstem. Behavioral Neuroscience, 103(3), 509-518.
- Kim, M., & Davis, M. (1993). Electrolytic lesions of the amygdala block acquisition and expression of fear potentiated startle even with extensive training, but do not prevent reacquisition. Behavioral Neuroscience, 107(4), 580-595.
- LeDoux, J. E., Cicchetti, P., Xagoraris, A., & Romanski, L. M. (1990). The lateral amygdaloid nucleus: Sensory interface of the amygdala in fear conditioning. The Journal of Neuroscience, 10(4), 1062-1069.
- Liang, K. C. (1991). Pretest intra-amygdala injection of lidocaine or glutamate antagonists impairs retention performance in an inhibitory avoidance task. Society for Neuroscience Abstracts, 17, 486.
- Liang, K. C., McGaugh, J. L., Martinez, J. L., Jr., Jensen, R. A., Vasquez, B. J., & Messing, R. B. (1982). Post-training amygdaloid lesions impair retention of an inhibitory avoidance response. Behavioural Brain Research, 4, 237-249.
- Parent, M.B., Avila, E., & McGaugh, J.L. (submitted). Increased training in a footshock-motivated task attenuates the memory-impairing effects of posttraining amygdala basolateral complex lesions.
- Parent, M. B., Tomaz, C., & McGaugh, J. L. (1992). Increased training in an aversively motivated task attenuates the memory-impairing effects of posttraining N-Methyl-D-Aspartate-induced amygdala lesions. Behavioral Neuroscience, 106(5), 791-799.
- Parent, M.B., West, M., & McGaugh, J.L. (in press). Retention of rats with amygdala lesions induced 30 days after footshock-motivated escape training reflects degree of original training. Behavioral Neuroscience
- Paxinos, G. & Watson, C. (1986). The rat brain in stereotaxic coordinates. San Diego, CA: Academic Press.

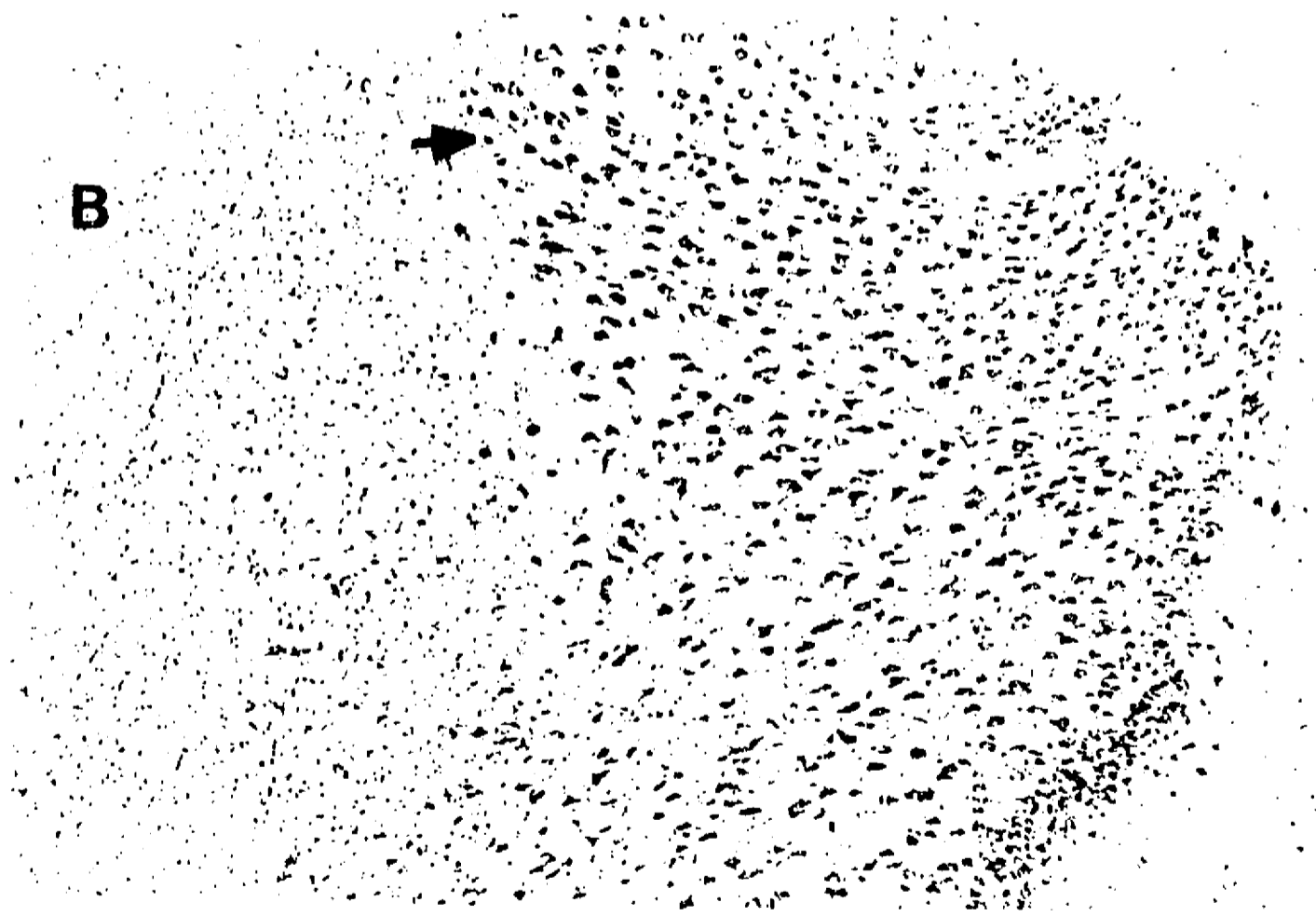
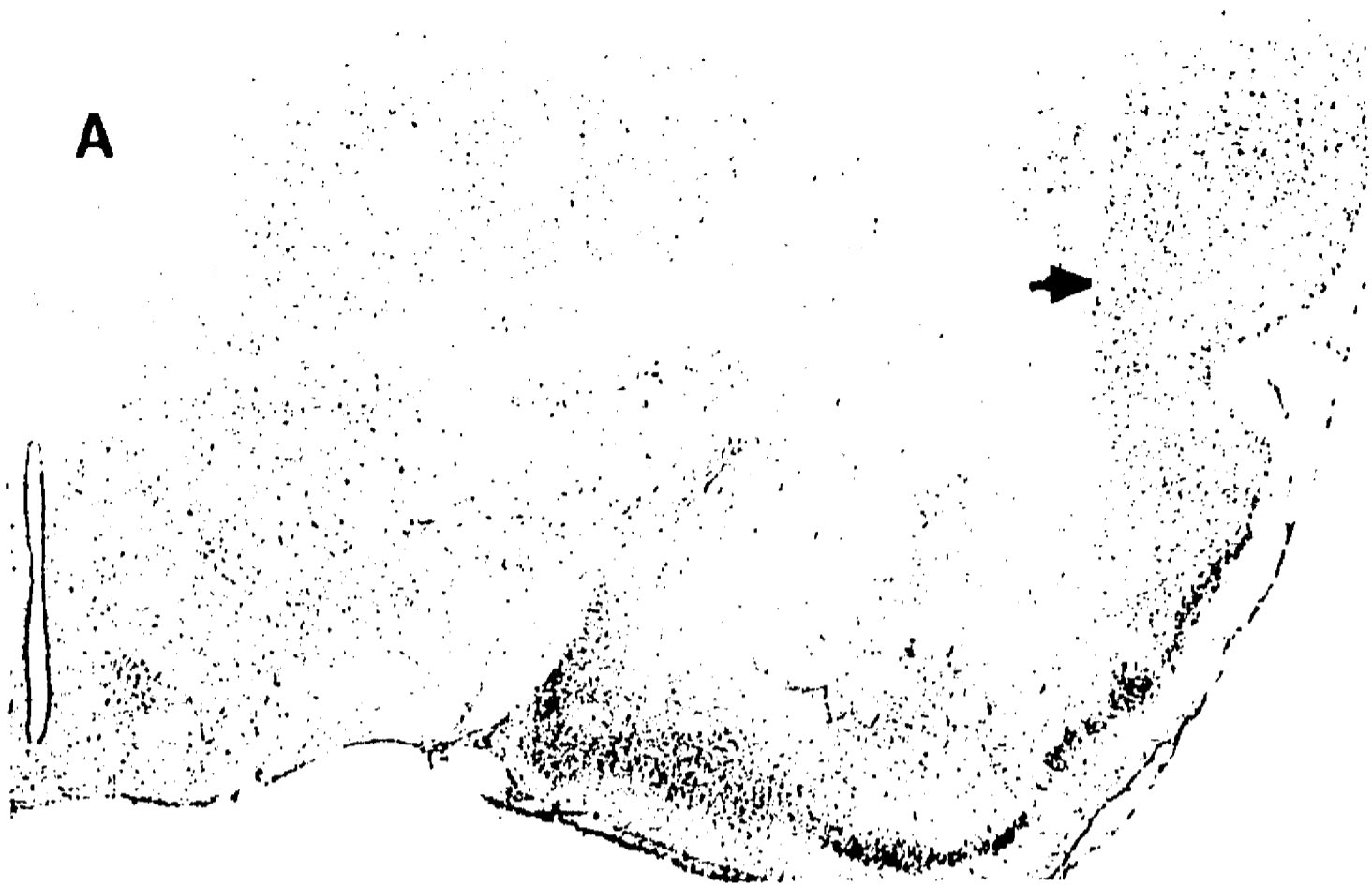


- Perez-Ruiz, C., & Prado-Alcala, R. A. (1989). Retrograde amnesia induced by lidocaine injection into the striatum: Protective effect of the negative reinforcer. Brain Research Bulletin, 22, 599-603.
- Phillips, R. G., & LeDoux, J. E. (1992). Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. Behavioral Neuroscience, 106(2), 274-285.
- Sananes, C. B., & Davis, M. (1992). N-Methyl-D-Aspartate lesions of the lateral and basolateral nuclei of the amygdala block fear-potentiated startle and shock sensitization of startle. Behavioral Neuroscience, 106(1), 72-80.
- Sarter, M., & Markowitsch, H. J. (1985). Involvement of the amygdala in learning and memory: A critical review, with emphasis on anatomical relations. Behavioral Neuroscience, 99(2), 342-380.
- Thatcher, R. W., & Kimble, D. P. (1966). Effect of amygdaloid lesions on retention of an avoidance response in overtrained and non-overtrained rats. Psychonomic Science, 6(1), 9-10.
- Weiskrantz, L. (1956). Behavioral changes associated with ablation of the amygdaloid complex in monkeys. Journal of Comparative and Physiological Psychology, 49, 381-391.
- Werka, T., & Zeilinski, K. (1978). Effects of lesions in the amygdaloid nucleus centralis on acquisition and retention of avoidance reflexes in cats. Acta Neurobiologiae Experimentalis, 38, 247-270.

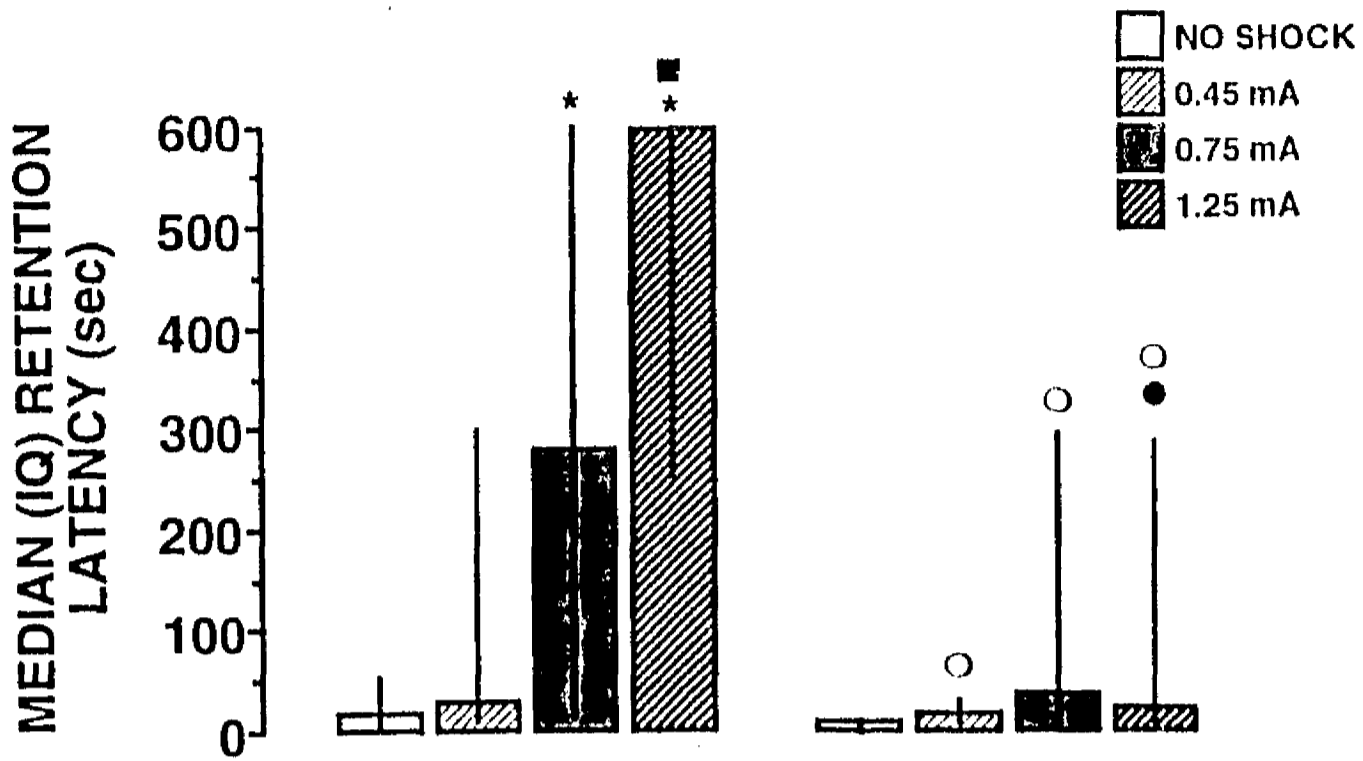
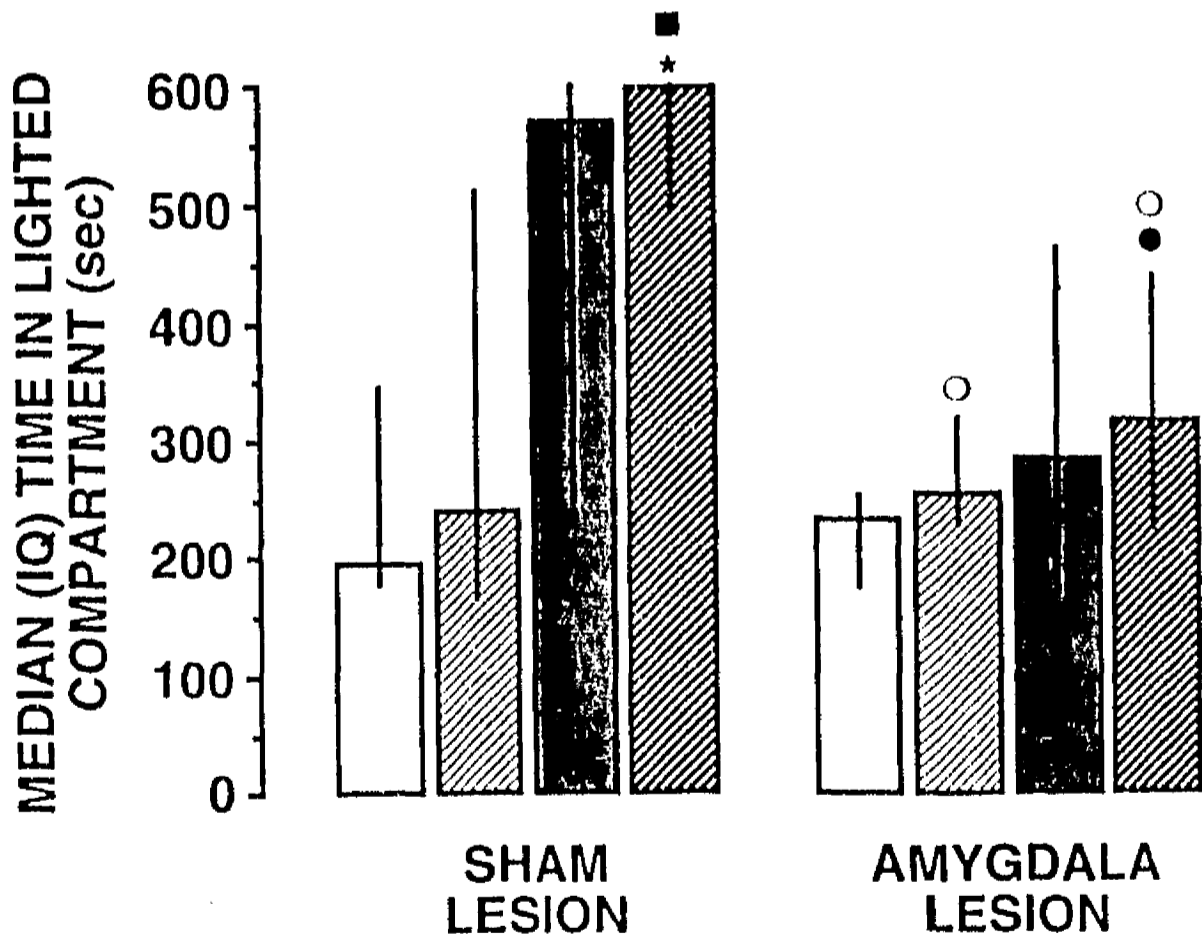
Figure Captions:

Figure 1. Photomicrograph of an *N*-methyl-D-aspartate-induced amygdala lesion observed in the present experiment: (A) 20X magnification and (B) 100X magnification. The arrows identify a border of the lesion for both magnifications.

Figure 2. Effects of amygdala lesions and footshock intensity on (A) median (interquartile range) latency to enter the dark, shock compartment and (B) median (interquartile range) time spent in the lighted, safe compartment (\*  $p < 0.05$  vs. sham-no shock; ■  $p < 0.05$  vs. sham-0.45 mA; ●  $p < 0.05$  vs. sham-1.25 mA; ○  $p < 0.05$  vs. amygdala lesion-no shock;  $n = 9$  - 16 per group).



FALLA DE ORIGEN

**A****B**

Journal of Experimental Psychology

## CAPITULO VII

### DISCUSION

Los objetivos planteados en este trabajo fueron: a) determinar si al igual que el sobrerreforzamiento, el entrenamiento con bajos niveles de reforzamiento tiene un efecto protector de la memoria, y b) corroborar el efecto protector del sobrerreforzamiento.

### EXPERIMENTO I

Los resultados obtenidos en el Experimento I, claramente cubrieron ambos objetivos y, además, permitieron aceptar las hipótesis de trabajo propuestas para este experimento, que fueron:

1. El bloqueo generalizado de la actividad colinérgica no producirá deterioros en la consolidación de la memoria, en animales entrenados en una tarea de prevención pasiva, utilizando intensidades bajas de estímulo nociceptivo.

Como se muestra en la Figura 2 del primer experimento, la validez de esta hipótesis de trabajo es obvia. Las intensidades más bajas (0.1 y 0.2 mA) utilizadas durante el entrenamiento, no fueron suficientes para inducir el aprendizaje de prevención pasiva, ya que al comparar la retención de los grupos entrenados con estas intensidades con la de los animales que no recibieron el choque eléctrico no se encontraron diferencias

estadísticamente significativas. Al estimular con pequeños incrementos de la intensidad del choque eléctrico (0.3, 0.4 y 0.5 mA), los grupos controles (no tratados) mostraron un incremento pequeño, pero significativo, en las latencias de retención, con lo cual se demostró que fueron capaces de aprender. Al incrementar aún más la intensidad (0.6, 0.7, 0.8, 0.9 y 1.0 mA) los grupos controles mostraron una retención perfecta. Estos resultados son congruentes con lo que era de esperarse, es decir, que conforme se incrementa la intensidad de un estímulo aversivo, mejor será la adquisición y retención del aprendizaje de prevención.

Los aspectos más interesantes de este experimento, que permiten aceptar la hipótesis de trabajo, son los referentes a los grupos experimentales, inyectados con el agente antimuscarínico. Cuando el entrenamiento se llevó a cabo con las intensidades bajas del reforzador, pero suficientes para que los animales aprendieran (de 0.3 a 0.6 mA), el bloqueo colinérgico generalizado no indujo deficiencia alguna en la retención de la tarea.

En virtud de que los tratamientos se aplicaron 5 minutos después del entrenamiento, tiempo durante el cual muy probablemente todavía está llevándose a cabo el proceso de consolidación de la memoria (Prado-Alcalá, Fernández-Samblancat y Solodkin-Herrera, 1985), podemos inferir que la ejecución de la tarea se debió a que en las condiciones experimentales de bajo nivel de reforzamiento, la actividad colinérgica no es necesaria para que dicho proceso de consolidación se lleve a cabo, y que

otros sistemas neuroquímicos son responsables del proceso de consolidación.

Esta es la primera vez que se reporta en la literatura científica el efecto protector de bajos niveles de reforzamiento negativo. El único antecedente que conocemos se refiere a la falta de efecto amnésico de la escopolamina en una tarea de presionar una palanca, mediada por un reforzador positivo (agua). En este experimento, se comparó la ejecución de ratas deficientes en la tarea, es decir ratas con niveles de repuesta muy bajos (y que por lo tanto recibían un número reducido de reforzadores), con la ejecución de ratas suficientemente entrenadas. Sorpresivamente, la aplicación intraestriatal de escopolamina produjo un cuadro amnésico solamente en las ratas normales (Valle, 1980).

2. El bloqueo generalizado de la actividad colinérgica no producirá deterioros en la consolidación de la memoria, en animales entrenados en una tarea de prevención pasiva, utilizando intensidades intermedias de estímulo nociceptivo.

En la misma Figura 2 puede verse que con intensidades intermedias de choque (0.7 y 0.8 mA), la inyección de la escopolamina produjo un estado amnésico considerable. Este resultado era esperado ya que ha sido descrito múltiples veces y, de hecho, es considerado como un modelo clásico de amnesia (referencias 1, 2, 5, 10, 15 del Experimento I).

3. El bloqueo generalizado de la actividad colinérgica no producirá deterioros en la consolidación de la memoria, en

animales entrenados en una tarea de prevención pasiva, utilizando altas intensidades de estímulo nociceptivo.

Ahora bien, al aplicar el estímulo aversivo de 0.9 y 1.0 mA, el efecto amnésico de la escopolamina desaparece. Este efecto, o más bien falta de efecto, nos permite aceptar la hipótesis propuesta. Este resultado corrobora los reportados por Durán-Arévalo et al. (1990) y por Cruz-Morales et al. (1992), dando así un fuerte apoyo a la idea de que en condiciones de sobrerreforzamiento la actividad colinérgica tampoco es necesaria para que se consolide la memoria.

En conjunto, estos resultados sugieren que dentro de un ciertos límites de intensidades bastante estrecho, receptores colinérgicos muscarínicos deben ser activados para que se produzca la consolidación de la memoria. Sin embargo, la acetilcolina no es esencial para el almacenamiento de la información derivada del aprendizaje mediado por bajo reforzamiento.

En el otro extremo de la escala de intensidades, una vez que se ha alcanzado un umbral (en el presente experimento, un incremento de 1/10 de miliamperio, es decir, de 0.8 a 0.9 mA), el bloqueo colinérgico también es inefectivo para producir amnesia ya que, probablemente, otros sistemas neuroquímicos asumen las funciones mnémicas que habían sido mediadas por la acetilcolina.

Estas proposiciones no implican que durante el sobrerreforzamiento o que en condiciones de bajo reforzamiento los sistemas colinérgicos no estén involucrados en la



consolidación de la memoria. Lo que se quiere decir es que varios sistemas neuroquímicos (incluyendo el colinérgico) pueden estar involucrados simultáneamente en este proceso, de tal manera que cuando uno de ellos no funciona normalmente, la actividad concurrente del resto es suficiente para el establecimiento de la memoria.

Una interpretación alternativa para los resultados obtenidos cuando se utilizó el sobrerreforzamiento es que el bloqueo de los receptores muscarínicos no interfirió con la consolidación de la memoria, debido a que el momento en que se aplicó la escopolamina no fue adecuado. En otras palabras, es posible que la aplicación de una intensidad relativamente alta de choque eléctrico haya inducido una aceleración en el proceso de consolidación, que pudo haberse llevado a cabo antes de la inyección del anticolinérgico o antes de que se hubiese alcanzado el nivel cerebral óptimo de dicha droga, es decir, dentro de los primeros 5 minutos después del entrenamiento.

Un estudio reciente (Quirarte et al., 1994; ver Apéndice) en el que se trató de discernir entre estas dos posibilidades, se encontró que la primera posibilidad es más factible, es decir, que en condiciones de sobrerreforzamiento el sistema colinérgico ya no es necesario para la consolidación de la memoria.

## EXPERIMENTO II

Los objetivos propuestos en esta tesis también fueron cubiertos en este experimento: a) determinar si, al igual que el sobrerreforzamiento, el entrenamiento con bajos niveles de

reforzamiento tiene un efecto protector de la memoria, y b) corroborar el efecto protector del sobrerreforzamiento.

De nuevo, las hipótesis de trabajo fueron:

1. La lesión irreversible de la amígdala, inducida por la aplicación de NMDA no producirá deterioros en la evocación de la memoria, en animales entrenados en una tarea de prevención pasiva, utilizando bajas intensidades de estímulo nociceptivo.

2. La lesión irreversible de la amígdala, inducida por la aplicación de NMDA producirá deterioros significativos en la evocación de la memoria, en animales entrenados en una tarea de prevención pasiva, utilizando intensidades intermedias de estímulo nociceptivo.

3. La lesión irreversible de la amígdala, inducida por la aplicación de NMDA no producirá deterioros en la evocación de la memoria, en animales entrenados en una tarea de prevención pasiva, utilizando altas intensidades de estímulo nociceptivo.

En contraste con lo encontrado en el Experimento I, en este caso las hipótesis 1 y 3 fueron rechazadas, ya que los niveles de reforzamiento tanto bajos como altos no impidieron que la lesión de la amígdala indujera una deficiencia significativa en la retención de la tarea. Sólomente la segunda hipótesis se cumplió, es decir, la lesión amigdalina también produjo una interferencia con la retención cuando los animales fueron entrenados con un nivel intermedio de reforzamiento.

Con respecto a la incapacidad del bajo nivel de reforzamiento para proteger a los animales en contra del efecto amnésico de las lesiones de la amígdala, no encontramos en la

literatura experimentos relacionados con este problema, de tal manera que no contamos con elementos teóricos que permitan explicar este resultado. Debemos tener en cuenta, sin embargo, que las lesiones producidas por el NMDA no necesariamente se restringen al área en la que se inyecta el neurotóxico. Este tipo de sustancia, además de producir la muerte de neuronas en la zona de aplicación, también produce una degeneración anterógrada de axones, con lo cual también se ve afectada en forma permanente la fisiología de las regiones con las que está conectada la estructura. Así pues, es factible que el deterioro en la ejecución se haya debido, no sólo a la interferencia con la actividad de la amígdala, sino también a un mal funcionamiento en regiones cerebrales a las que proyecta esta estructura (por ejemplo, sustancia innominata, núcleo basalis magnocelularis, núcleo acumbens, tubérculo olfatorio, hipotálamo, etc.). En otras palabras, el efecto deteriorante de la lesión se pudo deber a la combinación de lesiones de la amígdala y demás estructuras involucradas.

Con respecto a la deficiencia observada en las ratas lesionadas, que fueron entrenadas con un nivel intermedio del reforzador, en el Capítulo II se describe un buen número de experimentos que permitían esperar este resultado.

Por último, en contra de lo esperado, el entrenamiento con la intensidad más alta no produjo la protección en contra de la amnesia consecutiva a la lesión amigdalina. Este resultado puede ser interpretado cuando menos de tres maneras. La primera sería la misma que se ofreció con respecto a la primera hipótesis

(lesión local y en estructuras conectadas con la amígdala).

La segunda interpretación sería que el efecto protector del sobrerreforzamiento no se observó porque, precisamente, la amígdala es una estructura esencial para que la respuesta condicionada pueda ser ejecutada por los animales de experimentación, independientemente de las características de los reforzadores negativos. En otras palabras, se necesita de su participación para que se haga patente la retención de la tarea aprendida, a pesar de que durante el entrenamiento se hayan aplicado intensidades altas del estímulo aversivo (sobrerreforzamiento).

La tercera posibilidad que se plantea, es que en nuestra situación experimental no se haya alcanzado un nivel de reforzamiento realmente alto. Actualmente esta posibilidad se está analizando experimentalmente en nuestro laboratorio, ya que dados los antecedentes relevantes a este trabajo (Capítulo II), ésta parece ser la opción más probable.

#### REFERENCIAS

Cruz-Morales, S.E., Durán-Arévalo, M., Díaz del Guante, M.A., Quirarte, G. and Prado-Alcalá, R.A. A threshold for the protective effect of over-reinforced passive avoidance against scopolamine-induced amnesia, *Behavioral and Neural Biology*, 57:256-259, 1992.

Durán Arévalo, M., Cruz-Morales, S.E. and Prado-Alcalá, R.A. Is acetylcholine involved in memory consolidation of over-reinforced learning?, *Brain Research Bulletin*, 24:725-727, 1990.

Prado-Alcalá, R.A., Fernández-Samblancat, M. and Solodkin-Herrera, M. Injections of atropine into the caudate nucleus impair the acquisition and the maintenance of passive avoidance, *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 22:243-247, 1985.

Price, J.L., Russchen, F.T. and Amaral, D.G. The limbic region. En: *Handbook of Chemical Neuroanatomy*. A.Bjorklund, T. Hokfelt and L.W. Swanson (Eds.). Elsevier Science Publishers, 1987, pp. 279-388.

Quirarte, G.L., Cruz-Morales, S.E., Cepeda, A., García-Montañez, M., Roldan-Roldan, G. and Prado-Alcala, R.A. Effects of central muscarinic blockade on passive avoidance: anterograde amnesia, state dependency, or both?. *Behavioral and Neural Biology*, 62:15-20, 1994.

Valle Lascurain, P. Estudio sobre la participación del núcleo caudado en los procesos de aprendizaje. Tesis de Licenciatura. Universidad Anahuac. Escuela de Psicología, 1980.

**APENDICE**

## A Threshold for the Protective Effect of Over-Reinforced Passive Avoidance against Scopolamine-Induced Amnesia

SARA E. CRUZ-MORALES,\* MARTHA DURAN-AREVALO†, MIGUEL ANGEL DIAZ DEL GUANTE‡, GINA QUIRARTE‡, AND ROBERTO A. PRADO-ALCALA‡<sup>1</sup>

\*Behavioral Pharmacology, Enep-Iztacala, National University of Mexico; †Laboratory of Psychophysiology, School of Psychology, Anahuac University; and ‡Faculty of Medicine, Physiology Department, National University of Mexico, P.O. Box 70-250, Mexico, D.F. 04510, Mexico

Acetylcholine-receptor blockers produce amnesia of aversively motivated behaviors. However, when animals are submitted to relatively high intensities of footshock (over-reinforcement), anticholinergic treatment does not induce memory impairments. The aim of this work was to determine whether the anti-amnesic effect produced by increasing the magnitude of the negative reinforcer is gradually established or if a threshold should be reached to obtain such an effect. Wistar rats were trained in passive avoidance using 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9 or 3.0 mA; 5 min after training they were given one systemic injection of scopolamine (8 mg/kg). An amnesic state was produced in the groups that were trained with the lower intensities (2.5-2.7 mA); with the three higher intensities near-perfect retention was evident. These results suggest that acetylcholine is critically involved in memory consolidation, and that by increasing the magnitude of the negative reinforcer, a threshold is reached where cholinergic activity of the nervous system is not necessary for the development of the consolidation process. © 1992 Academic Press, Inc.

There is a solid body of evidence showing that intraperitoneal injections of anticholinergic drugs produce amnesia while facilitation of cholinergic activity improves memory processes (Bammer, 1982; Bartus, 1980; Elrod & Buccafusco, 1988; Glick & Zimmerberg, 1972; Mohs, Davis, & Levy, 1981; Moss

& Deutsch, 1975; Quatermain & Jung, 1989; Sitaram, Weingartner, & Gillin, 1978; Sprints, 1989). Equivalent effects are seen when alterations of cholinergic functions are induced in specific areas of the brain (Dumey, Derer, & Blozovski, 1988; Giordano & Prado-Alcalá, 1986; Prado-Alcalá, 1985; Solana-Figueroa & Prado-Alcalá, 1990; Tilson, Harry, McLamb, Peterson, Rodgers, Peditakis, & Ali, 1988). Other lines of evidence indicate that over-training of active avoidance, i.e., increased number of training trials or strength of training (Flood, Bennett, Orme, & Rosenzweig, 1975; Flood, Smith, Bennett, Alberti, Orme, & Jarvik, 1986) or over-reinforcement of passive avoidance, i.e., high intensities of footshock (Flood, Bennett, Orme, Rosenzweig, & Jarvik, 1978), protect against the amnesic effects produced by inhibition of cerebral protein synthesis.

Regarding the involvement of cholinergic activity in memory processes, it has been shown that intrastriatal and systemic administrations of muscarinic blockers, which consistently produce amnesia, are ineffective when animals are overtrained in positively motivated tasks or when they are over-reinforced in a passive avoidance situation (Giordano & Prado-Alcalá, 1986; Prado-Alcalá & Cobos-Zapataín, 1977; Prado-Alcalá, Kaufman, & Moscona, 1980; Durán-Arévalo, Cruz-Morales, & Prado-Alcalá, 1990).

In the latter studies, animals were given two to four times the number of training sessions needed to achieve asymptotic performance (Prado-Alcalá & Cobos-Zapataín, 1977; Prado-Alcalá et al., 1980). In the case of over-reinforcement, the subjects were exposed to footshock intensities which also were two

<sup>1</sup> Requests for reprints should be addressed to Dr. R. A. Prado-Alcalá, Faculty of Medicine, Physiology Department, National University of México, P.O. Box 70-250, México, D.F. 04510, México. We acknowledge the excellent technical assistance of Ernestina Tirado. This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Grant D111-903541) and by DGAPA-UNAM (Grant IN202791).

to four times higher than those sufficient to learn a passive avoidance task (Durán-Arévalo et al., 1990; Giordano & Prado-Alcalá, 1986). Thus, it could not be determined whether the protective effect of the enhanced learning experience against the amnesic effects of anticholinergics is a gradual process or whether it is established once a minimum amount of experience is reached, in an all-or-none fashion. The present experiment was designed to determine which of these alternatives is correct.

### METHODS

**Animals.** One hundred sixty male Wistar rats, weighing between 250 and 350 g were used. They were individually housed in a temperature-controlled environment and had free access to solid food and tap water in their home cages. They were kept in these conditions starting at least 5 days before the experiment was initiated.

**Apparatus.** Training and testing were carried out in a wooden box with two compartments of the same size (30 × 30 × 30 cm), separated by a guillotine door. The lid of each compartment and the guillotine door were made of orange-colored lucite. The floor of one of the compartments was a grid made of aluminum bars (7 mm in diameter), separated 1.5 cm center-to-center. The V-shaped lateral walls of the second compartment were stainless steel, and each was continuous with half the floor; there was a 1.5-cm slot separating each half-floor. Thus, when in this compartment, the rats were in contact with both walls, which could be electrified using 2 of the 10 output lines of a stimulator that delivered scrambled constant current (BRS/LVE, Model SGS-003). Illumination was provided by a 10-W light bulb located in the center of the lid of the gridded compartment. The conditioning box was located inside a dark, sound-deadening room, provided with background masking noise (BRS/LVE, Model AU-902).

**Training and testing.** During training each animal was put inside the gridded compartment of the conditioning box; 10 s later the door between the compartments was opened and the latency to enter the darker (electrifiable) compartment with all four paws was measured. Once in the second compartment the door was closed and a footshock was delivered through the stainless steel plates (footshock intensities will be specified below); after 5 s the door was reopened, thus allowing the animal to escape to the first compartment and to remain there for 30 s before being put back in its home cage. After es-

caping the footshock was turned off. Twenty-four hours later a test of retention was programmed exactly as the training session, except that the footshock was omitted. If a rat did not cross within 600 s to the compartment where the shock had been given, the session was ended and a score of 600 was assigned.

**Treatments.** Independent groups of rats were studied. These animals were trained with 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, or 3.0 mA. The intensities were equivalent to those used in previous work, where DC constant-current stimulators were used (Giordano & Prado-Alcalá, 1986; Pérez-Ruiz & Prado-Alcalá, 1989). For each intensity there were two groups of animals: untreated and injected with 8.0 mg/kg of scopolamine hydrobromide (Sigma). This relatively high dose of scopolamine was chosen because in previous experiments it was found that 2.0 and 4.0 mg/kg did not produce memory impairments, 6.0 mg/kg produced a 50% deficit in retention, while 8.0 and 12.0 mg/kg induced a profound amnesic state (Durán-Arévalo et al., 1990). Three additional groups were studied, which were trained with 2.5 mA, treated with 8.0 mg/kg of methylscopolamine (Sigma), with isotonic saline solution (NaCl), or with 4.0 mg/kg of scopolamine hydrobromide. Finally, there was a group which was trained with 2.8 mA and injected with 12.0 mg/kg of scopolamine. There were 10 rats in each of the groups. All drugs were dissolved in NaCl, and doses refer to the salts; injections were administered intraperitoneally, 5 min after training.

**Statistics.** The data derived from the retention tests were not distributed normally. Since the nature of the data did not allow the use of parametric statistics, the Kruskal-Wallis analysis of variance was computed for training, escape, and retention latencies among the groups. When appropriate, the Mann-Whitney *U* test was used to compare performances between the main control group (2.5 mA, injected with NaCl) against each of the rest of the groups (Siegel, 1956).

### RESULTS

No significant differences were found regarding training and escape latencies ( $H(15) = 19.42, p > .19$  and  $H(15) = 21.84, p > .10$ , respectively). In contrast, highly significant differences became evident when comparing retention scores ( $H(15) = 30.94, p < .009$ ).

The *U* tests showed that the group that had been trained with 2.5 mA and injected with NaCl only



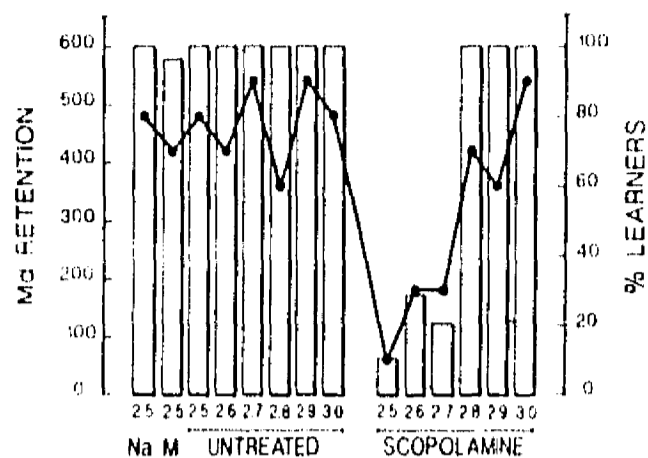


FIG. 1. Bars represent median retention scores (in seconds). Figures under each bar represent intensity of footshock used during training. Abbreviations are as follows: Na, group injected with isotonic saline solution; M, group injected with methylscopolamine (8 mg/kg). The experimental groups (scopolamine) were injected with scopolamine bromide (8 mg/kg). All treatments were administered 5 min after training. The ordinate on the right represents the percentage of good learners in each group (animals with retention scores greater than 500 s).

differed from the groups that had been trained with 2.5, 2.6, and 2.7 mA, which had been treated with 8.0 mg/kg of scopolamine ( $p$ 's < .005, .05, and .05, respectively). Figure 1 depicts these results. Not shown in Fig. 1 are the data from the animals that had been treated with 4.0 (retention median: 312.3) and 12.0 mg/kg (retention median: 532.8) of scopolamine and trained with 2.5 and 2.8 mA, respectively. Neither group differed significantly in their retention scores from the NaCl group.

## DISCUSSION

The amnesic effects of scopolamine (Bammer, 1982) and the anti-amnesic effect of over-reinforcement (Durán-Arévalo et al., 1990) were confirmed; thus, the present data further support the hypotheses that (a) acetylcholine is importantly involved in memory consolidation, and (b) after an increased learning experience acetylcholine is no longer involved in this process (Prado-Alcalá & Cobos-Zapain, 1977).

That the interference with consolidation of the task was due to blockade of central muscarinic receptors can be inferred from the fact that the injection of methylscopolamine, which does not readily cross the blood brain barrier, did not produce retention deficits. The lack of effect of the methylscopolamine (Glick & Zimmerberg, 1972) and of the lower dose of scopolamine had been earlier demonstrated in an experiment where a dose-dependent

amnesic effect was found (Durán-Arévalo et al., 1990); these findings suggest that a certain number of central muscarinic receptors must be blocked in order to impede the consolidation process.

Although there are reports showing that interference with the activity of a number of brain nuclei, such as the amygdala (Thatcher & Kimble, 1966), thalamus (Markowitsch, Kessler, & Streicher, 1985), striatum (Pérez-Ruiz & Prado-Alcalá, 1989), and substantia nigra (Cobos-Zapain & Prado-Alcalá, 1986), produces memory deficiencies and that such interference is innocuous when animals are overtrained or over-reinforced, no attempts were made to determine the minimal amount of experience that is needed to observe the protective effect.

The present study is the first to define the upper intensity limit at which cholinergic blockade is ineffective in producing an amnesic state of a passive avoidance task. As seen in Fig. 1, the over-reinforcing effect is established as a step-like function. This finding suggests that within a certain range of aversive intensities, acetylcholine receptors must be active so that consolidation may occur; once a threshold is reached (in the present case, an increment of one-tenth of a milliamper, i.e., from 2.7 to 2.8 mA), cholinergic blockade (induced by doses of scopolamine as high as 8.0 and 12.0 mg/kg) is ineffective in producing amnesia because, probably, other neurochemical systems take over the mnemonic functions that had been played by acetylcholine. This proposition does not imply that in conditions of over-reinforcement the cholinergic systems are not involved in memory consolidation. What is implied is that several systems may be simultaneously involved, in such a way that when one system is functionally hindered the concurrent activity of other systems is sufficient for the development of memory.

To put it in another way, we propose that in conditions of low levels of reinforcement or under a limited amount of training, only a few critical brain structures or neurochemical systems may be involved in consolidation. As the value of the reinforcer is increased, or the learning experience is enhanced, an increasing number of structures become engaged in this process.

Our main conclusion—that cholinergic activity is not important for consolidation after over-reinforcement—should be taken cautiously, however, as other explanations of our results can be put forward. For example, by increasing the intensity of the footshock memory consolidation was accelerated, i.e., it was established in less than the 5-min interval between training and treatment application. It could also be

postulated that some neuroendocrine factors released as a consequence of the application of the relatively strong stimulation protected against the amnesic effect of scopolamine.

Further research is needed to determine the way in which the cholinergic systems are switched off from consolidation functions, and to identify the neurochemical systems that support memory consolidation during overtraining and over-reinforcement.

## REFERENCES

- Bammer, G. (1982). Pharmacological investigations of neurotransmitter involvement in passive avoidance responding: A review and some new results. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *6*, 247-296.
- Bartus, R. T. (1980). Cholinergic drug effects on memory and cognition in animals. In L. W. Poon (Ed.), *Aging in the 1980s: Psychological issues* (pp. 163-180). Washington, DC: American Psychological Association.
- Cobos-Zapain, G. G., & Prado-Alcalá, R. A. (1986). Aplicación de picrotoxina en la substancia nigra reticulada: efectos sobre la memoria de largo plazo, en una tarea sobrentrenada. *XXIV Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas, México, 1986*.
- Dumey, V., Derer, P., & Blozovski, D. (1988). Enhancement of passive avoidance learning through small doses of intramygdaloid physostigmine in the young rat: Its relation to the development of acetylcholinesterase. *Developmental Psychobiology*, *21*, 553-565.
- Durán-Arévalo, M., Cruz-Morales, S. E., & Prado-Alcalá, R. A. (1990). Is acetylcholine involved in memory consolidation of over-reinforced learning? *Brain Research Bulletin*, *24*, 725-727.
- Elrod, K., & Buccafusco, J. J. (1988). An evaluation of the mechanism of scopolamine-induced impairment in two passive avoidance protocols. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, *29*, 15-21.
- Flood, J. F., Bennett, E. L., Orme, A. E., & Rosenzweig, M. R. (1975). Effects of protein synthesis inhibition on memory for active avoidance training. *Physiology and Behavior*, *14*, 177-184.
- Flood, J. F., Bennett, E. L., Orme, A. E., Rosenzweig, M. R., & Jarvik, M. E. (1978). Memory modification of anisonycin-induced amnesia by stimulants and depressants. *Science*, *199*, 324-326.
- Flood, J. F., Smith, G. E., Bennett, E. L., Alberti, M. H., Orme, A. E., & Jarvik, M. E. (1986). Neurochemical and behavioral effects of catecholamine and protein synthesis inhibitors in mice. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, *24*, 631-645.
- Giordano, M., & Prado-Alcalá, R. A. (1986). Retrograde amnesia induced by post-trial injection of atropine into the caudate-putamen. Protective effect of the negative reinforcer. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, *24*, 905-909.
- Glick, S. D., & Zimmerberg, B. (1972). Amnesic effects of scopolamine. *Behavioral Biology*, *7*, 245-254.
- Markowitsch, H. J., Kessler, J., & Streicher, M. (1985). Consequences of serial cortical, hippocampal, and thalamic lesions and of different lengths of overtraining on the acquisition and retention of learning tasks. *Behavioral Neuroscience*, *99*, 231-256.
- Mohs, R. C., Davis, K. L., & Levy, M. I. (1981). Partial reversal of anticholinergic amnesia by choline chloride. *Life Sciences*, *29*, 1317-1323.
- Moss, D. E., & Deutsch, J. A. (1975). Review of cholinergic mechanisms and memory. In P. W. Waser (Ed.), *Cholinergic mechanisms* (pp. 483-491). New York: Raven Press.
- Pérez-Ruiz, C., & Prado-Alcalá, R. A. (1989). Retrograde amnesia induced by lidocaine injection into the striatum: Protective effect of the negative reinforcer. *Brain Research Bulletin*, *22*, 599-603.
- Prado-Alcalá, R. A. (1985). Is cholinergic activity of the caudate nucleus involved in memory? *Life Sciences*, *37*, 2135-2142.
- Prado-Alcalá, R. A., & Cobos-Zapain, G. G. (1977). Learning deficits induced by cholinergic blockade of the caudate nucleus as a function of experience. *Brain Research*, *138*, 190-196.
- Prado-Alcalá, R. A., Kaufmann, P., & Moscona, R. (1980). Scopolamine and KCl injections into the caudate-putamen. Overtraining-induced protection against deficits of learning. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, *12*, 249-253.
- Quatrain, D., & Jung, H. (1989). Persistence of retrieval enhancement by amphetamine following scopolamine-induced amnesia. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, *33*, 51-54.
- Siegel, S. (1956). *Nonparametric statistics for the behavioral sciences*. Tokyo: McGraw-Hill Kogakusha, Ltd.
- Sitaram, N., Weingartner, H., & Gillin, J. C. (1978). Human serial learning: Enhancement with arecoline and choline and impairment with scopolamine. *Science*, *201*, 274-276.
- Solana-Figueroa, R., & Prado-Alcalá, R. A. (1990). Retrograde amnesia produced by intrastriatal atropine and its reversal by choline. *Life Sciences*, *46*, 679-686.
- Sprints, A. M. (1989). Mechanisms of memory disturbance during stages of memory acquisition and fixation. *Neuroscience and Behavioral Biology*, *19*, 387-392.
- Thatcher, R. W., & Kimble, D. P. (1966). Effect of amygdaloid lesions on retention of an avoidance response in overtrained and non-overtrained rats. *Psychonomic Science*, *6*, 9-10.
- Tilson, H. A., Harry, G. J., McLamb, R. L., Peterson, N. J., Rodgers, B. C., Pedaditakis, P., & Ali, S. F. (1988). Role of dentate gyrus cells in retention of a radial arm maze task and sensitivity of rats to cholinergic drugs. *Behavioral Neuroscience*, *102*, 835-842.

## EFFECTS OF GABA ANTAGONISTS ON INHIBITORY AVOIDANCE<sup>1</sup>

Sara E. Cruz-Morales<sup>§</sup>, Gina L. Quirarte<sup>§§</sup>, Miguel A. Diaz del Guante<sup>\*</sup>, and Roberto A. Prado-Alcalá.<sup>\*\*</sup>

<sup>§</sup>Behavioral Pharmacology, ENEP-Iztacala and <sup>\*\*</sup>Department of Physiology, Faculty of Medicine, National University of México, <sup>\*</sup>Center of Psychological Studies, Universidad Veracruzana, and <sup>§§</sup>Faculty of Psychology, University of Guadalajara, México

(Received in final form August 10, 1993)

### Summary

Experimental data indicate that GABA is involved in memory processes. However there are marked inconsistencies in the reported effects of interference with GABA synaptic activity on memory consolidation of aversively-motivated tasks. Both amnesia and improvement of performance have been reported after treatment with GABA antagonists. These contradictory effects could be explained by procedural differences in training. To test for this possibility rats were trained in passive avoidance using two levels of footshock and injected with a wide range of doses of picrotoxin and bicuculline. Picrotoxin did not modify the conditioned response while bicuculline induced amnesia only with the lower doses at both low and high footshock intensities. It was concluded that GABA is involved in memory consolidation, and that the conflicting results in the literature are indeed due, in part, to procedural differences, and also to the mode of action of these drugs.

Many neurotransmitters and neuromodulators have been implicated in memory processes (1, 2, 3). There are data which indicate that in Alzheimer's disease acetylcholine and other neurotransmitters such as GABA and the catecholamines participate in the establishment of memory (4). Recently, the involvement of GABA in memory has received experimental support, although there are striking inconsistencies regarding the effects of interference with GABAergic activity (5, 6, 7, 8).

The systemic post-training administration of picrotoxin and bicuculline induces facilitation in retention of an inhibitory avoidance task and of maze learning (5, 6, 7, 9).

-----

1. Correspondence and reprint requests to Roberto A. Prado-Alcalá, Department of Physiology, Faculty of Medicine, National University of México, P.O. Box 70-250, México, D.F. 04510, México.

However, equivalent doses of these GABA antagonists produced impairment in inhibitory avoidance and conditioned suppression (8). Some of these differences in outcomes could be explained by procedural differences. Therefore, it seemed important to test for this possibility by determining the effects of several doses of two GABA antagonists on retention of an inhibitory avoidance task, trained with low and high footshock intensities.

### Methods

**Animals.** Experimentally naive male Wistar rats, weighing between 250 and 350 g were used. The animals were individually housed and had food and tap water always available in their home cages. They were kept in these conditions for at least five days before the experiments were initiated. The subjects were randomly assigned to groups of ten each.

**Apparatus.** The subjects were trained and tested in a passive avoidance box divided into two compartments of the same size (30 x 30 x 30 cm), separated by a guillotine door. The door and the lids of the compartments were made of orange-colored acrylic. The safe compartment was illuminated by a 10-Watt light bulb situated in the center of the lid; the floor was a grid of aluminum bars of 0.5 cm in diameter separated 1.5 cm center-to-center. The other compartment had V-shaped lateral walls of stainless steel which were continuous with half the floor; there was a 1.5 cm slot separating each half-floor. These walls were connected with two of the ten output lines of a stimulator that delivered scrambled constant current (BRS/LVE, Model SGS-003). The conditioning box was located inside a dark, sound-deadening room, provided with background masking noise (BRS/LVE, Model AU-902).

**Training and testing.** On the day of training each animal was put inside the safe compartment; 10 sec later the door dividing the two compartments was opened and the latency to cross to the other compartment was measured (acquisition latency). When the animals crossed to this compartment the door was closed and a footshock was delivered; footshock intensities will be specified below. Five sec later the door was reopened allowing the animal to escape to the safe compartment and the stimulator was turned off; this latency was also measured (escape latency). After 30 sec in the safe compartment the animal was put back in its home cage. Twenty four hours later the same procedure was followed except that the footshock was not delivered; if the animal did not cross to the second compartment within 600 sec a score of 600 was assigned and the session ended.

**Treatments.** A single injection of bicuculline or picrotoxin (Sigma), dissolved in isotonic saline solution, or isotonic saline alone was administered intraperitoneally five minutes after the training session.

To evaluate the effects of the administration of picrotoxin, the non-specific GABA antagonist which blocks  $\text{Cl}^-$  ion channels, on consolidation of the inhibitory avoidance response, six experimental groups were injected with this drug (0.007, 0.015, 0.062, 0.5, 1.0, or 2.0 mg/kg); two groups were used as controls: an intact group, and a group injected with saline solution. These

groups were trained with 2.5 mA. There was also a group trained with 3.0 mA and treated with 0.015 mg/kg of picrotoxin.

To further test for the possible involvement of GABA on memory consolidation, the specific GABA<sub>A</sub> receptor blocker, bicuculline, was studied. The subjects were randomly assigned to eight groups. Five groups were injected with bicuculline (0.25, 1.0, 2.0, 4.0 or 6.0 mg/kg); as in Experiment 1, there were two control groups: an intact group, and a group injected with saline solution. These groups were trained with 2.5 mA. An additional group was trained with 3.0 mA and was injected with 1.0 mg/kg of bicuculline. These two intensities of footshock were selected, because in a recent experiment it was found that scopolamine induced an amnesic state when injected 5 min after training animals with low intensities (2.5, 2.6 and 2.7 mA), while no effect on retention was produced when the drug was injected to over-reinforced animals (i.e., trained with 2.8, 2.9 or 3.0 mA); the same conditioning box and stimulator described in the Methods section of the present work were used (19).

**Statistics.** Independent Kruskal-Wallis analysis of variance were computed for acquisition, escape and retention latencies. When appropriate, the Mann-Whitney U test was used to compare the main control group (injected with isotonic saline) against each of the rest of the groups.

### Results

After assessing the effects of picrotoxin, no significant differences were found among the groups regarding acquisition, escape, and retention latencies. Figure 1 depicts these results.

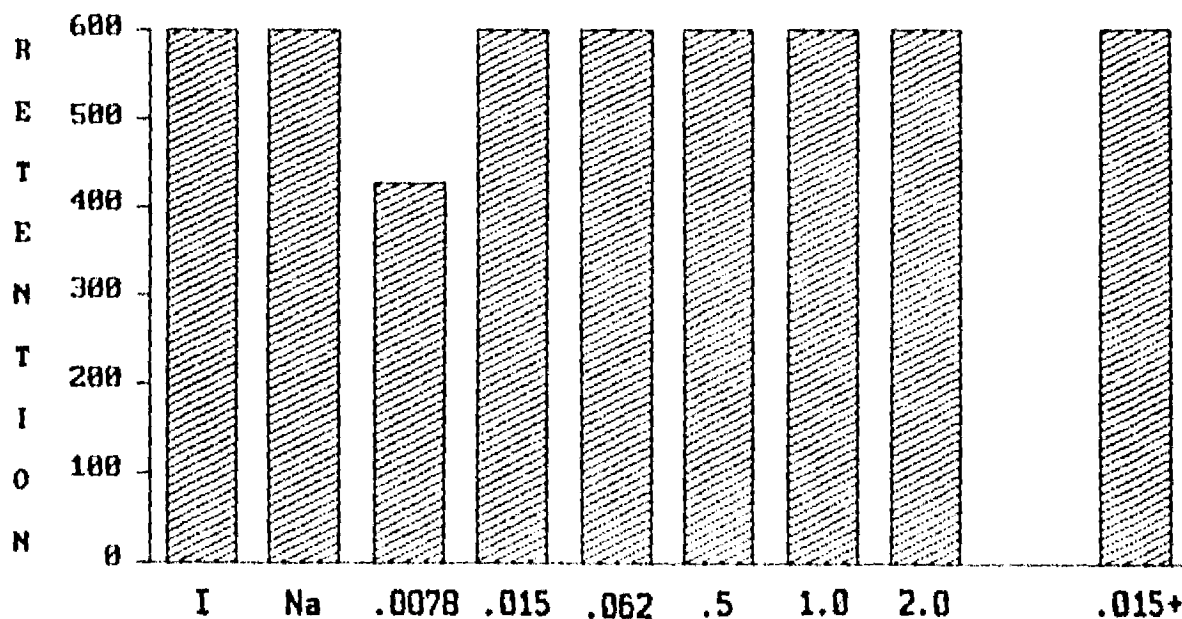


FIG. 1

Median retention scores of intact rats (I) and rats injected after training in passive avoidance with isotonic saline solution (Na) or picrotoxin; numerals under bars represent doses of picrotoxin. All groups were trained with 2.5 mA, except for group .015+ which was trained with 3.0 mA.

Regarding bicuculline injections, when the acquisition and escape latencies were compared, no differences were found among the groups. In contrast, there were significant differences among the groups when retention latencies were analyzed ( $H[7] = 17.19$ ,  $p < 0.02$ ). The U test showed that the groups that had been injected with 0.25, 1.0 and 2.0 mg/kg of bicuculline had significantly lower retention scores than the saline-treated group ( $p$ 's  $< 0.01$ , 0.05 and 0.02, respectively). Interestingly, the over-reinforced group (trained with 3.0 mA) that had been treated with 1.0 mg/kg of bicuculline also showed amnesia, as its retention score also differed from that of the saline group ( $p < 0.05$ ). None of the rest of the groups differ reliably from the saline group (Fig. 2).

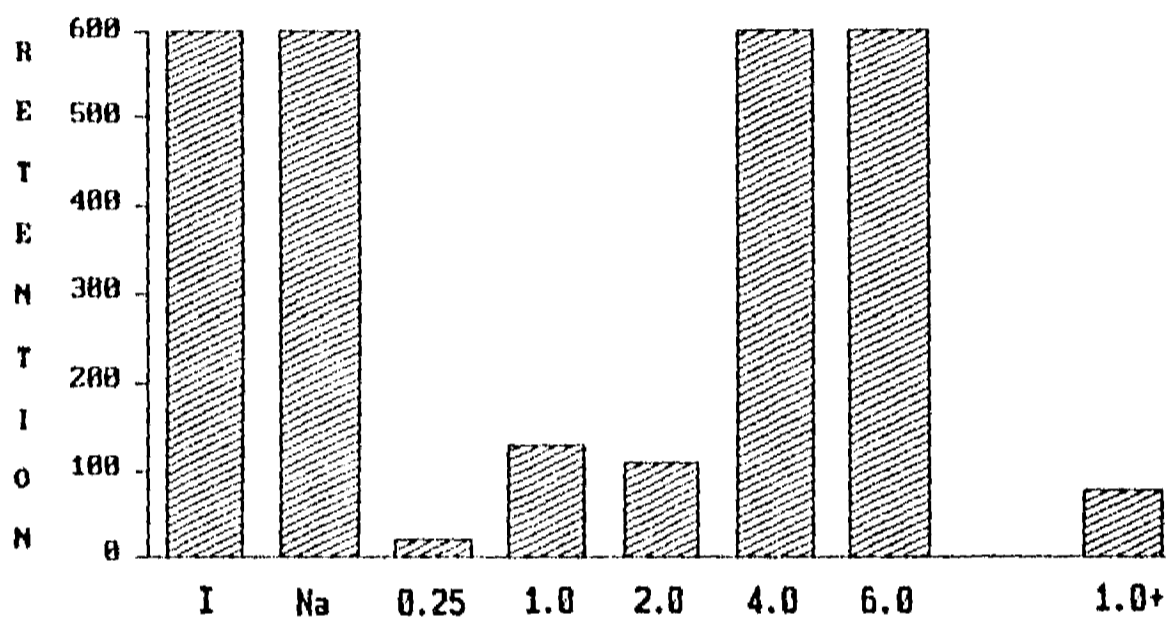


FIG. 2

Median retention scores of intact rats (I) and rats injected after training in passive avoidance with isotonic saline solution (Na) or bicuculline; numerals under bars represent doses of bicuculline. All groups were trained with 2.5 mA, except for group 1.0+ which was trained with 3.0 mA.

### Discussion

Picrotoxin did not produce any detectable effect on memory consolidation, despite the wide range of doses and the different footshock intensities used. This result does not coincide with previous reports where significant impairments were observed (8, 10). It is important to note that in the former study mice were used as experimental subjects.

In those reports describing a facilitation of performance (5, 6, 7, 9), where mice were also used as subjects, very low intensities were administered during training; in this situation, there was an improvement of retention. When relatively high intensities are used, as in the present experiment, facilitating effects may be masked because most animals have retention latencies that reach the ceiling imposed by the experimenters during retention (600 sec).

The administration of bicuculline produced amnesia at low doses. This outcome agrees with previous results where bicuculline administered systemically produced deficits in passive avoidance and conditioned suppression (8); however, the present data do not coincide with reports where this drug produced facilitation of a discrimination task and of inhibitory avoidance (6, 7, 9).

The different results obtained with two GABA antagonists could be explained taking into consideration several factors, such as mode of action on GABA (picrotoxin blocks the chloride ion channels of the GABA<sub>A</sub> receptor, while bicuculline acts by competition for the same receptor), locus of effect (facilitating effects of GABA antagonists have been observed in amygdala, while amnesia was found in striatum, substantia nigra and hippocampus), footshock intensity, animal species, and behavioral task (11, 12, 13, 14, 15, 16).

In the case of systemic administration of GABA antagonists (and of any drug), it would be expected that different cerebral regions become affected, depending on the pharmacokinetics of the drug and on the dose used, thus potentially inducing opposing behavioral effects. This possibility could explain the finding in Experiment 2 where low doses of bicuculline induced amnesia while high doses did not. The lack of consistency of the effects of GABA antagonists on mnemonic processes is similar to that seen in a wide variety of phenomena, such as feeding, drinking, sexual behavior, analgesia, and epilepsy (17).

In Experiment 2 it was found that bicuculline produced amnesia when a relatively high intensity of footshock was used for training. This result is at variance with results obtained with scopolamine, an anticholinergic drug (18, 19). In these experiments it was found that scopolamine induced amnesia in animals trained with low intensities of shock, while a lack of effect was observed when high footshock intensities were used. The results obtained in the present experiment suggest that, unlike cholinergic activity, GABAergic activity is necessary for consolidation of over-reinforced learning.

In sum, it is concluded that GABA is involved in memory consolidation, although its mode of action is far from clear, and that the contradictory results that have been reported regarding the effects of drugs that affect GABAergic activity can be explained, at least in part, by procedural differences and mode of action of the drugs used.

#### Acknowledgements

This work was supported by DGAPA (grant IN-202791) and by PADEP (grant MED-9210). The authors thank M. C. Miguel Angel Guevara for helpful comments.

#### References

1. G. BAMMER, *Neurosci. Behav. Rev.* 6 247-296 (1982).
2. J.L. MCGAUGH, *Ann. Rev. Neurosci.* 12 255-287 (1989).
3. R.A. PRADO-ALCALA, *Life Sci.* 37 2135-2142 (1985).

4. C.G. GOTTFRIES, *Psychopharmacology* 86 245-252 (1985).
5. C. CASTELLANO and J.L. MCGAUGH, *Behav. Neural Biol.* 51 165-170 (1989).
6. C. CASTELLANO and F. PAVONE, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 29 321-324 (1988).
7. N.L. DUBROVINA and R. Y. IL'YUCHENOK, *Neurosci. Behav. Physiol.* 188 274-279 (1988).
8. T.A. NABESHIMA, K. ITOH and T. KAMEYAMA, *Psychopharmacology* 94 69-73 (1988).
9. J.D. BRIONI and J.L. MCGAUGH, *Psychopharmacology* 96 505-510 (1988).
10. S. SAITO, S. WATABE, A. MATSUMOTO and K.A. ISHIKAWA, *Contemporary Psychology: Biological Processes and Theoretical Issues*, J.L. McGaugh (Ed.), 109-121, Elsevier Science Publishing Co., New York (1985).
11. J.D. BRIONI, A.H. NAGAHARA and J.L. MCGAUGH, *Brain Res.* 487 105-112 (1989).
12. M.E. CHAVEZ-MARTINEZ and R.A. PRADO-ALCALA, XXIX National Congress of Physiological Sciences, México (1986).
13. G.G. COBOS-ZAPIAIN and R.A. PRADO-ALCALA, XXIX National Congress of Physiological Sciences, México (1986).
14. G. GRECKSCH and H. MATTHIES, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 14 613-616 (1981).
15. H-J. KIM and A. ROUTTENBERG, *Brain Res.* 113 620-625 (1975).
16. R. SALADO-CASTILLO and R.A. PRADO-ALCALA, *Soc. Neurosci. Abstr.* 13 657 (1987).
17. R.G. PAREDES and A. AGMO, *Neurosci. Behav. Rev.* 16 145-170 (1992).
18. M. DURAN-AREVALO, S.E. CRUZ-MORALES and R.A. PRADO-ALCALA, *Brain Res. Bull.* 24 725-727 (1990).
19. S.E. CRUZ-MORALES, M. DURAN-AREVALO, M.A. DIAZ DEL GUANTE, G. QUIRARTE and R.A. PRADO-ALCALA, *Behav. Neural Biol.* 57 256-259 (1992).



# Intrastriatal Injection of Choline Accelerates the Acquisition of Positively Rewarded Behaviors

MIGUEL A. DIAZ DEL GUANTE,\* CESAR CARBONELL-HERNANDEZ,\* GINA QUIRARTE,†  
SARA E. CRUZ-MORALES,‡ SELVA RIVAS-ARANCIBIAS  
AND ROBERTO A. PRADO-ALCALÁ§<sup>1</sup>

\*Laboratorio de Psicofisiología, Centro de Estudios Psicológicos, Universidad Veracruzana, Jalapa, Veracruz, México †Facultad de Psicología, Universidad de Guadalajara, Jalisco, México ‡ENEP-Iztacala, and §Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-250, México, D.F. 04510, México

Received 23 March 1992; Accepted 6 September 1992

DIAZ DEL GUANTE, M. A., C. CARBONELL-HERNANDEZ, G. QUIRARTE, S. E. CRUZ-MORALES, S. RIVAS-ARANCIBIA AND R. A. PRADO-ALCALÁ. *Intrastriatal injection of choline accelerates the acquisition of positively rewarded behaviors.* BRAIN RES BULL 30(5/6) 671-675, 1993. --The prediction was made that by increasing the synthesis of striatal acetylcholine, through local injection of its precursor choline, the acquisition of a lever-pressing response in two different autoshaping situations would be accelerated. In the first experiment, choline was injected into the striatum or parietal cortex of rats immediately after dipper training; 24 h later and during 5 consecutive days the animals were submitted to an autoshaping procedure of the operant kind. In the second experiment, choline was administered to the same regions shortly after each of three classical-operant autoshaping sessions; during the next two sessions, autoshaping contingencies of the operant kind were in effect. In both experiments choline injection into the striatum induced a marked facilitation of acquisition of the conditioned responses, although cortical injection of choline produced a milder improvement only in the first experiment. These results indicate that striatal cholinergic activity is, indeed, involved in the early phases of positively reinforced learning.

Striatum    Caudate Nucleus    Acetylcholine    Choline    Autoshaping    Learning    Conditioning

A number of experimental findings strongly indicates that striatal acetylcholine (ACh) is critically involved in memory consolidation and retrieval of instrumental conditioned behaviors (1,3). The main experimental approach in these studies has been the assessment of the effects of local injection of ACh-receptor blockers or of neurotoxins that produce permanent damage to cholinergic interneurons on learned performance (8,12,16,19). There are only a few published reports where more direct tests about the involvement of striatal ACh in memory have been carried out. In these cases, it was demonstrated that there is an increased metabolism of striatal ACh shortly after training of passive avoidance (11); it was also shown that injections of an ACh precursor (choline) induced significant improvements in retention of active (14) and passive (20) avoidance, as well as in positively rewarded lever pressing (15); in the latter case, direct application of ACh itself also improved retention (15). When sustained stimulation of striatal ACh receptors is induced by carbachol, however, there is a significant deficit in avoidance behaviors (5,21). In all these experiments the treatments were administered once acquisition was underway or had been well established.

Implicit in the hypothesis of involvement of striatal ACh in memory is the assumption that striatal ACh also participates in the initial phases of acquisition of conditioned behaviors. There is an even greater scarcity of reports dealing with this function. This fact may be accounted for by the problems surrounding neurobiological analysis of learning processes in instrumental behaviors controlled by positive reinforcers, such as lever pressing. Commonly, this behavioral class is shaped by the experimenter by the method of successive approximations until a more or less sustained rate of responding is achieved. Thus, the acquisition of the conditioned response depends on the learning capabilities of the animal and on the ability of the experimenter to shape the animal's behavior. The latter variable is a major confounding factor in studies of acquisition of conditioned responses.

To our knowledge, there is only one study where the involvement of striatal cholinergic activity on the acquisition of positively motivated learning, where there was not a direct intervention of the experimenter, was explored. In this experiment (2) scopolamine was injected into the striatum right after, or 24 h after a single session of dipper training. Twenty-four hours

<sup>1</sup> To whom requests for reprints should be addressed.

after dipper training, and during 4 consecutive days, the animals were submitted to operant autoshaping. This treatment produced a significant retardation in acquisition of lever pressing. If this effect was due to blockade of ACh receptors, it would then be expected that by increasing the availability of ACh through the local injection of choline (4,22,23), there would be an improvement in the acquisition of this type of behavior.

In the two experiments reported here, it was predicted that injections of choline into the striatum would significantly facilitate the acquisition of a lever-pressing response reinforced with water: the autoshaping paradigms used allowed rats to learn at their own pace.

#### GENERAL METHOD

##### *Animals*

Experimentally naive male rats of the Wistar strain, weighing between 250 and 350 g, were used. They were individually housed and had free access to solid food and tap water in their home cages. Each animal was randomly assigned to one of three conditions: a) unimplanted, b) with cannulae bilaterally implanted in the anterodorsal striatum, or c) with bilateral cannulae implanted in the parietal cortex. The cannulae for intracranial injections were fixed to the anesthetized (Nembutal, 40 mg/kg) animals as described elsewhere (17). The implanted rats were allowed 7 days to recover from the surgical procedures before training began. There were 10 rats in each of the groups to be studied, but some animals were discarded because of apparatus failure, misplacing or dislodging of cannulae, or death. Final sample sizes are given below.

##### *Apparatus*

A modified Skinner box (BRS/LVE, model 143-24) was used; it was equipped with two 8 watt light bulbs, one placed 2 cm above a lever that was located on the left-hand side of the intelligence panel, 5 cm from the grid floor, and the other in the ceiling of a 4 × 4 × 4 cm niche with a dipper that could dispense 0.05 ml of tap water; the niche was located in the right-hand side of the panel, 1.5 cm above the floor. The animals had to exert a force of 25 × g on the lever to activate the dipper mechanism. Environmental noise was masked by an audio generator (BRS/LVE, model AU-902), and by placing the conditioning box inside a sound-attenuating cubicle. Control of light stimuli, delivery of water, and counting of pressing rates were accomplished with electromechanical equipment located in an adjacent room.

##### *Treatments*

Each of the rats with cannulae implantation was injected once through each cannula. Two substances were used: isotonic saline solution (3  $\mu$ l), or choline chloride (Sigma) dissolved in isotonic saline (9  $\mu$ g/3  $\mu$ l; this dose refers to the salt). This dose of choline was chosen because it was shown earlier that injections of between 6 and 15  $\mu$ g of choline into the striatum produce significant improvements in retention of lever pressing (15), and of passive (20) and active (14) avoidance. The solutions were delivered at a rate of 1  $\mu$ l/20 s through a 27 gauge needle connected to a Hamilton microliter syringe mounted on a slow infusion pump (Sage, model 355). After injecting, the needles were left inside the cannulae for an additional min. During this procedure the animals were not restrained by the experimenter and could move freely in their home cages, thus avoiding stress reactions that could interact with the effects of the treatments.

##### *Statistics*

Behavioral data were analysed using a split-plot two-factor analysis of variance design, where treatments and sessions were the main factors. This analysis was followed by planned comparisons using Duncan's range test (9).

##### *Histology*

Upon completion of the experiments, all implanted rats were anesthetized and perfused, intracardially, with isotonic saline followed by 10% formaldehyde; their brains were removed and kept in this solution for at least 1 week before coronal sections (50  $\mu$ m thick) were made and stained (Nissl method) to determine the location of cannulae tips.

#### EXPERIMENT 1

One of the main factors that contributes to learning in a standard autoshaping procedure (2) is the classical association of conditioned-unconditioned stimuli (light-water) during dipper training. It was of interest, therefore, to determine whether cholinergic stimulation of the striatum could strengthen this association, which would be reflected upon subsequent acquisition rate of autoshaping.

##### *Procedure*

All animals were deprived of water for about 23 h before each session, and had free access to tap water in their home cages during 30 min after each session. This experiment comprised seven sessions. During the first, each rat was given 200 trials of dipper training; each trial was initiated by turning on the niche light for 4 s, which was followed by the activation of the dipper mechanism, thus making tap water available for 3 s. There was a fixed intertrial interval (ITI) of 30 s during which all lights were turned off. By the 40th trial, all animals had learned to obtain water by poking their heads into the niche each time the light was turned on.

Twenty-four hours later, and during 6 consecutive days, all animals were submitted to an autoshaping procedure of the operant kind. At the beginning of each trial the light above the lever was turned on for 30 s; if the animals pressed the lever within these 30 s, the light was turned off and the niche light was turned on for 4 s, which was followed by the presentation of the liquid reinforcer for 3 s. After each reinforcement there was an ITI of 30 s. If the animals did not press the lever during the initial 30-s period, the light above the lever was turned off and a 30 s ITI ensued. This sequence was repeated until 60 trials had been completed.

Six groups of rats were studied: injected with choline into the striatum ( $n = 10$ ) or into the cortex ( $n = 9$ ), injected with isotonic saline into the striatum ( $n = 10$ ) or into the cortex ( $n = 9$ ), and two groups of unimplanted animals, one of which was trained as the implanted groups ( $n = 9$ ) while the other one never received water during training, but was exposed to all other stimuli ( $n = 10$ ). Treatments were administered 30 s after dipper training.

##### *Results*

The histological analysis revealed that, as shown in Fig. 1, all cannulae tips of the striatal groups had been lodged in the anterodorsal aspect of the striatum, rostral to the last trace of the anterior commissure. The tips of the cortical cannulae were located in the parietal cortex, within the anteroposterior limits of the cannulae placements of the striatal groups. The same was true for the operated animals of Experiment 2.

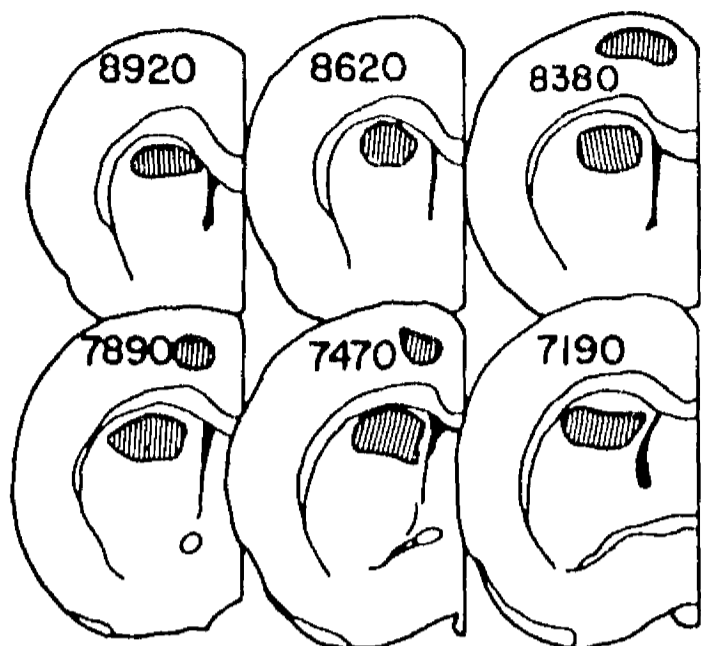


FIG. 1. Diagrammatic representation of histology sections, redrawn from Köning and Klippel (10). The stippled areas represent the range of cannulae tip locations of the anterior striatal and cortical groups of Experiments 1 and 2. Only cannulae placements of the right hemisphere are represented.

Figure 2 shows the number of lever presses across the auto-shaping sessions. The analysis of variance showed that there were significant treatments,  $F(5, 51) = 6.75, p < 0.001$ , sessions,  $F(5, 255) = 7.48, p < 0.001$ , and interaction,  $F(25, 255) = 5.98, p < 0.005$ , effects. Duncan's range test revealed that during each of the six auto-shaping sessions, the cortical group injected with choline had a reliably higher performance than any of the control groups (unimplanted, cortical, and striatal groups injected with saline, and nonrewarded). The striatal group injected choline had an even higher performance than any of the other groups in each of the sessions (in all the above cases,  $p$  values ranged between 0.05 and 0.001). There were no significant differences among the control groups on any of the sessions.

#### EXPERIMENT 2

The results of Experiment 1 indicated that cortical and striatal cholinergic activity plays an important role in learning the early noncontingent CS-UCS associations. Experiment 2 was designed to explore the possibility that cholinergic activation of the striatum also promotes learning of the reinforcing consequences derived from the actual lever-pressing response. To this end, we implemented a different procedure that ensured the acquisition of the lever-press response in intact animals, as determined in a pilot study.

#### Procedure

As in Experiment 1, animals were deprived of water for about 23 h before each session, and had free access to tap water in their home cages during 30 min after each session. The experimental protocol comprised five sessions, with an interval of about 24 h between sessions; no dipper training was given. During the three early sessions each rat was given 60 trials of classical operant auto-shaping. Each trial was initiated by turning on the

light above the lever for 30 s; if the animals pressed the lever within these 30 s this light was turned off and the dipper mechanism was activated, allowing the animals to obtain the liquid reinforcer (operant trial). If the animals did not press the lever during the initial 30-s period, the light above the lever was turned off, the light of the niche was turned on, and the dipper mechanism was activated to provide the water (classical trial). There was an ITI of 30 s.

During the following two sessions (60 trials per session) all animals were put under the control of an auto-shaping procedure of the operant kind, whose trials were identical to those of Experiment 1. After each reinforced or nonreinforced trial there was a fixed ITI of 30 s.

As in Experiment 1, each experimentally naive rat was randomly assigned to one of six groups, injected with choline into the striatum ( $n = 10$ ) or into the cortex ( $n = 9$ ), injected with isotonic saline into the striatum ( $n = 9$ ) or into the cortex ( $n = 9$ ), and two groups of unimplanted animals, one of which was trained as the implanted groups ( $n = 9$ ), although the other one was never given water during training ( $n = 10$ ). Treatments (bilateral microinjections of 9  $\mu$ g of choline dissolved in 3  $\mu$ l of isotonic saline, or 3  $\mu$ l of isotonic saline alone) were administered 30 s after each of the first three sessions.

#### Results

The analysis of variance indicated that there were significant treatments,  $F(5, 51) = 14.11, p < 0.001$ , sessions,  $F(4, 204) = 50.38, p < 0.001$ , and treatments  $\times$  sessions,  $F(20, 204) = 6.56, p < 0.001$ , effects. Pair-wise comparisons among groups (Duncan's range test) showed that the choline-treated striatal group had higher pressing rates than each of the other groups during the third session where classical and operant contingencies were in effect, as well as during the fourth and fifth sessions during which only operant contingencies were present ( $p$ 's  $< 0.01$  in every case). There were no significant differences among the rest of the groups, except during the fifth session where the nonreinforced group showed significantly lower rates of pressing than

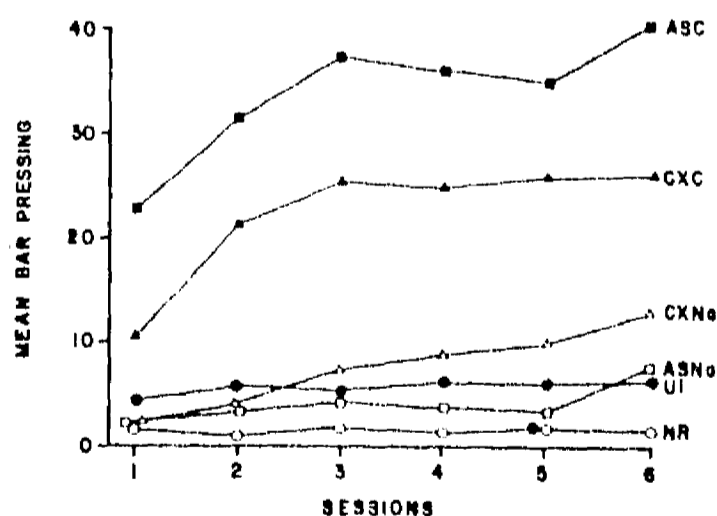


FIG. 2. The ordinate represents the average of reinforced lever pressings displayed by the groups of rats that were injected with choline into the anterior striatum (ASC) or into the parietal cortex (CXC), by the groups injected with isotonic saline into the anterior striatum (ASNa) or parietal cortex (CXNa), and by the unimplanted (UI) and unimplanted-non-reinforced (NR) groups. Treatments were administered 30 s after the dipper-training session (24 h before the first auto-shaping session).

FALLA DE ORIGEN

any of the other groups ( $p < 0.001$  for each comparison). Figure 3 depicts these results.

#### GENERAL DISCUSSION

In 1968 Brown and Jenkins (3) reported an autoshaping procedure that represented an important technical advance over the method of successive approximations used in experiments germane to acquisition processes of multistrial learning tasks. The conventional shaping method is as inexact as artful, because potential interference with nonmnemonic variables cannot be ruled out. We think that the autoshaping procedures reported here, especially that of the classical operant kind, may raise relevant theoretical issues that go to the heart of the neurobiological analysis of memory; to our knowledge, this classical operant procedure had not been reported in the literature.

The interpretation of the results of the two experiments reported here rests on the assumption that choline injections induced an increased synthesis and release of ACh in neurons of the injected regions. Several lines of evidence allow for this assumption. First, choline can be taken up by ACh neurons to accelerate the synthesis of ACh (4,22); second, the rate of synthesis of ACh, induced by intravenous injection of choline, is at least three times greater in the striatum than in the cortex, and becomes evident in less than two min (7); third, the concentration of free choline *in vivo* is below that necessary for the maximal rate of ACh synthesis (6); fourth, newly taken up choline is preferentially used for the synthesis of a pool of ACh that is more readily released than preformed ACh stored in cholinergic neurons (6,11,18).

Behaviorally, the final outcome of both experiments was very similar, regarding performance of the striatal group treated with choline. The improved acquisition of the lever-pressing task indicates that it was due to facilitation of recent memory processes, i.e., that there was a facilitation of consolidation of the classical CS-UCS association (Experiment 1) and of the information derived from the actual contingencies that induced the increased pressing rates (Experiment 2).

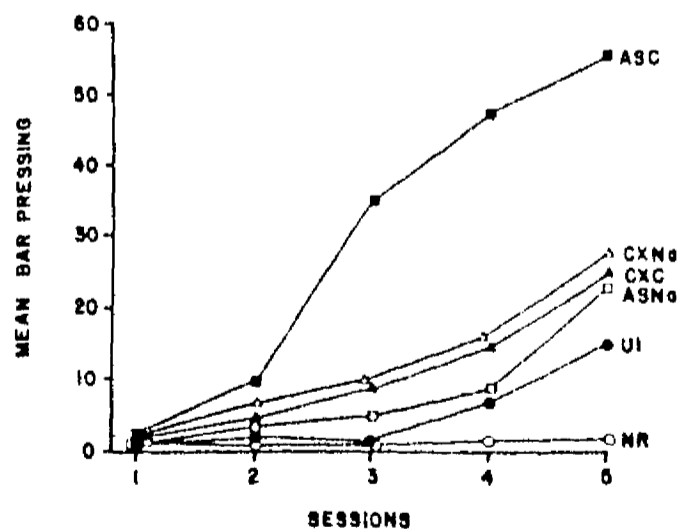


FIG. 3. The ordinate represents the average of reinforced lever-pressings displayed by the groups of rats that were injected with choline or isotonic saline into the anterior striatum or into the parietal cortex, and by the unimplanted and unimplanted-nonreinforced groups. Abbreviations are the same as in Fig. 2. Treatments were administered 30 s after each of the first three autoshaping sessions.

These results indicate that striatal cholinergic activity is involved in consolidation of classical conditioning. They also indicate that parietal cortical cholinergic activity is also involved, although to a lesser extent, in the establishment of the classical CS-UCS association. These inferences are based on the findings in Experiment 1, where the control groups were unable to show any signs of learning of the task as they did not differ in their performances from the nonreinforced rats; in marked contrast, the cortical animals that had been injected with choline showed a good level of acquisition, because performed significantly better than the controls. In turn, the striatal group also injected with choline shortly after the single dipper-training session had an ever better mastery of the task than the rest of the groups.

The fact that the only injection of choline was administered after the dipper-training session, long before autoshaping was in effect, rules out any nonassociative factors in explaining these results. It should be noted that, in contrast with the present results, in a previous study where the same autoshaping procedure was used, untreated animals and animals injected with isotonic saline into the striatum showed a rapid acquisition of the lever-press response (2). This difference can be accounted for by the use of different levers in the conditioning boxes. To activate the microswitch of the lever used in the present study, rats had to exert about twice as much force than that needed in the previous study.

In marked contrast with the lack of acquisition of the task seen in the control groups of Experiment 1, there was a reliable level of responding in all groups submitted to the classical operant autoshaping procedure in Experiment 2, as they had a significantly higher performance than the animals that did not receive water during training. During the first session, conducted before the treatments were administered, all groups had the same level of execution. Hence, it can be stated that all groups of animals, regardless of cannulae implantation, had the same response capabilities and that any observed differences in acquisition during the remaining autoshaping sessions were due to the effects of the treatments. Starting on the third session, the striatal group that had received the choline showed a striking unfolding of lever pressing, although the rest of the groups slowly acquired the conditioned response. Again, one cannot invoke nonassociative factors in explaining this result, because the injections were administered after the sessions had taken place. It is postulated that this marked improvement in performance was due to the strengthening of memory of the rewarding outcome of the operant responses that occurred during the first three autoshaping sessions.

This interpretation should be taken cautiously, however, because both classical and operant autoshaping procedures were in effect during these sessions; hence, it is possible that the memory-enhancing effects of choline reflect the concurrent facilitation of operant and CS-UCS associations involved in acquisition of the conditioned response.

In summary, the present results, together with the evidence reviewed in the introduction, permit the conclusion that striatal cholinergic activity is important in memory consolidation of the classical association of conditioned-nonconditioned stimuli, and in acquisition, consolidation, and performance of instrumental conditioned responses.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank E. Cruz-Kuri and M. A. Guevara for their helpful comments on the manuscript. Supported by CONACYT (D111-903541), DGAPA (IN-202791), and PADEP (MED-9210).

## REFERENCES

- Barker, L. A.; Ghok, S. D.; Green, J. P.; Khandelwal, J. Acetylcholine metabolism in the rat hippocampus and striatum following one-trial passive training. *Neuropharmacology* 21:183-185; 1982.
- Bermudez-Rattóni, F.; Mujica-Gonzalez, M.; Prado-Alcalá, R. A. Is cholinergic activity of striatum involved in the acquisition of positively-motivated behaviors? *Pharmacol. Biochem. Behav.* 24:715-719; 1986.
- Brown, P. L.; H. M. Jenkins, H. M. Auto-shaping of the pigeon's key pecking. *J. Exp. Anal. Behav.* 11:1-8; 1968.
- Cohen, E. L.; Wurtman, R. J. Brain acetylcholine: Increase after systemic choline administration. *Life Sci.* 16:1095-1102; 1975.
- Deadwyler, S. A.; Montgomery, D.; Wyler, E. J. Passive avoidance and carbachol excitation of the caudate nucleus. *Physiol. Behav.* 8: 631-635; 1972.
- Haubrich, D. R.; Wang, P. F. L.; Clody, D. E.; Wedeking, P. W. Increase in rat brain acetylcholine induced by choline or deanol. *Life Sci.* 17:975-980; 1975.
- Haubrich, D. R.; Wang, P. F. L.; Herman, R. L.; Clody, D. E. Acetylcholine synthesis in rat brain: Dissimilar effects of clozapine and chlorpromazine. *Life Sci.* 17:739-748; 1975.
- Haycock, J. W.; Deadwyler, S. A.; Sideroff, S. L.; McGaugh, J. L. Retrograde amnesia and cholinergic systems in the caudate-putamen complex and dorsal hippocampus of the rat. *Exp. Neurol.* 41:201-213; 1973.
- Kirk, R. *Experimental design: Procedures for the behavioral sciences.* Belmont, CA: Brooks/Cole; 1968.
- König, J. F. R.; Klippel, R. A. *The rat brain: A stereotaxic atlas.* Baltimore: Williams and Wilkins; 1963.
- Molenaar, P. C.; Nickolson, V. J.; Polak, R. I. Preferential release of newly synthesized <sup>3</sup>H-acetylcholine from rat cerebral cortex slices in vitro. *Br. J. Pharmacol.* 47:97-108; 1973.
- Neill, D. B.; Grossman, S. P. Behavioral effects of lesions or cholinergic blockade of dorsal and ventral caudate of rats. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 71:311-317; 1970.
- Prado-Alcalá, R. A. Is cholinergic activity of the caudate nucleus involved in memory? *Life Sci.* 37:2135-2142; 1985.
- Prado-Alcalá, R. A.; Cepeda, G.; Verduzco, L.; Jimenez, A.; Vargas-Ortega, E. Effects of cholinergic stimulation of caudate nucleus on active avoidance. *Neurosci. Lett.* 51:31-36; 1984.
- Prado-Alcalá, R. A.; Cobos-Zapata, G. G. Improvement of learned behavior through cholinergic stimulation of the caudate nucleus. *Neurosci. Lett.* 14:253-258; 1979.
- Prado-Alcalá, R. A.; Cobos Zapata, G. G. Learning deficits induced by cholinergic blockade of caudate nucleus as a function of experience. *Brain Res.* 138:190-196; 1977.
- Prado-Alcalá, R. A.; Signorel, L.; Figueroa, M. Time-dependent retention deficits induced by post-training injections of atropine into the caudate nucleus. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 15:633-636; 1981.
- Richter, J. A.; Marchbanks, R. M. Synthesis of radioactive acetylcholine from [<sup>3</sup>H]choline and its release from cerebral cortex slices in vitro. *J. Neurochem.* 18:691-703; 1971.
- Sandberg, K.; Sanberg, P. R.; Hanin, I.; Fisher, A.; Coyle, T. Cholinergic lesion of striatum impairs acquisition and retention of a passive avoidance response. *Behav. Neurosci.* 98:162-165; 1984.
- Solana-Figueroa, R.; Prado-Alcalá, R. A. Retrograde amnesia produced by intrastriatal atropine and its reversal by choline. *Life Sci.* 46:679-686; 1990.
- Stevens, J. R.; Kim, Ch.; Maelcan, P. D. Stimulation of caudate nucleus: Behavioral effects of chemical and electrical stimulation. *Arch. Neurol.* 4:47-54; 1961.
- Tucek, S. *Acetylcholine synthesis in neurons.* London: Chapman and Hall; 1978.
- Ulus, H. I.; Wurtman, R. J.; Mauron, C.; Blusztajn, J. K. Choline increases acetylcholine release and protects against the stimulation-induced decrease in phosphatide levels within membranes of rat corpus striatum. *Brain Res.* 484:217-227; 1989.

**A**

*spects of synaptic  
transmission*

**Acetylcholine,  
Sigma Receptors,  
CCK and  
Eicosanoids,  
Neurotoxins**

*Edited by T. W. Stone*

FALLA DE ORIGEN

**Aspects of synaptic transmission 2:  
Acetylcholine, Sigma Receptors, CCK  
and Eicosanoids, Neurotoxins**

---

Edited by

**T. W. Stone**

*Department of Pharmacology, University of Glasgow, Scotland*

*Taylor & Francis*  
*London • Washington, DC*  
*1993*

## Chapter 4

### Cholinergic neurons and memory

*Roberto A. Prado-Alcalá, Luis Fernández-Ruiz and Gina L. Quirarte*

#### 4.1. Introduction

What follows is not intended to be an exhaustive review of the literature germane to the involvement of acetylcholine (ACh)-containing neurons in memory. The authors will present selected examples which make it possible to postulate that ACh participates in this higher function of the nervous system, although conflicting evidence will also be offered, for comprehensive reviews see Bammer (1982), Barnes *et al.* (1985), Ebinger (1991), Overstreet (1984), Prado-Alcalá (1985) and Warburton and Weston (1984). The case will be made that central nervous system ACh is not necessary for memory consolidation of tasks that involve an enhanced experience, achieved through overtraining or over-reinforcement.

#### 4.2. Alteration of cholinergic activity by systemic treatments

The pioneering work of Anthony Deutsch strongly suggested that the establishment of memory was dependent upon an optimal level of ACh in the synapses involved in this process: if the transmitter level is low, as in the case of a newly learned behaviour or during forgetting, cholinesterase inhibitors improve memory; if, on the other hand, the transmitter level is high (as would be expected in the case of well-learned responses) an excess of ACh will produce a deterioration of memory (Deutsch, 1971).

There is an abundance of reports showing that administration of anticholinergic drugs produce amnesia. One of the most common behavioural tests used in this field is one trial passive avoidance; in the majority of cases a profound amnesic state is produced by both pre- and post-training injections of scopolamine (e.g. Durán-Arévalo *et al.*, 1990; Rush, 1988; Spignoli *et al.*, 1987), although some negative results have also been published (Lewis and Bregman, 1972; Myers, 1965).

In recent years, the effects of cholinergic manipulations on memory have been tested on the acquisition and performance of tasks trained in conventional mazes, in the radial-arm maze and the Morris water-maze. These higher processes are also greatly disturbed by cholinergic blockade (Lamberty and Gower, 1991; Spangler *et al.*, 1986). In this context there are, however, some negative results (Hagan *et al.*, 1986)



Since blockade of cholinergic receptors induces an amnesic state, one would expect to find the opposite effect by the administration of drugs that facilitate cholinergic transmission. Indeed this is the case. Injections of compounds that stimulate ACh release, either directly or through blockade of muscarinic autoreceptors (which inhibit ACh release), significantly improve passive avoidance responding in normal rats, as well as short-term memory in poor performing aged rats. Equivalent effects on passive avoidance have been observed after administration of the anticholinesterase physostigmine (Davis *et al.*, 1983; Gower, 1987).

An interesting finding was recently published by Packard *et al.* (1990). They found that post-training injection of AF-DX 116, a muscarinic  $M_2$  receptor antagonist, improves memory of eight-arm radial maze tasks in a time-dependent manner. Their results, together with those of Gower (1987), show that improvement of memory can be achieved not only by activation of ACh receptors, but also by blockade of muscarinic receptors. This is a novel approach to the study of memory disorders, which should be investigated further.

Another line of experimentation that has attracted the attention of workers in this area of research is the study of treatments that may ameliorate amnesic states. It has been found that drugs that facilitate ACh synaptic activity reverse experimentally-induced mnemonic dysfunctions. Again, it seems that the behavioural test of choice is passive avoidance learning.

For example, it was reported that scopolamine administered before training produced amnesia of passive avoidance. The cholinergic agonists oxotremorine, arecoline and BM-5 antagonized this amnesic effect. By the same token, injection of AF64A (ethylcholine mustard aziridium ion, an irreversible inhibitor of high-affinity choline uptake on cholinergic nerve terminals; Fisher, 1986) into the cerebral ventricles results in retention deficits of this aversively motivated task. Arecoline and physostigmine (Yamasaki *et al.*, 1991), as well as AF102B (a highly selective  $M_1$ -type agonist) each reversed the deficits produced by AF64A (Fisher *et al.*, 1991). The scopolamine-induced deficit was also reversed by THA, a compound that inhibits acetylcholinesterase and blocks  $M_1$  and  $M_2$  binding (Nielsen *et al.*, 1989).

Other behavioural tests that have been studied in relation to reversal of amnesia are the water-maze and the T-maze. Again, AF102B and its trans-isomer AF102A reversed the deficits produced by AF64A in reference memory and working memory in the Morris water maze (Fisher *et al.*, 1991). Similarly, intraventricular hemicholinium-3 impaired spatial learning in the water-maze. THA, physostigmine, arecoline and oxotremorine antagonized such impaired learning (Hagan *et al.*, 1989). As expected, AF64A administration significantly impaired memory functions related to T-maze performance of a delayed alternation task. AF102B was effective in ameliorating the acquisition and performance deficits (Nakahara *et al.*, 1989).

Taken together, these and other data allow us to accept the concept that ACh-containing neurons play a very important role in memory processes. Understanding of the mechanisms through which this neurotransmitter participates in cognition is far from complete. In an attempt to define the sites of action of those compounds that interfere with or improve memory functions, several groups of scientists have

explored the effects of lesions and pharmacological manipulations of cerebral structures on learning and memory.

#### 4.3. Alteration of cholinergic activity by intracerebral treatments

Mesulam (1990) has identified and classified eight neuronal groups that contain ACh, which project to different structures of the central nervous system.

The first cholinergic neuronal group is called Ch1, and is found in the medial septal nucleus. The second group is represented by cholinergic neurons of the vertical limb of the nucleus of the diagonal band of Broca. Both Ch1 and Ch2 project to the hippocampus.

Ch3 is found in the horizontal limb of the nucleus of the diagonal band of Broca, and sends axons to the olfactory bulb.

The cholinergic afferents of the cerebral cortex and of the amygdala originate in Ch4, known in the rat as nucleus basalis magnocellularis (NBM), and in the human as basal nucleus of Meynert.

The pedunculo pontine and laterodorsal tegmental nuclei constitute the cholinergic groups Ch5 and Ch6, respectively; these groups project to the thalamus and to limbic and cortical regions.

Lastly, Ch7 and Ch8 are located, respectively, in the medial habenular nucleus which projects to the interpeduncular nucleus, and in the parabigeminal nucleus which sends efferent fibres to the superior colliculus.

This classification does not take into account all cholinergic neurons. There are structures with cholinergic interneurons, whose axons do not go beyond the boundaries of these structures. Such is the case of the neostriatum.

As seen above, there are three types of ACh-containing structures: those in which the cell bodies of ACh neurons reside, those which are targets to cholinergic fibres, and those that synthesize and utilize its endogenous ACh.

Three of the eight cholinergic groups are importantly involved in memory functions, namely the Ch1, Ch2 and Ch4 groups; the probable involvement of the other groups has been explored only recently, as is the case of the Ch5 group (pedunculo pontine nucleus), whose lesions produce deficits in the water and radial maze (Della *et al.*, 1991).

What follows is a brief review of the role of Ch1, Ch2 and Ch4 and their respective cholinceptive structures on learning and memory. A review will also be made of the involvement of striatal ACh in mnemonic functions.

##### 4.3.1. Ch1, Ch2 and hippocampus

Ch1 and Ch2 represent the two major cholinergic inputs to the hippocampus. Lesions of the septal area induce a reduction of hippocampal ACh and choline acetyltransferase (ChAT). These lesions give rise to deficiencies in learning and memory, e.g., low acquisition rate of a visual discrimination task (Meyer *et al.*, 1982) and

poor performance of tasks involving working and spatial reference memory (Riekkinen *et al.*, 1991).

Lesion of the septo-hippocampal pathway also produces deficits in the radial arm-maze as well as in ACh content (Cassel *et al.*, 1990, Howard *et al.*, 1989), and interferes with the performance of spatial reference, spatial navigation and working memory tests, which have been correlated with high affinity uptake (Tarricone *et al.*, 1991). Memory deficiencies in monkeys, as evidenced by poor performance in the Wisconsin General Test Apparatus have also been reported after lesions of this pathway (Ridley *et al.*, 1991).

Another approach to the study of the involvement of ACh in memory processes has been the utilization of the neurotoxin AF64A. Intraventricular injection of AF64A produces deficiencies in hippocampal ACh, choline and acetylcholinesterase levels and in passive avoidance learning (Yamasaki *et al.*, 1991) as well as in radial arm-maze performance (Kegami *et al.*, 1991). When injected directly into the hippocampus, this toxin produces a deficit in long-term memory, but not in short-term memory, as measured in an eight-arm radial maze (Blaker and Goodwin, 1987).

Lesions of cholinergic nuclei produce a reduction of ACh in their cholinceptive targets. Hence, it is reasonable to postulate that interruption of the connections between these structures would result in mnemonic dysfunctions, without having altered the functions of the nuclei of origin. For instance, it has been described that aged rats showing deficits in passive avoidance also show deficits in normal functioning of muscarinic receptors (Lappa *et al.*, 1980), as well as decrements in sodium dependent high affinity choline uptake in the hippocampus (Sherman *et al.*, 1981). There are reports of deficiencies that are related to low levels of hippocampal ChAT in another type of learning task, such as the radial arm-maze and the water-maze (Luine and Hearn, 1990, Fandon *et al.*, 1991).

Experimental manipulations of cholinergic neurotransmission in the hippocampus have also produced results that indicate that ACh is involved in learning and memory. Injections of cholinergic antagonists produce deficiencies in representational memory (Messer, 1990) and in one way active avoidance (Brito and Brito, 1990).

It is interesting to mention that when cells from the septal area are transplanted into the hippocampus, a reversal of mnemonic deficits shown by aged rats in an eight-arm maze is produced (Schenk *et al.*, 1990). Along these lines, intrahippocampal transplants of cells from the septal-diagonal band region produce a significant improvement in the Morris water maze (Gage and Bjorklund, 1986). It has been postulated that these grafts are able to ameliorate behavioral impairments perhaps by restoration of cholinergic synapses between the graft and the host tissue (Clarke and Bjorklund, 1989).

#### 4.3.2 Ch2 and cortex

The important finding that there was a degeneration of the basal nucleus of Meynert in Alzheimer's disease gave rise to numerous studies related to this cholinergic projection. In rodents, lesions of the equivalent nucleus, the NBM, produce mnemonic deficiencies, as in the case of passive avoidance (Lo Conte *et al.*, 1982).

The cellular group Ch4 is found in the ventromedial zone of the globus pallidus. Because of the localization of its cells, which are intermingled with pallidal cells, it is rather difficult to produce specific electrolytic lesions, as it is difficult to lesion the Ch4-cortical projection because of its diffuse arrangement. One approach that has been used is the local injection of neurotoxins that damage cell bodies, sparing passing fibres, although damage to cells of the pallidus or zona incerta cannot be discounted.

Injection of kainic acid into the ventral pallidus produces passive avoidance deficits as well as a decrement in ChAT levels in the cerebral cortex (Friedman *et al.*, 1983). Application to the NBM of a less aggressive neurotoxin, ibotenic acid, also produces failures in the water-maze test (Mandel *et al.*, 1989, Riekkinen *et al.*, 1990) which have been attributed to cholinergic deficiencies, since peripheral administration of physostigmine temporarily protects against the amnesic effects of the chemical lesions (Mandel *et al.*, 1989). Passive avoidance deficits were described when this drug was delivered to the NBM or to the dorsolateral globus pallidus, a region which does not constitute a part of the efferent cholinergic projection to the cortex (Flicker *et al.*, 1983).

However, in spite of the reported deleterious effects produced by ibotenic acid on memory and cortical ACh, its usefulness has recently been questioned in the light of findings derived from the use of quisqualic acid. When injected into the NBM, this neurotoxin produces a severe reduction in ACh cortical levels and milder memory disturbances, as compared with the effects of ibotenic acid. For example, it has been found that lesions of NBM with quisqualic acid induce a 63 per cent reduction of ChAT and a deficit in working memory without affecting reference memory (Biggan *et al.*, 1991). This effect can be due to the lesser, nonspecific damage to pallidal neurons produced by quisqualic acid, the mnemonic deficit being due to diminished cortical cholinergic activity. Further discussion on this matter is beyond the scope of this chapter (for recent reviews see Dekker *et al.*, 1991, Dunnet *et al.*, 1991, Kesner *et al.*, 1990).

It has been shown that in aged rats there is a reduced level of ChAT in the basal forebrain, frontal cortex and striatum, but mainly in those animals with learning shortages. Along this line, there is a positive correlation between ChAT levels in NBM and performance of passive avoidance, regardless of the subject's age (Riekkinen *et al.*, 1990). In humans with Parkinson's disease, however, and with a degeneration of 68 per cent of neurons of the nucleus basalis of Meynert, which is accompanied by a reduction of cortical AChE, and in some cases in the amygdala, there is no amnesia of the type found in Alzheimer's disease (Malson *et al.*, 1991).

A different approach used to understand the role of cortical ACh in memory, is directly to manipulate cholinergic transmission, thus avoiding the problem of specificity encountered with the use of the neurotoxins mentioned above. Blockade of muscarinic receptors of the frontal and parietal cortex, but not of the occipital cortex, produces deficits in passive avoidance (Fukuchi *et al.*, 1987). The same deficit is produced by intracortical (frontoparietal) injection of AF64A, as well as a reduction of cortical cholinergic markers (Mouton *et al.*, 1988). It is interesting to note that six months after frontoparietal lesions with AF64A there is a recovery from

cholinergic hypofunction, during which period memory deficits had been observed (Crawley and Wenk, 1989).

It should be emphasized that Ch4 also sends efferent fibres to the amygdala, and that this structure is importantly involved in learning processes. Dubois and colleagues (1985) have shown that lesions of the NBM produce a deficit in spatial memory, as well as a reduction of ChAT levels both in amygdala and sensorimotor and prefrontal cortex. Kesner *et al.* (1990) have suggested that the amnesic effects induced by NBM lesions could be mainly due to lesions of limbic projections – primarily to the amygdala – since the mnemonic deficiencies are more similar to those produced by amygdala lesions than to those produced by cortical (frontal and parietal) lesions.

#### 4.3.3 Striatum

Striatal ACh is endogenous to the striatum, and is produced by interneurons that represent about 1 per cent of its cellular population.

Involvement of striatal ACh in memory processes is well documented. Blockade of muscarinic receptors of the striatum brings about deficits in acquisition (Neill and Grossman, 1970) and performance (Prado-Alcalá *et al.*, 1984) of two-way active avoidance, although no impairments in one-way active avoidance could be detected (Prado-Alcalá *et al.*, 1980a).

The involvement of the striatum in passive avoidance has been extensively studied. It has been consistently found that the application of atropine or scopolamine into the anterior-dorsal striatum shortly after training produces a marked amnesic state (Haycock *et al.*, 1973; Prado-Alcalá *et al.*, 1980a). The amnesic effect of atropine injections into the striatum is both dose- and time-dependent: as the dose of the antimuscarinic drug is increased so is the retention deficit (Giordano and Prado-Alcalá, 1986; Prado-Alcalá *et al.*, 1985), when post-trial injections of atropine into the striatum were closer in time to the time of training, a greater amnesic state was produced (Díaz del Guante *et al.*, 1991; Prado-Alcalá *et al.*, 1981).

Consistent with these results are the data published by Sandberg *et al.* (1984). They studied the effects of application of AF64A into the striatum on passive avoidance; a profound impairment in acquisition and retention was found. Conversely, facilitation of striatal cholinergic activity, through intrastriatal injections of choline, significantly improves retention and performance of active (Prado-Alcalá *et al.*, 1984) and passive avoidance (Fernández *et al.*, 1977). In a recent experiment where rats were trained in passive avoidance it was described that intrastriatal choline injections reversed the amnesic effect of intrastriatal atropine application (Solana-Figueroa and Prado-Alcalá, 1990). That ACh metabolism is increased during passive avoidance learning was demonstrated by Baker *et al.* (1982) in an experiment where ACh synthesis in the striatum was found to be enhanced after training.

Regarding positively reinforced tasks, intrastriatal injections of antimuscarinic drugs produce significant impairments in the acquisition of bar-pressing (Bermúdez-Rattoni *et al.*, 1986) and in the performance of this task (Prado-Alcalá, 1972). Conversely, facilitation of striatal cholinergic activity, through intrastriatal injections

of choline or acetylcholine, significantly improves performance (Prado-Alcalá and Cobos-Zapataín, 1979a) of bar-pressing.

As we have seen, there is overwhelming evidence to support the hypothesis that cholinergic neurons are necessary for the establishment of memory. However, as was also described, there are cases where manipulation of cholinergic activity does not bring about changes in mnemonic functions. In many instances, failures to replicate 'positive' studies or to find modifications of conditioned behaviours by the application of treatments that alter ACh activity, are explained in terms of differences in procedures, animal species, stimulation parameters, and so on.

An alternative explanation for the 'negative' findings (derived from a number of studies where different procedures, animal species and stimulation parameters are used) is that, indeed, ACh is not necessary for the establishment of memory for tasks that have been overtrained or over-reinforced.

#### 4.4. Overtraining and over-reinforcement protect against amnesia induced by cholinergic blockade

As described above, cholinergic dysfunction of the striatum induces significant deficits in acquisition, consolidation and performance of conditioned behaviours; the same is true when cholinergic blockade is produced by systemic injections of anticholinergic drugs.

In 1977 Prado-Alcalá and Cobos-Zapataín reported that injections of atropine into the caudate nucleus did not alter the performance of cats that had been trained to press a bar in order to be reinforced with milk. A previous study had shown that this treatment produced an amnesic state in the same species, trained in the same task (Prado-Alcalá *et al.*, 1972). The only difference between these two experiments was that the animals of the former study had been overtrained (i.e. they had been trained for 30 sessions instead of the usual 10 to 15 sessions).

Subsequent experiments have confirmed the protective effect of overtraining. Rats trained to bar-press for 5, 15, or 25 sessions were injected with scopolamine intrastrially; a significant deficit in retention was found in the 5- and 15-session groups, but no deterioration in the 25-session group (Prado-Alcalá *et al.*, 1980). Equivalent results were obtained when a more complex task (spatial alternation) was studied (Prado-Alcalá *et al.*, 1978).

In an attempt to determine the generality of the protective effect of an enhanced learning experience, the effects of atropine and scopolamine injection into the striatum were assessed in rats that had been trained in a one-way passive avoidance task. First, the known amnesic effect of intrastriatal application of anticholinergic drugs was replicated. In order to increase the learning experience, groups of rats were submitted to training using footshock intensities that were two and four times as high as that needed to establish learning and to produce the amnesic effect. The injections failed completely to produce any changes in retention of the task (Giordano and Prado-Alcalá, 1986; Díaz del Guante *et al.*, 1990).

What is then the role of striatal cholinergic activity regarding memory processes?

The data presented above indicate that (a) striatal ACh is critically involved in the acquisition, consolidation and performance of instrumentally-conditioned behaviours, and b) under conditions of overtraining or over-reinforcement, those mnemonic functions can be carried out without the participation of striatal ACh. These data also point to the possibility that during an enhanced learning experience other neurochemical systems, outside the striatum, mediate those aspects of memory function that had been carried out by striatal ACh.

To test this last possibility experimentally, it was decided to produce a generalized dysfunction of the striatum using local injections of a high concentration of potassium chloride or lidocaine. As expected, while these treatments produced a marked amnesic state in 'normally' trained animals, no interference with performance of lever-pressing nor with the consolidation of passive avoidance could be detected in overtrained or over-reinforced subjects (Pérez-Ruiz and Prado-Alcalá, 1989; Prado-Alcalá and Cobos-Zapatain, 1979b; Prado-Alcalá *et al.*, 1980b).

Since systemic injections of anticholinergic drugs produce memory impairments, it was of interest to determine whether generalized blockade of muscarinic receptors would also produce amnesia in over-reinforced passive avoidance learning. Post-training treatment with scopolamine produced the expected interference with consolidation. When footshock intensities were increased two- and threefold, however, the animals showed near perfect responding (Durán-Arévalo *et al.*, 1990). In a subsequent study, it was found that the protective effect of over-reinforcement is established, not in a gradual manner, but in an all-or-none fashion, i.e., with an increase of less than 5 per cent of the intensity of the footshock where amnesia is produced by scopolamine (from 1.7 to 2.8 mA). These results suggest that ACh is critically involved in memory consolidation, and that by increasing the magnitude of the negative reinforcer, a threshold is reached where cholinergic activity of the nervous system is not necessary for the development of the consolidation process (Cruz-Morales *et al.*, in press).

Further research is needed to determine the way in which the cholinergic systems are switched off from memory functions, and to identify the neuro-chemical systems that support memory consolidation during overtraining and over-reinforcement.

### Acknowledgement

This work was supported by DGAPA (IN 202791) and PADFP (MED-9210), to Gina Quirarte.

### References

- Barron, G. (1982). Pharmacological investigation of neurotransmitter involvement in passive avoidance responding: A review and some new results. *Neuroscience and Biobehavioral Review*, **6**, 247-266.
- Barwick, J. A., Olick, S. A., Green, J. P. and Kulkarni, J. (1982). Acetylcholine metabolism in the rat hippocampus and striatum following one-trial passive training. *Neuropharmacology*, **21**, 183-185.
- Bartus, R.T., Dean, R.L., Pomeroio, M.J. and Flicker, C. (1985). The cholinergic hypothesis: A historical overview, current perspectives, and future directions. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **44**, 332-358.
- Bernádez-Rattoni, F., Mujica-González, M. and Prado-Alcalá, R.A. (1986). Is cholinergic activity of the striatum involved in the acquisition of positively-motivated behaviors? *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, **24**, 715-719.
- Biggan, S.L., Beninger, R.J., Cockhill, J., Jhamandas, K. and Boegman, R.J. (1991). Quisqualate lesions of rat NBM: selective effects on working memory in a double Y maze. *Brain Research Bulletin*, **26**, 613-616.
- Blaker, W.D. and Goodwin, S.D. (1987). Biochemical and behavioral effects of intrahippocampal AFB4A in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, **28**, 157-163.
- Brato, L.S. and Brito, G.N. (1990). Locomotor activity and one-way active avoidance after intrahippocampal injection of neurotransmitter antagonists. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **23**, 1015-1019.
- Cassel, J.C., Keleche, C., Hornsperger, J.M., Jackisch, R., Herting, G. and Will, B.E. (1986). Graft-induced learning impairment despite graft-enhanced cholinergic functions in the hippocampus of rats with septohippocampal lesions. *Brain Research*, **534**, 295-298.
- Clarke, D.J. and Bjorklund, A. (1989). Restoration of cholinergic efferents in the hippocampus by focal grafts. *Experientia, Supplementum*, **57**, 275-287.
- Crawley, J.N. and Wenk, G.L. (1989). Co-existence of palatin and amygdaline as galanin involved in memory processes and dementia? *Trends in Neurosciences*, **12**, 278-282.
- Cruz-Morales, S.E., Durán-Arévalo, M., Díaz del Guante, M.A., Quirarte, G. and Prado-Alcalá, R.A., in press. A threshold for the protective effect of over-reinforced passive avoidance against scopolamine-induced amnesia. *Behavioral and Neural Biology*.
- Davis, H.P., Idow, A. and Gibson, G.E. (1983). Improvement of 8 arm maze performance in aged Fischer 344 rats with 3,4-diaminopyridine. *Experimental Aging Research*, **9**, 211-214.
- Dekker, A.J.A.M., Connor, D.G. and Thal, L.J. (1991). The role of acetylcholine projections from the nucleus basalis in memory. *Neuroscience and Biobehavioral Review*, **15**, 299-317.
- Deliu, F., Mayo, W., Cherkaoui, J., Le Moal, M. and Simon, H. (1991). Learning disturbances following excitotoxic lesion of cholinergic pedunculo-pontine nucleus in the rat. *Brain Research*, **544**, 126-132.
- Deusch, J.A. (1971). The cholinergic synapse and the site of memory. *Science*, **174**, 789-794.
- Díaz del Guante, M.A., Cruz-Morales, S.E. and Prado-Alcalá, R.A. (1991). Time-dependent effects of cholinergic blockade of the striatum on memory. *Neuroscience Letters*, **122**, 79-82.
- Díaz del Guante, M.A., Rivas-Arancibia, S., Quirarte, G. and Prado-Alcalá, R.A. (1992). Over-reinforcement protects against memory deficits induced by muscarinic blockade of the striatum. *Boletín de Estudios Médicos y Biológicos, México*, **38**, 49-53.
- Dunlos, B., Mayo, W., Agid, Y., Le Moal, M. and Simon, H. (1988). Profound disturbances of spontaneous and learned behaviors following lesions of the nucleus basalis nigro-striatal cellularity in the rat. *Brain Research*, **338**, 249-258.
- Dunnell, S.B., Everitt, B.J. and Robbins, T.W. (1991). The basal forebrain cortical cholinergic system: interpreting the functional consequences of excitotoxic lesions. *Trends in Neurosciences*, **14**, 494-501.
- Durán-Arévalo, M., Cruz-Morales, S.E. and Prado-Alcalá, R.A. (1990). Is acetylcholine involved in memory consolidation of over-reinforced learning? *Brain Research Bulletin*, **24**, 725-727.
- Fernández, S.M., Solodkin, H.M. and Prado-Alcalá, R.A. (1977). Blockade and activation of caudate cholinergic activity. Effects on passive avoidance. *Neuroscience Abstracts*, **3**, 232.

- Ehinger, H.C. (1991). Cholinergic mechanisms in learning, memory and dementia: a review of recent evidence. *Trends in Neurosciences*, **14**, 220-223.
- Fisher, A. (1986). Potential animal models for senile dementia of Alzheimer's type, with emphasis on AF64A-induced cholinotoxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, **26**, 161-181.
- Fisher, A., Branders, R., Karton, I., Patel, Z., Gurwitz, D., Haring, R., Supir, M., Levy, A. and Heldman, E. (1991). (+/-)-cis-2-methyl-spiro(1,3-oxathiolane-5,3)quinuclidine, an M<sub>1</sub>-selective cholinergic agonist, attenuates cognitive dysfunctions in an animal model of Alzheimer's disease. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **257**, 392-403.
- Flicker, C., Dean, R.L., Watkins, D.L., Fisher, S.K. and Bartus, R.T. (1983). Behavioral and neurochemical effects following neurotoxic lesions of a major cholinergic input to the cerebral cortex in the rat. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, **18**, 923-931.
- Friedman, E., Jeter, B. and Kuster, J. (1983). Loss of cholinergic neurons in the rat neocortex produces deficits in passive avoidance learning. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, **19**, 309-312.
- Fukuchi, I., Kato, S., Nakahara, M., Uchida, S., Ishida, R. and Yoshida, H. (1987). Blockade of cholinergic receptors by an irreversible antagonist propylbenzilylcholine mustard (PBQM), in the rat cerebral cortex causes deficits in passive avoidance learning. *Brain Research*, **400**, 53-61.
- Gare, F.H. and Bjorklund, A. (1986). Cholinergic septal grafts into the hippocampal formation improve spatial learning and memory in aged rats by an atropine-sensitive mechanism. *Journal of Neuroscience*, **6**, 2837-2847.
- Giordano, M. and Prado-Alcalá, R.A. (1986). Retrograde amnesia induced by post-trial injection of atropine into the caudate-putamen: Protective effect of the negative reinforcer. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, **24**, 905-909.
- Gover, A.J. (1978). Imbalance by scopolamine and physostigmine of retention of passive avoidance response in mice. *Psychopharmacology*, **91**, 326-329.
- Hagan, J.J., Juman, J.H. and Broekkamp, C.P. (1989). Hemicholinium-3 impairs spatial learning and the deficit is reversed by cholinomimetics. *Psychopharmacology*, **98**, 327-336.
- Hagan, J.J., Tweedie, F. and Morris, R.G. (1986). Lack of task specificity and absence of posttraining effects of atropine on learning. *Behavioral Neuroscience*, **100**, 483-493.
- Haycock, J.W., Dunaway, S.A., Suleroff, S.L. and McCaugh, J.L. (1973). Retrograde amnesia and cholinergic systems in the caudate-putamen complex and dorsal hippocampus of the rat. *Experimental Neurology*, **41**, 201-213.
- Howard, M., Gross, A., Grady, M.S., Langer, R.S., Mathowitz, E., Winn, H.R. and Mayberg, H.R. (1989). Intracerebral drug delivery in rats with lesion-induced memory deficits. *Journal of Neurosurgery*, **71**, 105-112.
- Itohara, S., Shimomura, T. and Kawamura, H. (1991). Transplantation of ventral forebrain cholinergic neurons to the hippocampus ameliorates impairment of radial arm maze learning in rats with AF64A treatment. *Brain Research*, **548**, 187-195.
- Kesner, R.P., Cotterill, R.A. and O'Quinn, H. (1990). Memory deficits following nucleus basalis magnocellularis lesions may be mediated through limbic, but not neocortical, targets. *Neuroscience*, **38**, 93-102.
- Lambert, Y. and Gover, A.J. (1991). Cholinergic modulation of spatial learning in mice in a Morris-type water maze. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie*, **309**, S-19.
- Lewis, D.J. and Bolam, N.J. (1972). The cholinergic system, amnesia and memory. *Physiology and Behavior*, **8**, 517-514.
- Lipp, A.S., Felber, R.W., Beer, B., Critchett, L.F., Dean, R.L. and Bartus, R.T. (1980). Brain cholinergic destruction and memory in aged rats. *Neurobiology of Aging*, **1**, 13-19.
- LoConte, G., Bartolini, L., Casamenti, F., Marconini-Pepeu, I. and Pepeu, G. (1982). Lesions of cholinergic forebrain nuclei: changes in avoidance behavior and scopolamine actions. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, **17**, 933-937.
- Luine, V. and Hearn, M. (1990). Spatial memory deficits in aged rats: contributions of the cholinergic system assessed by ChAT. *Brain Research*, **523**, 321-324.
- Mandel, R.J., Chen, A.D., Connor, D.J. and Thal, L.J. (1980). Continuous physostigmine infusion in rats with excitotoxic lesions of the nucleus basalis magnocellularis: effects on performance in the water maze task and cortical cholinergic markers. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **251**, 612-619.
- Meser, W.S. Jr., Bohnett, M. and Stibbe, J. (1990). Evidence for a preferential involvement of M<sub>1</sub> muscarinic receptors in representational memory. *Neuroscience Letters*, **116**, 184-189.
- Mesulam, M.M. (1990). Human brain cholinergic pathways. In *Progress in Brain Research*, Vol. 84, edited by S.M. Aquilonius and P.G. Gilbert. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, pp. 231-41.
- Meyer, U., Wenk, H., Ott, T. and Wetzel, W. (1982). Behavioral investigations following cholinergic deafferentation of the hippocampus by septal lesions in rats. *Journal für Hirnforschung*, **23**, 1-12.
- Mouton, P.R., Meyer, E.M., Dunn, A.J., Mollard, W. and Arendash, G.W. (1988). Induction of cortical cholinergic hypofunction and memory retention deficits through intracerebral AF64A infusions. *Brain Research*, **444**, 104-118.
- Mufson, E.J., Presley, L.N. and Kordower, J.H. (1991). Nerve growth factor receptor immunoreactivity within the nucleus basalis (Ch4) in Parkinson's disease: reduced cell numbers and colocalization with cholinergic neurons. *Brain Research*, **539**, 19-30.
- Myers, B. (1965). Some effects of scopolamine on passive avoidance response in rats. *Psychopharmacologia*, **8**, 111-119.
- Nakahara, N., Iga, Y., Saito, Y., Mizobe, F. and Kawamata, G. (1989). Beneficial effects of FKS-508 (AF102B), a selective M<sub>1</sub> agonist, on the impaired spatial memory in AF64A-treated rats. *Japanese Journal of Pharmacology*, **51**, 839-847.
- Neill, D.B. and Grossman, P.S. (1970). Behavioral effects of lesions of cholinergic M<sub>1</sub> cells of dorsal and ventral caudate of rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, **71**, 311-317.
- Nielsen, J.A., Mena, E.E., Williams, J.H., Nocerini, M.R. and Loston, D. (1976). Correlation of brain levels of 9-acetyl-1,2,3,4-tetrahydroacridine (THA) with neurochemical and behavioral changes. *European Journal of Pharmacology*, **173**, 53-64.
- Overstreet, D.H. (1984). Behavioral plasticity and the cholinergic system. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, **8**, 133-151.
- Packard, M.G., Regentold, W., Quirarte, G. and White, N.M. (1990). Post-training injection of the acetylcholine M<sub>1</sub> receptor antagonist AF10X-116 improves memory. *Brain Research*, **524**, 72-74.
- Pérez-Ruiz, C. and Prado-Alcalá, R.A. (1989). Retrograde amnesia induced by late drug injection into the striatum: Protective effect of the negative reinforcer. *Brain Research Bulletin*, **22**, 599-603.
- Prado-Alcalá, R.A. (1985). Is cholinergic activity of the caudate nucleus involved in memory? *Life Sciences*, **37**, 2135-2142.
- Prado-Alcalá, R.A. and Cobos Zapata, G.G. (1977). Learning deficits induced by cholinergic blockade of the caudate nucleus as a function of experience. *Brain Research*, **138**, 190-196.
- Prado-Alcalá, R.A. and Cobos Zapata, G.G. (1979a). Improvement of learned behavior through cholinergic stimulation of the caudate nucleus. *Neuroscience Letters*, **14**, 253-258.
- Prado-Alcalá, R.A. and Cobos Zapata, G.G. (1979b). Interference with caudate nucleus activity by potassium chloride: Evidence for a 'moving' engram. *Brain Research*, **172**, 577-583.

- Prado-Alcalá, R.A., Cruz-Morales, S.E. and López-Mito, F.A. (1980a). Differential effects of cholinergic blockade of anterior and posterior caudate nucleus on avoidance behaviors. *Neuroscience Letters*, **18**, 339-345.
- Prado-Alcalá, R.A., Fernández-Samblancat, M. and Solodkin-Herrera, M. (1985). Injections of atropine into the caudate nucleus impair the acquisition and the maintenance of passive avoidance. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, **22**, 243-247.
- Prado-Alcalá, R.A., Kaufmann, P. and Moscona, R. (1980b). Scopolamine and KCl injections into the caudate-putamen: Overtraining-induced protection against deficits of learning. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, **12**, 249-253.
- Prado-Alcalá, R.A., Signoret, L. and Figueroa, M. (1981). Time-dependent retention deficits induced by post-training injections of atropine into the caudate nucleus. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, **15**, 633-636.
- Prado-Alcalá, R.A., Bermúdez-Rattoni, F., Velázquez-Martínez, D. and Bacha, M.G. (1978). Cholinergic blockade of the caudate nucleus and spatial alternation performance in rats: Overtraining-induced protection against behavioral deficits. *Life Sciences*, **23**, 889-896.
- Prado-Alcalá, R.A., Cepeda, G., Verdúzco, L., Jiménez, A. and Vargas-Ortega, E. (1984). Effects of cholinergic stimulation of the caudate nucleus on active avoidance. *Neuroscience Letters*, **51**, 31-36.
- Prado-Alcalá, R.A., Grinberg, Z.J., Alvarez-Leefmans, F.J., Gómez, A., Singer, S. and Brust-Catmona, H. (1972). A possible caudate-cholinergic mechanism in two instrumental conditioned responses. *Psychopharmacologia*, **25**, 339-346.
- Rodley, R.M., Thornley, H.D., Baker, H.P., Fine, A. (1991). Cholinergic neural transplants into hippocampus restore learning ability in monkeys with fornix transections. *Experimental Brain Research*, **83**, 533-538.
- Riekkinen, P., Jr., Sirvio, J. and Riekkinen, P. (1990). Interaction between raphe dorsalis and nucleus basalis magnocellularis in spatial learning. *Brain Research*, **527**, 342-345.
- Riekkinen, P., Jr., Aaitonen, M., Sirvio, J. and Riekkinen, P. (1991). Tetrahydroaminoacridine alleviates medial septal lesion induced and age related spatial reference but not working memory deficits. *Physiology and Behavior*, **49**, 1147-1152.
- Riekkinen, P., Jr., Miettinen, R., Sirvio, J., Aaitonen, M. and Riekkinen, P. (1990). The correlation of passive avoidance deficit in aged rats with the loss of nucleus basalis choline acetyltransferase-positive neurons. *Brain Research Bulletin*, **25**, 415-417.
- Rubio, D.K. (1988). Scopolamine amnesia of passive avoidance: a deficit of information acquisition. *Behavioral and Neural Biology*, **50**, 255-278.
- Sambberg, K., Sanberg, P.R., Hann, J., Frober, A. and Coyle, J.T. (1984). Cholinergic lesion of striatum impairs acquisition and retention of a passive avoidance response. *Behavioral Neuroscience*, **98**, 162-165.
- Schenk, E., Content, B. and Weiffel, P. (1990). Intrahippocampal cholinergic grafts in aged rats compensate impairments in a radial maze and in a place learning task. *Experimental Brain Research*, **87**, 641-650.
- Stierman, K.A., Küster, J.E., Dean, R.L., Bartus, R.T. and Friedman, E. (1981). Presynaptic cholinergic mechanisms in brain of aged rats with memory impairments. *Neurobiology of Aging*, **2**, 99-104.
- Solano-Figueroa, R. and Prado-Alcalá, R.A. (1990). Retrograde amnesia produced by intrastriatal atropine and its reversal by choline. *Life Sciences*, **46**, 679-686.
- Spanier, E.L., Rigby, P. and Ingram, D.K. (1986). Scopolamine impairs learning performance of rats in a 14-arm T-maze. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, **25**, 673-679.
- Spignoli, G., Magnani, M., Giovannini, M.G. and Pepen, G. (1987). Effect of pyroglutamic acid stereoisomers on ECS and scopolamine-induced memory disruption and brain acetylcholine levels in the rat. *Pharmacological Research Communications*, **19**, 901-912.
- London, P., Mundy, W.R., Ah, S.E., Nairy, K., Rogers, B.C. and Tilson, H.A. (1991). Age dependent changes in receptor-stimulated phosphoinositide turnover in the rat hippocampus. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, **38**, 861-867.

- Tarricone, B.J., Kern, S.R., Simon, J.R. and Low, W.C. (1991). Intrahippocampal transplants of septal cholinergic neurons: high-affinity choline uptake and spatial memory function. *Brain Research*, **548**, 55-62.
- Verloes, R., Scotto, A.M., Gobert, J. and Walfert, E. (1988). Effects of nootropic drugs in a scopolamine-induced amnesia model in mice. *Psychopharmacology*, **95**, 226-230.
- Warburton, D.M. and Wesnes, K. (1984). Drugs as research tools in psychology: Cholinergic drugs and information processing. *Neuropsychobiology*, **11**, 121-132.
- Yamasaki, N., Kato, K., Kurihara, E. and Nagaoka, A. (1991). Cholinergic drugs reverse AF64A-induced impairments of passive avoidance learning in rats. *Psychopharmacology*, **103**, 215-222.

## Effects of Central Muscarinic Blockade on Passive Avoidance: Anterograde Amnesia, State Dependency, or Both?

GINA L. QUIRARTE,\* SARA E. CRUZ-MORALES,† ALEJANDRO CEPEDA, MARITZA GARCÍA-MONTAÑEZ, GABRIEL ROLDÁN-ROLDÁN, AND ROBERTO A. PRADO-ALCALÁ<sup>1</sup>

*Department of Physiology, Faculty of Medicine and †Behavioral Pharmacology, ENEP-Itacala, National University of Mexico, P.O. Box 70-250, Mexico, D.F. 04510, Mexico; and \*Faculty of Psychology, University of Guadalajara, Guadalajara, Jalisco, Mexico*

It was recently reported that administration of relatively high intensities of footshock (overreinforcement) during training of passive avoidance protected animals against the amnesic effect of scopolamine, injected 5 min after training. This was interpreted in terms of a lesser involvement of acetylcholine in memory consolidation. An alternative explanation was that overreinforcement accelerated the consolidation process, which could have taken place before the injection of scopolamine. To test for this possibility, male Wistar rats were injected with 4, 8, or 12 mg/kg of scopolamine, 5 min before training with low or high levels of footshock and then tested for retention of the task. Scopolamine induced the expected memory deficit after the low-intensity footshock; after overreinforcement the higher doses of scopolamine induced state dependency, while no deficits were produced with the lower dose. It was concluded that: (a) acetylcholine is indeed involved in memory consolidation of passive avoidance; (b) scopolamine interacts with high footshock levels to produce state dependency; and (c) when relatively low doses of scopolamine are used in conditions of overreinforcement, protection against scopolamine-induced amnesia becomes evident. © 1994 Academic Press, Inc.

There is an abundance of reports showing that administration of anticholinergic drugs produces amnesia (for reviews see Bammer, 1982; Bartus, Dean, Pontecorvo, & Flicker, 1985; Fibiger, 1991; Overstreet, 1984; Prado-Alcalá, 1985; Warburton & Wesnes, 1984). It was recently reported that post-training scopolamine injections significantly interfered with memory consolidation of passive avoidance trained with a relatively low intensity

of footshock; however, when high intensities were used (overreinforcement), the same drug was totally ineffective in altering consolidation (Cruz-Morales, Durán-Arévalo, Díaz del Guante, Quirarte, & Prado-Alcalá, 1992; Durán-Arévalo, Cruz-Morales, & Prado-Alcalá, 1990). These results led to the conclusion that within a certain range of aversive intensities, acetylcholine receptors must be activated so that consolidation may take place, and that cholinergic activity is not important for consolidation after overreinforcement.

Given that in both cases the treatments had been administered 5 min after training, the protective effect of overreinforcement can also be interpreted in a different way, namely, that by increasing the intensity of the footshock memory consolidation was accelerated and established in less than the 5-min interval between training and treatment application and was still mediated by a cholinergic mechanism.

The aim of this work was to determine whether overreinforcement protects against the amnesic effects of scopolamine when training of passive avoidance is carried out under the influence of this drug; thus, if animals show amnesia then the proposition that cholinergic activity is not essential for consolidation is incorrect, and the alleged protective effect of overreinforcement was probably due to accelerated consolidation.

### GENERAL METHODS

In both experiments of this series animals were trained and tested using the same apparatus and procedures reported by Durán-Arévalo et al. (1990).

<sup>1</sup> Address reprint requests to Dr. R. A. Prado-Alcalá. Fax: (905) 623-2347. This work was supported by DGAPA-UNAM (IN200993) and PADEP.

### Animals

Experimentally naive male Wistar rats, weighing between 250 and 350 g, were used. They were individually housed in a temperature-controlled environment and had free access to solid food and tap water in their home cages. They were kept under these conditions starting at least 5 days before the experiment was initiated.

### Apparatus

Training and testing were carried out in a wooden box with two compartments of the same size (30 × 30 × 30 cm each), separated by a guillotine door. The lid of each compartment and the guillotine door were made of orange-colored lucite. The floor of one of the compartments was a grid made of aluminum bars (6-mm diameter), separated 1.5 cm center-to-center. The V-shaped lateral walls of the second compartment were stainless steel, and each was continuous with half the floor; there was a 1.5-cm slot separating each half-floor. Thus, when in this compartment, the rats were in contact with both walls, which could be electrified using 2 of the 10 output lines of a stimulator that delivered scrambled constant current (BRS/LVE, Model SGS-003). Illumination was provided by a 10 W light bulb located in the center of the lid of the gridded compartment. The conditioning box was located inside a dark, sound-deadening room, provided with background masking noise (BRS/LVE, Model AU-902).

### Training and Testing

During training each animal was put inside the gridded compartment of the conditioning box; 10 s later the door between the compartments was opened and the latency to enter the darker (electrifiable) compartment with all four paws was measured. Once in the second compartment the door was closed and a footshock was delivered through the stainless steel plates (footshock intensities will be specified below); after 5 s the door was reopened, thus allowing the animal to escape to the first compartment and to remain there for 30 s before being put back in its home cage. After escaping, the footshock was turned off. Twenty-four hours later a test of retention was programmed exactly as the training session, except that the footshock was omitted. If a rat did not cross within 600 s to the compartment where the shock had been given, the session was ended and a score of 600 was assigned.

### Statistics

The data derived from the retention tests were not distributed normally. Since the nature of the data did not allow the use of parametric statistics, the Kruskal–Wallis analysis of variance was computed for training, escape, and retention latencies among the groups. When appropriate, the Mann–Whitney *U* test (one-tailed) was used to compare performances between the main control group (not-treated) against each of the rest of the groups (Siegel, 1956).

## EXPERIMENT 1

This experiment was designed to replicate the known amnesic effect of pretraining injection of scopolamine on retention of passive avoidance (Bohdanecky & Jarvik, 1967; Calhoun & Smith, 1968; Dilts & Berry, 1967; Goldberg, Sledge, Hefner, & Robichaud, 1971) and to determine the effective doses of scopolamine to be used in Experiment 2.

### Treatments

There were 13 groups of rats ( $n = 12/\text{group}$ ). Except for 1 group of untreated animals, the rest of the groups were injected once intraperitoneally: 5 groups were injected with 8 mg/kg of scopolamine hydrobromide (Sigma) at 30 min after training or at 120, 60, 30, or 5 min before training. Four additional groups were also injected 5 min before training: with 0 (isotonic saline solution), 4, or 12 mg/kg of scopolamine or with 8 mg/kg of methylscopolamine (Sigma). Finally, three groups were injected twice (5 min before training and 5 min before retention testing) with 4, 8, or 12 mg/kg of scopolamine. A footshock of 3.0 mA was used during training.

### Results

The Kruskal–Wallis analysis of variance indicated that there were no significant differences among the groups regarding training and escape latencies. In contrast, highly significant differences in retention were found ( $H(12) = 60.105, p < .00001$ ).

Pretraining injections of the muscarinic blocker induced a marked performance deficit of passive avoidance. This deficit was both time- and dose-dependent: when the injection was delivered at 120 and 60 min before training there was no interference with retention as shown by the perfect responding of these groups, whose median retention scores (600 s) were identical to those of the not-



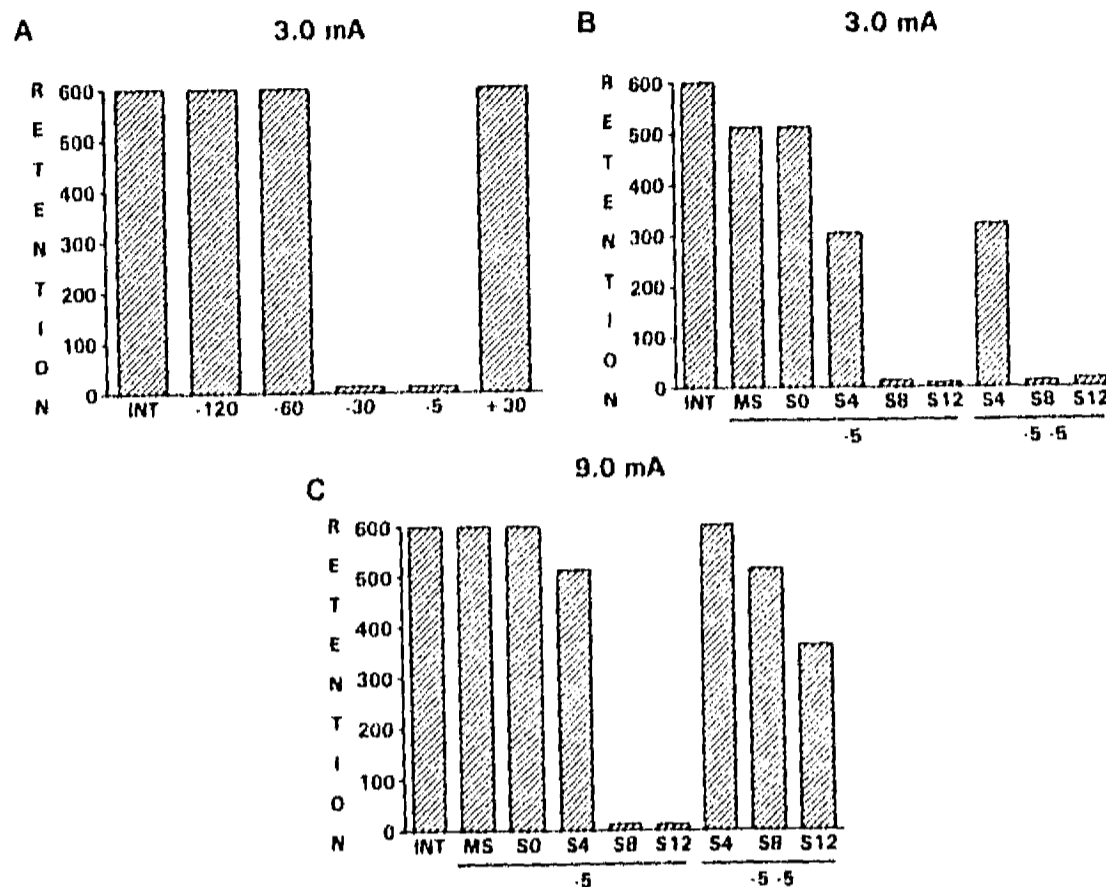


FIG. 1. Panel A shows median retention scores of animals trained in passive avoidance with 3.0 mA. Rats were given one ip injection of 8 mg/kg of scopolamine at 120, 60, 30, or 5 min before training (-) or at 30 min after training (+). Also shown is the retention of an intact (INT), not-treated group. The performance of groups -5 and INT is also presented in panel B for comparative purposes. Panels B (groups trained with 3.0 mA) and C (groups trained with 9.0 mA) depict median retention scores of rats given one ip injection of 0 (vehicle), 4, 8, or 12 mg/kg of scopolamine (S) or of 8 mg/kg of methylscopolamine (MS); there was a group of intact, not-injected rats (INT). The injections were administered, ip, 5 min before training; the last three bars represent groups that were given two injections of 4, 8, or 12 mg/kg of scopolamine, one at 5 min before training and the other at 5 min before retention testing (-5 -5).

treated group. By the same token, scopolamine, injected 30 min before training, and methylscopolamine, injected 5 min pretraining, did not produce any interference with retention. On the other hand, when the drug was injected 30 min (8 mg/kg) or 5 min (8 and 12 mg/kg) before training a highly significant deficit was observed ( $p$ 's = .008, .002, and .0009, respectively, relative to the not-treated group). The dose of 0 mg/kg (isotonic saline solution) did not affect performance significantly, while 4 mg/kg of scopolamine induced a retention deficit midway between the not-treated group and the groups that had been treated with 8 and 12 mg/kg of scopolamine. Thus, the retention score of the group injected with 4 mg/kg of scopolamine was lower than the score of the not-treated group ( $p$  = .037), but higher than those of the 8 and 12 mg/kg groups ( $p$ 's = .009 and .006, respectively). These results are depicted in Figs. 1A and 1B.

As illustrated in Fig. 1B, when the animals were submitted to double injections of scopolamine (i.e., 5 min before training and 5 min before retention testing) equivalent results to those described above were obtained: an intermediate deficit with 4 mg/kg and a conspicuous impairment in retention with 8 and 12 mg/kg. The Wilcoxon matched-pairs test showed that each of these groups did not differ reliably from their respective counterparts that received a single injection.

#### Discussion

In agreement with previous reports, the data indicate that training under the effects of scopolamine produces a significant performance deficit of passive avoidance (Bohdanecky & Jarvik, 1967; Calhoun & Smith, 1968; Dilts & Berry, 1967; Goldberg et al., 1971; Rush, 1988); it is reasonable to assume that

this deficit was due to interference with central memory processes since: (a) proactive effects can be discarded because injection of the antimuscarinic drug 30 min after training did not modify the learned response; (b) methylscopolamine, an anticholinergic drug that does not readily cross the brain-blood barrier, was ineffective in producing amnesia; (c) the marked interference with performance cannot be ascribed to state dependency because those groups that had been injected both before training and before retention testing showed the same degree of amnesia as that shown by the animals that had been injected only before training with the higher doses of scopolamine; an equivalent result had been reported earlier by Rush (1988), who also trained animals using a relatively low level of footshock (1.0 mA). The lack of effects on retention of injections delivered at 120 and 60 min before training (when the concentration of scopolamine in brain should have diminished), and the moderate but reliable effect of 4 mg/kg of scopolamine indicate that a certain number of cholinergic receptors must be blocked in order to arrest the consolidation process.

## EXPERIMENT 2

As stated in the introduction, the main interest of this work was to determine whether overreinforcement protects against amnesia when animals are trained under the influence of scopolamine. Previous findings suggested that, indeed, overreinforcement had such a protective effect (Cruz-Morales et al., 1992; Durán-Arévalo et al., 1990) when amnesic doses of scopolamine were injected after training. However, the possibility existed that the good retention shown by overreinforced animals had been due to an acceleration of the consolidation process, induced by the heightened stress reactions (or other reactions) associated with the relatively high footshock intensities that had been used in training.

### Treatments

There were nine groups of rats ( $n = 10/\text{group}$ ). Except for one group of untreated animals, five groups were injected once intraperitoneally, 5 min before training, with 0 (isotonic saline solution), 4, 8, or 12 mg/kg of scopolamine hydrobromide; the fifth group was injected with 8 mg/kg of methylscopolamine. The remaining three groups were given two injections (5 min before training and 5 min before retention testing) of 4, 8, or 12 mg/kg of scopolamine. To test for the effects of overrein-

forcement, a footshock of 9.0 mA was used during training (Durán-Arévalo et al., 1990).

### Results

Consistent with the results of Experiment 1, the analysis of variance showed that there were no significant differences among the groups concerning training and escape latencies. There were significant differences among the groups with respect to retention latencies ( $F(8) = 45.19, p < .00001$ ).

When the Mann-Whitney  $U$  test was computed, it was found that the groups that had been treated with 8 and 12 mg/kg of the antimuscarinic drug 5 min before training had significantly lower scores than each of the rest of the groups ( $p$ 's ranging between .027 and .0001). There were no differences in retention among the rest of the groups; Fig. 1C shows these results.

### Discussion

The deficiencies in performance seen when a footshock of 3.0 mA was given during training were also evident after single injections of 8 and 12 mg/kg of scopolamine, using 9.0 mA. However, when double injections were administered, overreinforcement (i.e., application of 9.0 mA during training) induced a significant improvement in performance, as all groups injected with scopolamine, regardless of the dose, had retention scores which did not differ from those of the not-treated group nor from those of the groups that were injected with 0 (isotonic saline solution) or 4 mg/kg of the drug before training.

These results lend support to the interpretation that the deficits in performance seen after single injections of the higher doses of the antimuscarinic drug were state-dependent, because when the pharmacological state of the brain was the same during training and retention testing (double injections) the animals showed good retention. This is in agreement with the early report by Gardner, Glick, and Jarvik (1972) where a dissociative effect of scopolamine was evident; these authors administered a high-intensity footshock during training (350 mA). Our results further suggest that such state dependency is centrally mediated, since the injection of methylscopolamine did not induce any modification in retention when the high footshock intensity was used during training. The data also support the conclusion that when the relatively low dose of scopolamine (4 mg/kg) (which produced a reliable degree of amnesia when animals had been trained

with 3.0 mA) was injected, overreinforcement protected against amnesia.

#### GENERAL DISCUSSION

The results of these experiments lend further support to the idea that central cholinergic activity is importantly involved in cognitive functions (Bartus et al., 1985; Fibiger, 1991; Overstreet, 1984; Prado-Alcalá, Fernández-Ruiz, & Quirarte, 1993; Warburton & Wesnes, 1984): blockade of muscarinic receptors prevented animals from displaying the conditioned response. This interference was both dose- and time-dependent and cannot be explained in terms of proactive effects of the scopolamine nor to state dependency (Experiment 1). Since the muscarinic antagonist was injected before training, the interference with performance could have been due either to a disturbance with the process of consolidation or with that of acquisition. It should be stressed that pretreatment with scopolamine did not induce any alterations with motor activity or with sensitivity to the footshocks needed for learning of passive avoidance (there were no significant differences among groups, in neither experiment, regarding latencies during training nor in escape latencies during shock administration).

Regarding the question of whether the lack of effect of scopolamine seen when animals are overreinforced is due to a lesser involvement of cholinergic activity in memory functions or to an accelerated consolidation process, the data derived from Experiment 2 suggest that the professedly protective effect of overreinforcement seen after the double injections of scopolamine was due to the interaction of the high doses of scopolamine with the high level of footshock, which induced a phenomenon of state dependency. This phenomenon did not allow for a clear demonstration of an accelerated rate of consolidation.

The fact that the dose of 4 mg/kg of scopolamine induced a reliable amnesic state when a footshock of low intensity was used, and that the same dose was ineffective in altering the conditioned response with a relatively high intensity of footshock, argues in favor of the hypothesis that under conditions of overreinforcement acetylcholine is not necessary for memory consolidation (Cruz-Morales et al., 1992; Durán-Arévalo et al., 1990). This hypothesis has received support from experiments where cholinergic blockade of the striatum induced marked memory deficits in passive avoidance (Giordano & Prado-Alcalá, 1986) and in positively reinforced tasks (Prado-Alcalá & Cobos-Zapataín, 1977; Prado-

Alcalá, Kaufmann, & Moscona, 1980). Cholinergic blockade of the striatum, however, was totally ineffective in altering performance of those tasks when animals were submitted to overreinforcement or overtraining, respectively. It thus seems that during an enhanced learning experience the cholinergic systems are not necessary for the development of memory consolidation nor for retrieval of stored learned information.

The lack of effect of muscarinic blockers on memory for passive avoidance trained with relatively high footshock intensities might reflect the consolidation of memory through central and peripheral events triggered by such increased aversive stimulation. Stressful situations, such as that produced during training of passive avoidance, induce the release of epinephrine from the adrenal medulla, and it has been shown that systemic injections of this hormone modulates retention (McGaugh, 1989). A dose of epinephrine that induces good retention of passive avoidance trained with a low footshock intensity produces similar plasma levels of epinephrine to those observed in rats trained with relatively high footshock intensities (Gold & McCarty, 1981; McCarty & Gold, 1981).

Another event that is related to stress is the level of plasma glucose, which varies according to footshock intensity used during training (Hall & Gold, 1986). Furthermore, injection of glucose after training improves retention of conditioned taste preference and a conditioned emotional response (Messier & White, 1984, 1987) and has dose- and time-dependent effects on retention of an inhibitory avoidance response (Gold, 1986).

To conclude, the present data: (a) confirm the amnesic effect induced by muscarinic blockade; (b) lend strong support to the hypothesis that the activity of central cholinergic systems are not necessary for memory consolidation when animals are exposed to an enhanced learning experience; (c) indicate that scopolamine may interact with relatively high footshock intensities to produce state dependency. In the case of passive avoidance, the augmented stress produced by overreinforcement induces central and peripheral hormonal responses that may mediate consolidation in conditions of cholinergic blockade.

#### REFERENCES

- Banmer, G. (1982). Pharmacological investigations of neurotransmitter involvement in passive avoidance responding: A review and some new results. *Neuroscience and Behavioral Reviews*, 6, 247-296.
- Bartus, R. T., Dean, R. L., Pontecorvo, M. J., & Flicker, C. (1985). The cholinergic hypothesis: A historical review, current per-

- spectives, and future directions. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **44**, 332-358.
- Bahdanecky, Z., & Jarvik, M. E. (1967). Impairment of one-trial passive avoidance learning in mice by scopolamine, scopolamine methylbromide, and physostigmine. *International Journal of Neuropharmacology*, **6**, 217-222.
- Calhoun, W. H., & Smith, A. A. (1968). Effects of scopolamine on acquisition of passive avoidance. *Psychopharmacologia (Berlin)*, **13**, 201-209.
- Cruz-Morales, S. E., Durán-Arévalo, M., Díaz del Guante, M. A., Quirarte, G., & Prado-Alcalá, R. A. (1992). A threshold for the protective effect of over-reinforced passive avoidance against scopolamine-induced amnesia. *Behavioral and Neural Biology*, **57**, 256-259.
- Dilts, S. L., & Berry, C. A. (1967). Effect of cholinergic drugs on passive avoidance in the mouse. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **158**, 279-285.
- Durán-Arévalo, M., Cruz-Morales, S. E., & Prado-Alcalá, R. A. (1990). Is acetylcholine involved in memory consolidation of over-reinforced learning? *Brain Research Bulletin*, **24**, 725-727.
- Fibiger, H. C. (1991). Cholinergic mechanisms in learning, memory and dementia: A review of recent evidence. *Trends in Neurosciences*, **14**, 220-223.
- Gardner, E. L., Glick, S. D., & Jarvik, M. E. (1972). ECS dissociation of learning and one-way cross-dissociation with physostigmine and scopolamine. *Physiology and Behavior*, **8**, 11-15.
- Giordano, M., & Prado-Alcalá, R. A. (1986). Retrograde amnesia induced by post-trial injection of atropine into the caudate-putamen: Protective effect of the negative reinforcer. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, **24**, 905-909.
- Gold, P. E. (1986). Glucose modulation of memory storage. *Behavioral and Neural Biology*, **45**, 342-349.
- Gold, P. E., & McCarty, R. (1981). Plasma catecholamines: Changes after footshock and seizure-producing frontal cortex stimulation. *Behavioral and Neural Biology*, **31**, 247-260.
- Goldberg, M. E., Sledge, K., Hefner, M., & Robichaud, R. C. (1971). Learning impairment after three classes of agents which modify cholinergic function. *Archives Internationales de Pharmacodynamie*, **193**, 226-235.
- Hall, J. L., & Gold, P. E. (1986). The effects of training, epinephrine, and glucose injections on plasma glucose levels in rats. *Behavioral and Neural Biology*, **46**, 156-167.
- McCarty, R., & Gold, P. E. (1981). Plasma catecholamines: Effects of footshock level and hormonal modulators of memory storage. *Hormones and Behavior*, **15**, 168-182.
- McGaugh, J. L. (1989). Involvement of hormonal and neuro-modulatory systems in the regulation of memory storage. *Annual Review of Neuroscience*, **12**, 255-287.
- Messier, C., & White, N. M. (1984). Contingent and non-contingent actions of sucrose and saccharin reinforcers: Effects on taste preference and memory. *Physiology and Behavior*, **32**, 195-203.
- Messier, C., & White, N. M. (1987). Memory improvement by glucose, fructose, and two glucose analogs: A possible effect on peripheral glucose transport. *Behavioral and Neural Biology*, **48**, 104-127.
- Overstreet, D. H. (1984). Behavioural plasticity and the cholinergic system. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, **8**, 133-151.
- Prado-Alcalá, R. A. (1985). Is cholinergic activity of the caudate nucleus involved in memory? *Life Sciences*, **37**, 2135-2142.
- Prado-Alcalá, R. A., & Cobos-Zapatin, G. G. (1977). Learning deficits induced by cholinergic blockage of the caudate nucleus as a function of experience. *Brain Research*, **138**, 190-196.
- Prado-Alcalá, R. A., Fernandez-Ruiz, J., & Quirarte, G. L. (1993). Cholinergic neurons and memory. In T. W. Stone (Ed.), *Aspects of synaptic transmission. 2. Acetylcholine, sigma receptors, CCK and eicosanoids, neurotoxins* (pp. 59-71). London: Taylor & Francis.
- Prado-Alcalá, R. A., Kaufmann, P., & Moscona, R. (1980). Scopolamine and KCl injections into the caudate-putamen: Overtraining-induced protection against deficits of learning. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, **12**, 249-253.
- Rush, D. K. (1988). Scopolamine amnesia of passive avoidance: A deficit of information acquisition. *Behavioral and Neural Biology*, **50**, 255-274.
- Siegel, S. (1956). *Nonparametric statistics for the behavioral sciences*. Tokyo: McGraw-Hill/Kogakusha.
- Warburton, D. M., & Wesnes, K. (1984). Drugs as research tools in Psychology: Cholinergic drugs and information processing. *Neuropsychobiology*, **11**, 121-132.



# Reversal of Extinction by Scopolamine

ROBERTO A. PRADO-ALCALÁ,\*<sup>1</sup> MARINA HAIEK,<sup>†</sup> SELVA RIVAS,\*  
 GABRIEL ROLDAN-ROLDAN\* AND GINA L. QUIRARTE<sup>‡</sup>

\*Physiology Department, Faculty of Medicine, National University of Mexico, Mexico, <sup>†</sup>School of Psychology, Anahuac University, Mexico, and <sup>‡</sup>Faculty of Psychology, University of Guadalajara, Mexico

Received 15 July 1993

PRADO-ALCALÁ, R. A., M. HAIEK, S. RIVAS, G. ROLDAN-ROLDAN AND G. L. QUIRARTE. *Reversal of extinction by scopolamine*. *PHYSIOL. BEHAV.* 56(1) 27-30, 1994. -- The aim of this experiment was to determine the effects of muscarinic blockade on extinction of passive avoidance conditioning. Rats were trained with a foot shock of 2.5, 3.0, or 6.0 mA and were tested for retention for 8 weeks (once weekly). Five minutes before the seventh test they were injected with 8 mg/kg scopolamine. The groups that had been trained with 2.5 and 3.0 mA showed extinction, which was reversed by the scopolamine; the overreinforced group (6.0 mA) did not show extinction and the scopolamine did not alter the conditioned response. The data support the hypothesis that extinction represents the learning of a new response sustained by a set of cholinergic neurons, different from that which mediated original passive avoidance learning.

Extinction    Learning    Passive avoidance    Acetylcholine    Scopolamine

BOTH systemic and intracerebral applications of drugs that interfere with cholinergic activity induce deficits in memory consolidation. It is also known that these treatments interfere with performance of previously learned behaviors [for reviews see (1,2,7,10,11,14), but see (12)]. These data give strong support to the hypotheses that acetylcholine-containing neurons of the brain are essential for the establishment of memory and for the retrieval of stored information.

There is, however, a conspicuous scarcity of reports concerning the involvement of acetylcholine in the process of extinction. If it is assumed that this neurotransmitter is necessary for the formation of memory as well as for performance of conditioned behaviors, then one would expect that injection of an anticholinergic drug would accelerate the process that induces an animal to stop responding when a reinforcer is no longer present (extinction). Alternatively, if extinction is viewed as the acquisition of a new habit that opposes the original habit (9), then an anticholinergic should induce a reinstatement of the original learned response because cholinergic blockade would interfere with the establishment of the new habit.

To discern between these two possibilities, rats were trained in a one-trial passive avoidance task, submitted to extinction, and then tested for retention under the influence of scopolamine.

## METHOD

### Animals

Eighty male Wistar rats weighing 250-350 g were used. They were individually housed in a temperature-controlled environment, and had free access to solid food and tap water in their

home cages. They were kept in these conditions starting at least 5 days before the experiment was initiated.

### Apparatus

Training and testing were carried out in a wooden box with two compartments of the same size (30 × 30 × 30 cm each), separated by a guillotine door. The lid of the compartments and the guillotine door were made of orange-colored lucite. The floor of one of the compartments was a grid made of aluminum bars (6 mm in diameter), separated 1.5 cm center-to-center. The V-shaped lateral walls of the second compartment were stainless steel, and each was continuous with half the floor; there was a 1.5-cm slot separating each half-floor. Thus, when in this compartment, the rats were in contact with both walls, which could be electrified using two of the 10 output lines of a stimulator that delivered scrambled constant current (BRS/LVE, model SGS-003). Illumination was provided by a 10-W light bulb located in the center of the lid of the gridded compartment. The conditioning box was located inside a dark, sound-deadening room, provided with background masking noise (BRS/LVE, model AU-902).

### Training and Testing

During training each animal was put inside the gridded compartment of the conditioning box; 10 s later the door between the compartments was opened and the latency to enter the darker (electrifiable) compartment with all four paws was measured. Once in the second compartment the door was closed and a foot shock was delivered through the stainless steel plates (foot shock

<sup>1</sup> Requests for reprints should be addressed to Dr. Roberto A. Prado-Alcalá, Physiology Department, Faculty of Medicine, National University of Mexico, P.O. Box 70-250, Mexico, D.F. 04510, Mexico.

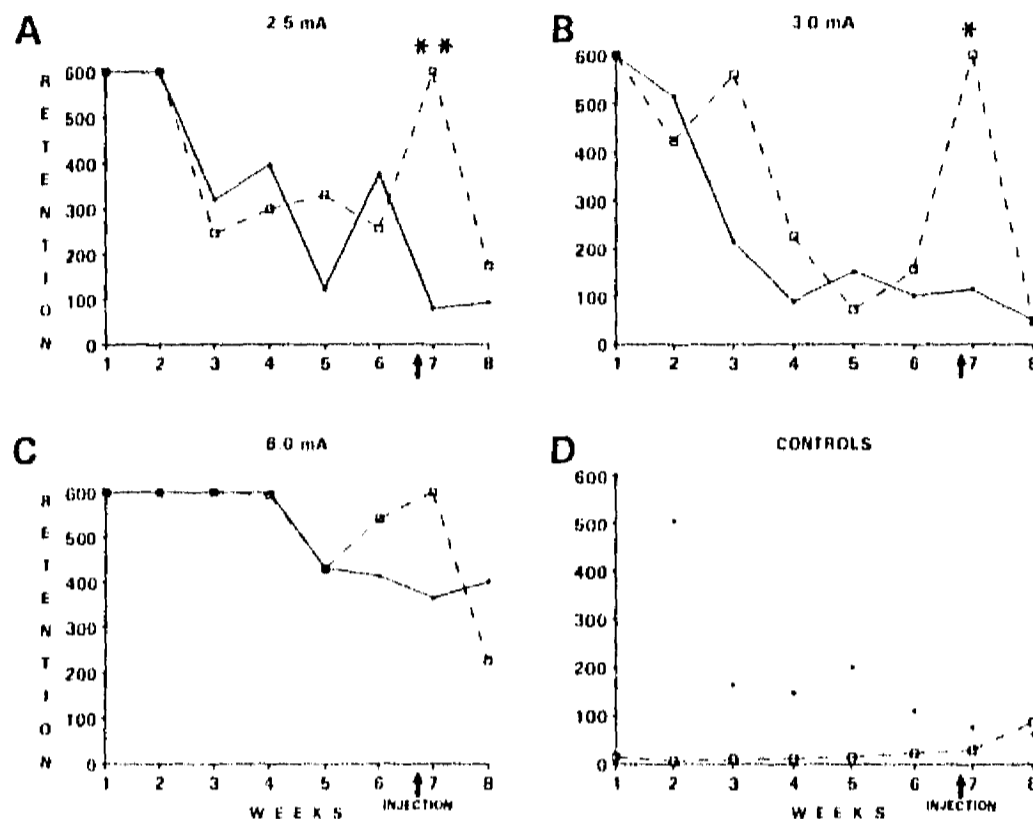


FIG. 1. Median retention scores of groups trained with 2.5 (A), 3.0 (B), and 6.0 mA (C), injected with isotonic saline solution (solid line) or 8 mg/kg of scopolamine (dashed line). (D) Retention scores of animals trained with 2.5 mA and injected with 8 mg/kg of methylscopolamine (dotted line) or with 0 mA and treated with 8 mg/kg of scopolamine (dashed line). All injections were administered 5 min before the retention session on the seventh week. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  relative to the previous session.

intensities will be specified below); after 5 s the door was reopened, thus allowing the animal to escape to the first compartment and to remain there for 30 s before being put back in its home cage. The foot shock was turned off when the animal escaped. One week later, and during 7 additional consecutive weeks, each rat was tested for retention (once every 7 days); these tests were programmed as the training session, except that: a) the foot shock was omitted, and b) as soon as the rat crossed to the shock compartment it was taken back to its home cage. If a rat did not cross within 600 s to the compartment where the shock had been given the session was ended and a score of 600 was assigned. A few animals showed retention scores of less than 500 during the first retention session; they were discarded and new animals were trained until there were 10 rats in each group.

#### Groups and Treatments

It has been reported that overreinforcement (i.e., application of relatively high intensities of foot shock during training) protects against amnesia induced by both systemic and intracerebral injections of muscarinic blockers (3,5,6,8). This phenomenon was interpreted in terms of a lesser involvement of acetylcholine in memory processes. For this reason it seemed important to study the effects of muscarinic blockade on the extinction of passive avoidance training using relatively low intensities of foot shock (2.5 and 3.0 mA), which had been shown to produce optimal learning (3) and a high intensity (6.0 mA) previously reported to counteract the amnesic effects of scopolamine (6).

For each intensity there were two groups of animals injected once with isotonic saline solution or with 8.0 mg/kg of scopolamine hydrobromide (Sigma), dissolved in isotonic saline solution. This dose of scopolamine was chosen because, in previous experiments conducted in our laboratory, it was found that 2.0 and 4.0 mg/kg did not produce reliable memory impairments, 6.0 mg/kg produced a 50% deficit in retention, and 8.0 and 12.0 mg/kg induced a profound amnesic state in the same avoidance task studied in the present work (6). Two additional groups were studied; one was trained with 2.5 mA and treated with 8.0 mg/kg of methylscopolamine (Sigma), and the other was not given a foot shock but was injected with 8.0 mg/kg of scopolamine. The injections were administered 5 min before the seventh test session (i.e., before the 49th day after training).

#### Statistics

Because of the 600 ceiling score imposed by the experimenters, the data derived from the retention tests were not distributed normally and did not allow for the use of parametric statistics. Independent Kruskal-Wallis analysis of variance (ANOVA) tests were used to compare retention latencies among the groups on each of the eight test sessions; when appropriate, the Mann-Whitney *U*-test was computed to compare retention scores between every combination of pairs of groups. The Friedman two-way ANOVA was computed on retention latencies across sessions for each group, followed, when appropriate, by the Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test (13).

FALLA DE ORIGEN

## RESULTS

Figure 1 shows that, as the number of retention sessions was increased, the groups trained with 2.5 mA [Fig. 1(A,D)] and 3.0 mA [Fig. 1(B)] exhibited a progressive decline in performance (extinction). In all of these cases, the decline in performance was statistically significant, as evidenced by the Friedman tests [ $Xr(7) = 21.68, p < 0.03$ ;  $Xr(7) = 16.98, p < 0.02$ ;  $Xr(7) = 29.93, p < 0.0002$ , respectively]. When the performance during the first week was compared against each of the rest of the weeks, it was found that this decrement in performance reached statistical significance between the third and fifth week of testing (all  $p$  ranging between 0.01 and 0.008; Wilcoxon test). In contrast, the two groups that had been trained with 6.0 mA (saline and scopolamine) never showed extinction [ $Xr(7) = 3.40, p > 0.8$ ;  $Xr(7) = 11.28, p > 0.1$ , respectively].

Figure 1(A-C) shows that during the seventh session the isotonic saline did not induce any change in behavior, relative to the previous session; on the other hand, the scopolamine produced a reversal of behavior of the groups that showed extinction, i.e., a significant increment in retention latency was seen in the 2.5 and 3.0 mA groups ( $t = 1.0, p = 0.008$  and  $t = 5, p = 0.039$ , respectively). Finally, the applications of methylscopolamine to animals trained with 2.5 mA, and of scopolamine to animals that did not receive a foot shock during training were without behavioral effects, as seen in Fig. 1(D). Regarding the performance of the latter group, there was a small, progressive enhancement in latency, which became significant on the seventh week of testing, compared with the test of the first week ( $t = 4, p = 0.007$ ).

Aside from the eighth session, significant differences among groups on each test session became evident (all  $p$  ranging between 0.0001 and 0.02; Kruskal-Wallis). Pairwise comparisons ( $U$ -test) demonstrated that on each of these sessions the group that was injected with scopolamine, but did not receive a foot shock during training, had a significantly lower score than each of the other groups (all  $p$  ranging between  $< 0.05$  and 0.0601), except that during the seventh session it did not differ reliably from the saline and methylscopolamine groups.

## DISCUSSION

A reversal of extinction was produced by the administration of scopolamine in animals trained with relatively low levels of foot shock. The various control manipulations allow attributing this effect to blockade of central muscarinic receptors. First, the manipulations derived from the injection procedure did not affect the conditioned response, as demonstrated by the retention scores of the animals injected with the saline solution; second, the administration of methylscopolamine, a cholinergic blocker that crosses the brain-blood barrier only with difficulty, was as innocuous as the saline injections; third, the increased retention latency induced by the scopolamine cannot be explained by some

debilitating motor interference because those animals that had been injected with this drug, but did not learn the task (0.0 mA group), showed very low latencies.

Regarding the groups of rats trained with the high foot shock intensity (6.0 mA), it is difficult to estimate if the scopolamine had any effect on the retention of the task, although it produced a small, but not significant, improvement in retention. Because of the ceiling on retention imposed by the experimenters during the retention tests (600 s), the lack of statistical differences across sessions does not necessarily mean that the antimuscarinic agent was ineffective.

As stated in the Introduction, administration of acetylcholine receptor blockers before retention testing of passive avoidance produces an interference with retrieval. Because of this, it would have been expected that scopolamine had induced an acceleration of extinction of the learned behavior; the opposite was true. As shown in Fig. 1, none of the foot-shocked groups achieved a total extinction of passive avoidance, even after 7 weeks of nonreinforcement, as evidenced by their scores, which were significantly higher than those of the 0 mA group. In other words, all foot-shocked groups were still performing the inhibitory response.

If, on the other hand, we consider extinction as a process where animals learn not to respond in a situation where the reinforcer is no longer present, then the effect of scopolamine can be readily explained. It is known that blockade of acetylcholine receptors disrupts acquisition, consolidation, and retrieval of passive avoidance (1,2,7,10,11,14). Thus, it can be argued that the animals were still learning the new response (extinction), and that the scopolamine interfered with the retrieval of this response, which was being mediated by a new set of acetylcholine-containing neurons, i.e., a set different from the one mediating passive avoidance responding.

To put it another way, if the anticholinergic drug had interfered with retrieval of the passive avoidance response, then the retention latencies should have been reduced; on the other hand, if the treatment had impaired the new conditioned response (extinction), then an increment in latency should have been observed. The latter was the case. Because acetylcholine-containing neurons are involved in acquisition, consolidation, and retrieval of passive avoidance, it follows that a different set of cholinergic cells must be involved in extinction of this same conditioned response. This latter idea had been put forward by Deutsch more than 20 years ago (4). New experiments are underway to determine the nature of cholinergic involvement in this important mnemonic process.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Supported by DGAPA and PADEP (UNAM). These results were originally presented at the Second Annual International Behavioral Neuroscience Society Conference held in Clearwater Beach, FL, April 22-25, 1993.

## REFERENCES

1. Bammer, G. Pharmacological investigations of neurotransmitter involvement in passive avoidance responding: A review and some new results. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 6:247-296, 1982.
2. Bartus, R. T.; Dean, R. F.; Pomercorvo, M. J.; Flicker, C. The cholinergic hypothesis: A historical overview, current perspectives, and future directions. *Ann. NY Acad. Sci.* 44:332-358, 1985.
3. Cruz-Morales, S. E.; Durán-Arévalo, M.; Díaz del Guante, M. A.; Quirarte, G.; Prado-Alcalá, R. A. A threshold for the protective effect of over-reinforced passive avoidance against scopolamine-induced amnesia. *Behav. Neural Biol.* 57:256-259, 1992.
4. Deutsch, J. A. The cholinergic synapse and the site of memory. *Science* 174:788-794, 1971.
5. Díaz del Guante, M. A.; Rivas-Arancibia, S.; Quirarte, G.; Prado-Alcalá, R. A. Over-reinforcement protects against memory deficits induced by muscarinic blockade of the striatum. *Bol. Estud. Med. Biol. Méx.* 38:49-53, 1990.

6. Durán-Arévalo, M.; Cruz-Morales, S. E.; Prado-Alcalá, R. A. Is acetylcholine involved in memory consolidation of over-reinforced learning? *Brain Res. Bull.* 24:725-727; 1990.
7. Fibiger, H. C. Cholinergic mechanisms in learning, memory and dementia: A review of recent evidence. *Trends Neurosci.* 14:220-223; 1991.
8. Giordano, M.; Prado-Alcalá, R. A. Retrograde amnesia induced by post-trial injection of atropine into the caudate-putamen. Protective effect of the negative reinforcer. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 24:905-909; 1986.
9. Miller, N. E.; Stevenson, S. S. Agitated behavior of rats during experimental extinction and a curve of spontaneous recovery. *J. Comp. Psychol.* 21:231-250; 1936.
10. Overstreet, D. H. Behavioural plasticity and the cholinergic system. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 8:133-151; 1984.
11. Prado-Alcalá, R. A.; Fernández-Ruiz, J.; Quirarte, G. L. Cholinergic neurons and memory. In: Stone, T. W., ed. *Synaptic transmission*, vol. 2. London: Taylor and Francis Ltd, 1993:57-69.
12. Rush, D. K. Scopolamine amnesia of passive avoidance: A deficit of information acquisition. *Behav. Neural Biol.* 50:255-278; 1988.
13. Siegel, S. *Nonparametric statistics for the behavioral sciences*. Tokyo: McGraw-Hill Kogakusha, Ltd; 1956.
14. Warburton, D. M.; Wesnes, K. Drugs as research tools in psychology: Cholinergic drugs and information processing. *Neuropsychobiology* 11:121-132; 1984.



