

01985



**Universidad Nacional Autónoma de
México**

Facultad de Psicología

Programa de Maestría y Doctorado en Psicología

**Efecto de la inactivación reversible del hipocampo
dorsal sobre la retención de una tarea condicionada
aversivamente.**

Tesis que para obtener el grado de
Doctor en Psicología presenta:

César Ricardo Quiroz Molina

Proyecto desarrollado en el Instituto de Neurobiología de la
Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla,
Querétaro.

Bajo la dirección del Dr. Roberto A. Prado Alcalá.

Comité Tutorial: Dra. María Corsi Cabrera
 Dra. Martha Escobar Rodríguez
 Dra. Thalía Harmony Baillet
 Dra. Feggy Ostrosky Shejet
 Dr. Oscar Prospero García
 Dr. Gabriel Roldán Roldán

Proyecto apoyado por DGAPA-PAPIIT y CONACYT

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Cesar Ricardo

Queroz Molina

FECHA: 31 / Mayo / 2004

FIRMA: [Firma]

**memoria. Potencia del alma, por
medio de la cual se retiene
y recuerda el pasado.**

Diccionario de la Lengua Española.
Real Academia Española, 1992.

CONTENIDO

RESUMEN	3
Abstract	4
INTRODUCCIÓN	5
La memoria de corto plazo y de largo plazo	7
El Hipocampo y la consolidación de la memoria en la tarea de evitación inhibitoria	10
La consolidación de la memoria con estímulos intensos	13
Cambios sinápticos asociados a la formación de la memoria	16
SECCIÓN EXPERIMENTAL	19
Objetivos	19
Consideraciones metodológicas	20
MÉTODO	23
Experimento 1	23
Sujetos	23
Aparatos	25
Procedimiento	26
Sesión de entrenamiento	26
Sesión de Retención	27
Tratamientos	27
Diseño	28
Análisis Histológico	28
Estadística	29
Experimento 2	30
Sujetos	30
Diseño	30
Tratamientos	30
Procedimiento inmunohistoquímico	32
Análisis histológico	33
Experimento 3	34
Sujetos	34
Procedimiento	34
Diseño	37
Estadística	37
RESULTADOS	38
Experimento 1	38
Experimento 2	41
Experimento 3	43
DISCUSIÓN	52
Alto choque e inactivación del hipocampo	52
Retención medida 30 minutos después del entrenamiento	53
Cambios en la expresión de sinaptofisina	58
Implicaciones de los resultados en la práctica psicológica	64
Conclusiones	67
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

RESUMEN

El entrenamiento con un estímulo aversivo intenso suprime las deficiencias producidas por tratamientos que inducen amnesia retrógrada en tareas reforzadas negativamente, hecho que sugiere la existencia de más de un mecanismo de consolidación de la memoria. Se ha demostrado que bajo condiciones de entrenamiento intenso, la consolidación no se deteriora cuando se lesionan o se inactivan farmacológicamente estructuras relevantes para su formación, tales como el núcleo caudado, la amígdala y la sustancia negra. Sin embargo, no se ha demostrado si la actividad del hipocampo puede ser prescindible para la consolidación bajo estas condiciones de entrenamiento. Los objetivos de este estudio son definir la relevancia del hipocampo en la consolidación de la memoria bajo condiciones de entrenamiento intenso y conocer si este tipo de entrenamiento produce cambios en la densidad de las sinapsis en los campos CA1 y CA3 de la región dorsal del hipocampo. Para el primer objetivo, se trabajó con un total de 76 ratas divididas en 8 grupos independientes. Los animales fueron entrenados con choques de baja (0.8 mA) o alta (1 mA) intensidad en la tarea de evitación inhibitoria de un ensayo. Cinco minutos después del entrenamiento se inyectó el inactivador reversible tetrodotoxina (TTX; 10 ng/ μ l), o su vehículo a través de cánulas previamente implantadas dirigidas a la región dorsal del hipocampo. La latencia de retención fue medida 30 min y 48 h después del entrenamiento. Los animales entrenados con 0.8 mA e inyectados con TTX mostraron un cuadro amnésico 48 hr después del entrenamiento. En contraste, los animales entrenados con 1 mA e inyectados con TTX no mostraron amnesia. Adicionalmente, para conocer la extensión de tejido inactivado por la TTX y la duración de su efecto, se realizó un ensayo inmunohistoquímico contra c-fos en la región dorsal del hipocampo, 30 min, 90 min y 48 hr después de la inyección de la toxina. Para el segundo objetivo, se entrenaron dos grupos de ratas sin tratamiento con las dos intensidades de choque eléctrico mas sus respectivos grupos control y se realizó un ensayo inmunohistoquímico contra la proteína asociada a las sinapsis, sinaptofisina. Su nivel se midió en dos regiones del hipocampo dorsal y se comparó entre los grupos. En el grupo entrenado con 0.8 mA se encontró un incremento significativo en la expresión de sinaptofisina con respecto a su control. En el grupo entrenado con 1 mA no se encontraron diferencias con respecto a su control. No se encontraron diferencias en la expresión de sinaptofisina en CA1 en ninguno de los grupos. Los resultados de este proyecto sugieren que el papel del hipocampo en la consolidación de la memoria cambia dependiendo de la intensidad del entrenamiento, tal como sucede con otras estructuras involucradas en la formación de la memoria. La formación de la memoria está asociada a cambios en la densidad de las sinaptofisina en el hipocampo dorsal dependiendo de la intensidad del entrenamiento.

Abstract

The training with a strong aversive stimulation protects against the deficits induced by some treatments that produce retrograde amnesia in negatively reinforced tasks. This fact suggests that there is more than one way to form the memories with the same kind of contents. With high levels of training, the deficits in memory produced by lesioning or inactivating brain structures such as substantia nigra, caudate putamen or the amygdala, cannot be seen. So far, the protective effect of enhanced training has not been described after interfering with hippocampal functioning. Hence, the aim of this study was to define the role of the hippocampus in the consolidation of memory when high levels of reinforcement are used in training. Additionally, we wanted to know if there are changes in the expression of synaptophysin in hippocampal fields CA1 and CA3 related to the level of training. For the first goal, 76 rats divided in 8 groups were used. The rats were trained with high (1 mA) or low (0.8 mA) current intensity of foot-shock in the passive avoidance task and 5 min after training, injected into the dorsal hippocampus with tetrodotoxin (TTX, 10 ng/ μ l) or vehicle solution through guide cannulae previously implanted. The retention latency was measured 30 min and 48 h after training. All the groups of rats tested 30 m after training showed good retention. The group trained with 0.8 mA, injected with TTX and tested 48 h after training, showed, as expected, an impairment in retention. Most significantly, the group trained with 1 mA, injected with TTX and tested 48 after training, did not have any impairment in the retention test. For the second goal, in four independent groups of rats, (two groups trained with high or low current intensity of foot-shock and two foot-shocked control groups), the levels of the associated synaptic vesicle protein, synaptophysin, were measured in CA1 and CA3 hippocampal fields. In the group trained with low foot-shock intensity, an increase of the synaptophysin immunoreactive dots in CA3 was found, relative to the foot-shocked control group. No differences in CA3 were found between trained and untrained groups of rats exposed to high level of foot-shock. No differences in the level of synaptophysin were found among groups in CA1. These results show that the hippocampus can be included in the group of structures which role in the consolidation process changes depending upon training intensity. This change of role has a close relationship with changes in the levels of synaptophysin in the dorsal hippocampus.

INTRODUCCIÓN

El aprendizaje es la capacidad de los organismos para cambiar su comportamiento futuro auxiliándose de la experiencia. Ello implica que de alguna forma se crea en el organismo la representación de los eventos ocurridos en el pasado. Esa representación persiste y eventualmente, es traducida en estrategias conductuales que suelen favorecer la supervivencia del organismo en cuestión. La persistencia de esta representación de los hechos del pasado es la memoria. El estudio científico de la memoria intenta conocer cuál es la naturaleza de esa representación, cómo se forma, cómo se mantiene y bajo qué condiciones se traduce en comportamiento.

En la búsqueda para entender cómo se crea y se mantiene la memoria, se han encontrado múltiples correlaciones entre su formación y algunos cambios funcionales y estructurales en el sistema nervioso, tales como modificaciones de la eficiencia sináptica, incremento en el número de receptores a neurotransmisores o la expresión de nuevas proteínas, por citar algunos ejemplos generales. Lo que se delinea con estos hallazgos es que cada nuevo aprendizaje reorganiza el conjunto de elementos en el sistema nervioso que permiten el mantenimiento y la expresión de la memoria.

Para lograr una aproximación clara al estudio de este proceso es importante señalar que, como resultado de una investigación extensa, ha sido posible establecer que la memoria posee características especiales, distintivas y claramente reproducibles que dependen tanto del tipo de contenido que es representado, como del momento en el cual se observan sus manifestaciones.

El hablar de las manifestaciones de la memoria, de la representación de los contenidos, de la memoria como fenómeno y otras formas de expresar ambiguamente lo que significa la memoria se justifican porque la memoria es particularmente difícil de estudiar como algo que puede localizarse en un espacio y para el que corresponde un almacén permanente. Probablemente es mas adecuado referirse a ella como algo que ocurre en el tiempo y sólo se

manifiesta en situaciones particulares. Como la mayoría de los procesos psicológicos que han sido objeto de estudio científico, la necesidad inherente al método de contar con una definición clara y concisa (sin que por ello sea necesariamente correcta), ha motivado la aparición de un enfoque reduccionista que aparenta simpleza e ingenuidad.

Esta aparente simplificación del estudio de la memoria, sin embargo, ha obtenido resultados alentadores al intentar explicar fenómenos de la memoria que se conocían desde que comenzó su estudio sistemático en el siglo XIX y que, aunque se encuentran descritos con gran detalle, no contaban con una explicación satisfactoria. Dos de estos fenómenos que cabe citar como ejemplo son, por una parte, la descripción de la memoria de corto y largo plazo como un proceso lineal y por otra parte, la interferencia.

Al estudiar el papel que diferentes estructuras y mecanismos de neurotransmisión juegan en el proceso de consolidación, debe tenerse presente que la participación de las estructuras cerebrales involucradas varía a través del tiempo y de la modalidad de memoria requerida para la exitosa ejecución de ciertas tareas (Ambroggi *et al.*, 1999). Con el objeto de lograr una aproximación clara al estudio del papel que desempeñan las estructuras en la consolidación, este proyecto se circunscribió al estudio de la memoria implicada en la tarea de evitación inhibitoria de un ensayo, que se describe en el método.

La memoria de corto plazo y de largo plazo

En el plano temporal, la primera clasificación con respecto a los diferentes tipos de memoria se hace entre la formación y mantenimiento de la memoria en los minutos u horas siguientes al evento de aprendizaje -en cuyo caso se le llama memoria de corto plazo-; y la formación y mantenimiento durante horas, días o eventualmente durante el resto de la vida, recibiendo entonces la denominación de memoria de largo plazo.

Esta clasificación no se ha establecido de forma arbitraria. El estudio sistemático de la capacidad para formar nuevos recuerdos y mantener los ya formados en una amplia gama de modelos humanos, animales y celulares ha demostrado que los organismos se sirven de diferentes sustratos para crear y mantener la memoria dependiendo del tiempo transcurrido desde que sucede el evento que origina la persistencia del cambio en el comportamiento.

Kandel (2001) resume que los cambios moleculares de los organismos para formar la memoria de corto y largo plazo, se encuentran conservadas desde los invertebrados hasta los mamíferos y en cada caso se involucra una modificación de la eficiencia sináptica. Los cambios de esta eficiencia sináptica a corto plazo involucran la modificación de proteínas preexistentes en conexiones sinápticas ya formadas. Por su parte, los cambios a largo plazo involucran la activación de la expresión de genes, la síntesis de nuevas proteínas, la formación de nuevas conexiones o la reorganización de las existentes. Mientras la formación y el mantenimiento de la memoria de corto plazo puede utilizar una amplia variedad de transmisores dependiendo tanto del contenido de esa representación como de los elementos del sistema nervioso que se activan en función de ese contenido, la formación de la memoria de largo plazo parece utilizar preferente -pero no exclusivamente- la vía de señalización intracelular que comprende la proteína-cinasa dependiente de AMP cíclico (PKA), la proteína-cinasa activada por mitógenos (MAPK) y la proteína *Cyclic AMP Response Element Binding* (CREB-1).

Una línea de investigación seguida por Izquierdo y sus colaboradores, adicionalmente aporta evidencia para demostrar que en el hipocampo la memoria posee al menos tres formas de mantenerse y evocarse, dependiendo del tiempo transcurrido desde una experiencia concreta de aprendizaje (Izquierdo *et al.*, 1999).

Para éste y otros investigadores (Goldman-Rakic, 1996) y con la evidencia de sus trabajos como sustento, la memoria de trabajo o de muy corto plazo ocurre gracias a procesos cualitativamente diferentes tanto de los que mantienen a la memoria de corto plazo como de los que corresponden a la formación de la memoria de largo plazo.

A su vez, el mantenimiento y la formación de la memoria de corto plazo, y la memoria de largo plazo son dos procesos que pueden desarrollarse de forma independiente. Este último hecho se ha sugerido a partir de los resultados experimentales en los que, administrando el agonista de los receptores serotoninérgicos 5-HT_{1a}, DPAT, en la región CA1 del hipocampo o el antagonista de este mismo receptor, NAN-190, en la corteza entorrinal, puede inhibirse la expresión de la memoria de corto plazo permitiendo el establecimiento y la evocación de la memoria de largo plazo (Izquierdo *et al.*, 1998, 1999). Esta aparente disociación entre ambos procesos también se observa al administrar el agonista de los receptores a GABA_A, musimol, o el antagonista de receptores de glutamato tipo AMPA, en la corteza entorrinal.

La hipótesis de que la formación de la memoria de largo plazo es dependiente de la síntesis de nuevas proteínas, ha sido apoyada por resultados obtenidos en experimentos en los que se han estudiado tanto tareas apetitivas (Hernández *et al.*, 2002) como aversivas (Meiri y Rosenblum, 1999, Quevedo *et al.*, 1999,). En ambos tipos de tarea, se observa una deficiencia en las pruebas de retención al bloquear la síntesis de proteínas después del entrenamiento o al bloquear la síntesis de RNAm. (Igaz *et al.*, 2002). Cabe destacar aquí que la administración del inhibidor de la síntesis de proteínas anisomicina en diferentes regiones del cerebro de la rata se hizo en concordancia con la

participación conocida de estas regiones cerebrales en la formación de la memoria para cada tipo de tarea; el núcleo acumbens para las tareas apetitivas autorreforzadas o el hipocampo para las tareas espaciales y asociativas.

El Hipocampo y la consolidación de la memoria en la tarea de evitación inhibitoria

Numerosos estudios señalan al hipocampo, en mamíferos, como una estructura clave para la consolidación de la memoria de tareas espaciales (Jarrard, 1993; Moser *et al.*, 1993, Kandel, 2001).

Adicionalmente, existe clara evidencia de que el hipocampo participa también en la consolidación de la memoria en ciertas tareas asociativas. Cabe citar entre estas tareas asociativas el condicionamiento aversivo presente en el miedo condicionado contextualmente (Kim y Fanselow, 1992) y la adquisición de respuestas condicionadas cuando existe un intervalo entre el estímulo incondicionado y el condicionado (paradigma *huella*, Thompson y Kim, 1996).

El hipocampo también está estrechamente implicado en la consolidación de tareas asociativo-instrumentales (Eichenbaum, 1996). Una de las pruebas conductuales que involucran esta habilidad es la tarea de evitación activa, que no puede ser aprendida por ratas en las que se inactiva reversiblemente el hipocampo con el bloqueador reversible de canales de sodio tetrodotoxina (TTX) (Cimadevilla *et al.*, 2000).

Otra tarea de tipo asociativo-instrumental es la tarea de evitación inhibitoria, que no puede ser retenida eficazmente por ratas en las que se han lesionado los campos CA1 o CA3 del hipocampo con ácido kaínico (Stubley-Weatherly *et al.*, 1996; Martínez *et al.*, 2002), o en las que se ha lesionado la región dorsal del hipocampo con ácido iboténico (Gisquet-Verrier *et al.*, 1999).

La retención de esta tarea también se deteriora al inyectar en el hipocampo TTX inmediatamente después de la sesión de entrenamiento (Lorenzini *et al.*, 1996; 1997). Avanzando en la especificidad de las herramientas farmacológicas utilizadas, ocurre el mismo deterioro en la retención cuando se inyectan bloqueadores de las vía de señalización que involucran la síntesis de AMPc, tales como el antagonista de los receptores D1/D5, SCH 23390

(Bernabeu *et al.*,1997) o el bloqueador de los receptores metabotrópicos a glutamato, MCPG (Bianchin *et al.*,1994).

La interrupción de la cascada de señales que dependen del AMPc en el hipocampo, tal como sucede al administrar el bloqueador de la proteína-cinasa dependiente de AMPc (PKA), KT-5720, produce igualmente un deterioro en la retención de esta tarea (Bernabeu *et al.*,1997). La interferencia con la actividad de la MAPK por medio del antagonista PD-098059 en el hipocampo, en un rango de 180 minutos posterior al entrenamiento, también provoca una pérdida significativa de la retención cuando ésta se mide 24 horas después (Walz *et al.*, 2000). Por el contrario, la activación de los receptores D1/D5 o la estimulación de la vía del AMPc en el hipocampo tanto con el análogo 8Br-cAMP como con forskolina, promueve una ejecución más eficiente (Bernabeu *et al.*,1997). Adicionalmente, el entrenamiento en esta tarea produce un incremento en la densidad de receptores AMPA, (Cammarota *et al.*,1995) y de receptores muscarínicos M1 (Ortega *et al.*,1996), cuantificado en ambos casos a través de la incorporación de un agonista marcado radiactivamente.

No obstante el gran cúmulo de trabajos que señalan la existencia de una fuerte correlación entre los cambios electrofisiológicos en diferentes regiones del hipocampo, como la potenciación a largo plazo (LTP), la síntesis de proteínas que modifican la eficacia sináptica y la presencia del fenómeno de consolidación de la memoria (Kandel, 2001), varias excepciones significativas a este esquema (Eichenbaum *et al.*,1992, Nosten-Bertrand *et al.*,1996; Zamanillo *et al.*,1999; Hölscher, 1999; Zhang *et al.*,2002), hacen notar que no es posible aún establecer con claridad cómo se reorganizan las diferentes estructuras cerebrales para que la memoria de corto plazo se consolide y se transforme en memoria de largo plazo.

La consolidación de la memoria depende de un equilibrio neuroquímico que puede alterarse experimentalmente de diferentes formas y ello puede conducir a una retención más pobre o más eficiente. En última instancia, algunos tratamientos podrían inhibir o promover los cambios estructurales que se cree que están estrechamente asociados a la formación de la memoria de largo

plazo, tales como la síntesis de nuevos receptores (Ortega *et al.*, 1996), la aparición de nuevas espinas dendríticas y ramificación de los procesos neuronales en el hipocampo (Ramírez-Amaya *et al.*, 1999) o el incremento de sinapsis específicas en la corteza (Fox *et al.*, 2000).

La facilitación de algunos sistemas de neurotransmisión que actúan como moduladores en este proceso (especialmente el sistema colinérgico)-, promueven una consolidación más eficiente, que puede medirse por la retención a largo plazo de una tarea.

En contraste, cuando se administran en el estriado bloqueadores de la actividad colinérgica durante el período inmediato posterior al entrenamiento, que corresponde al tiempo durante el cual se lleva a cabo la consolidación, la retención a largo plazo (entre 24 y 48 horas) de una tarea condicionada aversivamente se ve disminuida (Prado-Alcalá, 1985). La lesión en el sistema colinérgico por medio de inmunotoxinas también produce profundas alteraciones en la habilidad de las ratas para adquirir tareas que pueden agruparse como asociadas a una recompensa y en la memoria de trabajo o de muy corto plazo (Kitabatake *et al.*, 2003).

El mismo efecto amnésico se observa al bloquear otros sistemas de neurotransmisión en diversas estructuras, hecho que ha permitido esbozar un mapa de la participación del sistema o estructura manipulada en la consolidación de esta tarea concreta (Izquierdo *et al.*, 1997; Ambrogui *et al.*, 1999).

La consolidación de la memoria con estímulos intensos

Al esquema de la consolidación de la memoria descrito anteriormente, deben añadirse elementos adicionales a raíz de la serie de hallazgos experimentales que demuestran que cuando la intensidad del entrenamiento se incrementa, no se expresa el efecto amnésico que produce el bloqueo temporal o la lesión permanente de diferentes estructuras y sistemas de neurotransmisión que participan en la formación de la memoria. En humanos que sufren una lesión en el hipocampo, el incremento en el número de presentaciones de una imagen para ser recordada, tanto individualmente como en asociación con otra imagen, aumenta también el número de aciertos en la prueba de retención (Stark *et al.*, 2002). Estos hechos sugieren que en condiciones de entrenamiento intenso, los mecanismos implicados en la consolidación son diferentes a los que se ponen en marcha cuando el entrenamiento es de menor intensidad (Prado-Alcalá, 1995). Esta aparente convergencia de sistemas de neurotransmisión adicionales al sistema colinérgico no ocurre de forma gradual al incrementar la intensidad del entrenamiento. En el caso del bloqueo de los receptores muscarínicos, la recuperación del proceso de consolidación se establece de forma abrupta después de alcanzar un umbral de intensidad de choque en el entrenamiento (Cruz-Morales *et al.*, 1992). Adicionalmente, existen reportes que indican la participación simultánea por lo menos de un sistema adicional al colinérgico cuando se entrena a ratas con un estímulo aversivo poco intenso (Quirarte *et al.*, 1993), lo que sugiere que existe un umbral para respaldar la actividad colinérgica que depende de la intensidad de la experiencia de aprendizaje. Por debajo y por arriba de este umbral, el sistema colinérgico del cerebro puede estar inactivo y aún así, la memoria logrará consolidarse. (Prado-Alcalá, 1995).

La posible reorganización de los sistemas implicados en la consolidación de la memoria cuando se sobreentrena a ratas y gatos se ha demostrado desde hace muchos años en tareas condicionadas instrumentalmente, reforzadas

tanto positiva (Prado-Alcalá *et al.*, 1978; Prado-Alcalá y Cobos-Zapíaín, 1977) como negativamente (Giordano y Prado-Alcalá, 1986).

Este efecto es mas notable cuando se considera que el tiempo necesario para entrenar a los animales no varía en el caso del entrenamiento en tareas como la evitación inhibitoria. Rassnick *et al.*, (1998) y Passerin *et al.* (2000) compararon la activación producida por uno o varios choques eléctricos y la activación producida por la inyección de la hormona liberadora de corticotropina utilizando *c-fos* como marcador de actividad, encontrando una elevada coincidencia entre ambos tipos de estímulo. De esta forma, la activación intensa del eje hipotálamo-hipofiso-adrenal y de la amígdala cuando se entrena a las ratas en esta tarea (McGaugh *et al.*, 1996) dispara un mecanismo de consolidación diferente con respecto al que el cerebro utiliza en el caso del entrenamiento con un estímulo aversivo no muy intenso. Esto ocurre aún si el tiempo durante el cual el entrenamiento tiene lugar es similar. Este mecanismo de consolidación potenciado por el estrés además de activar, como ya se mencionó, el eje adreno-cortical, se encuentra asociado a un incremento significativo en los niveles de serotonina del hipocampo (Liu *et al.*, 1999).

Estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado que la retención de las tareas aprendidas con un entrenamiento intenso no se abate cuando se aplican en el núcleo caudado antagonistas colinérgicos minutos después de la sesión de adquisición, que en condiciones de entrenamiento con estímulos aversivos poco intensos inducen un cuadro amnésico (Giordano y Prado-Alcalá, 1986). Otros tratamientos amnésicos ensayados que consisten en el bloqueo de la actividad colinérgica de forma sistémica (Cruz-Morales *et al.*, 1992; Durán-Arévalo *et al.*, 1990; Quirarte *et al.*, 1993), permiten sugerir que el sistema colinérgico no participa de forma exclusiva en la consolidación de la memoria cuando existe un entrenamiento intenso. El bloqueo GABAérgico en la *sustantia nigra* tampoco produce déficits en la retención con este tipo de entrenamiento (Cobos-Zapíaín *et al.*, 1996). Los efectos amnésicos producidos por tratamientos neurotóxicos en la amígdala no siempre pueden ser superados por el entrenamiento intenso en tareas aversivas (Maren, 1998), pero se ha demostrado que en la tarea de evitación inhibitoria, éste sí reduce el

cuadro amnésico (Parent *et al.*, 1995). La lesión neurotóxica producida por ácido kaínico en el campo CA1 del hipocampo dorsal, produce deterioro en la retención de la tarea de evitación inhibitoria (Martínez *et al.*, 2002) pero no se conoce si el entrenamiento con un estímulo aversivo más intenso permite la consolidación de la memoria aún cuando el hipocampo se encuentre inactivo.

Cambios sinápticos asociados a la formación de la memoria

La región CA1 del hipocampo dorsal posee un importante papel en la recuperación de la memoria en la tarea de evitación inhibitoria: la lesión con ácido kaínico de esta zona produce déficits en la retención de la tarea cuando ésta es medida 24 horas después del entrenamiento, pero no en la retención a corto plazo (Martínez *et al.*, 2002). De forma similar, tanto el bloqueo colinérgico como el de los receptores dopaminérgicos D1 en esta área produce un deterioro en la evocación, aún si la tarea ya está consolidada (Barros *et al.*, 2001).

Si el entrenamiento intenso cambia la forma en la que el hipocampo se relaciona con otras estructuras para que la consolidación de la memoria sea posible, ¿cuál es la naturaleza de ese cambio? Los estudios que persiguen establecer una correlación entre los cambios estructurales en las sinapsis de CA1 asociados a tareas de aprendizaje dependientes del hipocampo, han encontrado únicamente cambios muy sutiles a nivel ultraestructural (Rusakov *et al.*, 1997) o han recurrido a diseños experimentales indirectos, tales como la asociación entre ambientes enriquecidos, aprendizaje eficiente y cambios estructurales en las espinas dendríticas (Moser *et al.*, 1994). No obstante, se ha demostrado la existencia de una correlación entre la intensidad de la expresión de sinaptofisina en el área CA3 del hipocampo y el desempeño en una tarea de aprendizaje espacial, aunque estas diferencias son más acusadas en ratas viejas (Smith *et al.*, 2000).

En la región del hipocampo donde sí se ha encontrado evidencia de posibles cambios estructurales asociados con el entrenamiento en tareas espaciales, es en el campo CA3, medido como el incremento del área reactiva a la tinción de Timm, que tiñe las fibras musgosas de esta región a partir de una reacción que detecta la presencia de zinc (Ramírez-Amaya *et al.*, 1999; Ramírez-Amaya *et al.*, 2001). Utilizando la tarea de evitación inhibitoria, O'Connell *et al.* (1997) describieron un incremento en células hiperromáticas teñidas con toluidina en la cresta dorsal del giro dentado del hipocampo en ratas entrenadas

comparadas con ratas a las que se aplicó un choque eléctrico de la misma intensidad. Este cambio fue más significativo entre 5 y 7 horas después del entrenamiento. La toluidina tiñe los ribosomas, por lo tanto, un aumento en la intensidad del colorante incorporado indirectamente indica un aumento en la actividad de síntesis de proteínas. Sin embargo, debe destavarse que ésta es evidencia indirecta y no necesariamente se relaciona con cambios estructurales en el hipocampo.

Otro grupo de trabajos han relacionado directamente a la formación de la memoria la expresión del gen temprano *c-fos* en esta región del hipocampo (He *et al.*, 2002) y la expresión de *c-fos* junto con un incremento significativo de la forma fosforilada de CREB (Colombo *et al.*, 2003). En ambos casos, estos cambios son interpretados como la evidencia de la síntesis de proteínas como consecuencia del evento de aprendizaje y que al mismo tiempo puede ser el sustrato necesario para que el cambio en el comportamiento generado por la experiencia de aprendizaje persista.

Siguiendo la línea de la detección de la expresión de genes tempranos asociada al aprendizaje como prueba de los cambios estructurales que sustentan la memoria, Guzowsky *et al.*, (2001) reportaron la expresión diferencial entre *Arc* y *c-fos*, dos genes reguladores de la transcripción y el gen *zif-268* que modula algunas funciones celulares específicas, dependiendo del entrenamiento en una tarea espacial.

Otros estudios abordan masivamente la búsqueda de los cambios en la expresión de proteínas (y de los genes que regulan esa expresión), asociados al aprendizaje, haciendo posible restringir la búsqueda de los elementos estructurales que participan en la formación de la memoria. Cavallaro *et al.* (2002) expusieron una aproximación metodológica para utilizar estas herramientas en el estudio del aprendizaje y la memoria. Con esta estrategia, reportaron un perfil de expresión en el hipocampo y el cerebelo asociado al condicionamiento clásico del reflejo palpebral en conejos (Cavallaro *et al.*, 2001), en el hipocampo asociado al entrenamiento en la tarea de laberinto acuático de Morris (Cavallaro *et al.*, 2002a) y a la tarea de evitación inhibitoria

(Cavallaro *et al.*, 2003), siendo estos dos últimos trabajos de especial interés en el contexto del presente trabajo, puesto que en el primer caso se reportan los cambios encontrados a partir de una tarea de aprendizaje en la misma estructura en la que la presente tesis se concentra y en el segundo, se reportan los cambios utilizando la misma tarea conductual que se empleó aquí. Con herramientas similares y menor contundencia, Leil *et al.* (2002) reportaron un patrón diferencial de expresión de genes en el hipocampo entre ratones genéticamente modificados que se desempeñan muy eficiente o muy deficientemente en la tarea del laberinto acuático.

En el reporte de Cavallaro *et al.* (2002a) se menciona, entre otros cambios relevantes, una modificación importante en la expresión de genes relacionados con la estructura de las sinapsis al entrenar a las ratas en la tarea del laberinto acuático. Estos genes incluyen los que codifican para la sinaptotagmina y la syntaxina. Donahue *et al.* (2002) también reportaron –entre otros genes- un incremento de la sinaptotagmina utilizando un paradigma de condicionamiento del reflejo parpebral similar al utilizado por Thomson y Kim (1996), quienes a su vez mostraron que la actividad del hipocampo juega un papel crucial para que el condicionamiento se establezca utilizando este paradigma. La modificación de la estructura de las sinapsis vinculada al entrenamiento en la tarea de evitación inhibitoria ha sido reportada por O'Malley *et al.* (1998)

Sin embargo, ninguno de estos trabajos busca diferencias en las propiedades funcionales del hipocampo entre ratas entrenadas con diferentes niveles de reforzamiento, que en el plano conductual son muy acentuadas. Es por eso que en el presente trabajo experimental, nos hemos propuesto vincular los efectos del entrenamiento intenso tanto en la formación de la memoria medida conductualmente, como en la expresión de proteínas asociadas a la transmisión sináptica.

SECCIÓN EXPERIMENTAL

Hipótesis 1: La inactivación del hipocampo con TTX no interferirá con la retención de la tarea de prevención pasiva medida 30 minutos después del entrenamiento, tanto con baja como con alta intensidad de choque.

Hipótesis 2: La inactivación del hipocampo dorsal con TTX no producirá un cuadro amnésico 48 horas después del entrenamiento con alta intensidad de choque.

Hipótesis 3. El entrenamiento con alta intensidad de choque producirá un nivel de expresión de sinaptofisina en el hipocampo diferente del producido por el entrenamiento con baja intensidad de choque.

Objetivos

La meta central de este trabajo es definir si la participación funcional del hipocampo en el proceso de consolidación de la memoria cambia cuando el evento de aprendizaje está asociado a un estímulo aversivo intenso. Para alcanzar esta meta, derivados de las hipótesis propuestas, se propusieron tres objetivos complementarios:

1. Estudiar el efecto de la inactivación reversible de la actividad del hipocampo en su región dorsal, sobre la retención medida 30 minutos (memoria de corto plazo) después del entrenamiento con un reforzador de alta intensidad.
2. Estudiar el efecto de la inactivación reversible de la actividad del hipocampo en su región dorsal, sobre la retención medida 48 horas (memoria de largo plazo) después del entrenamiento con un reforzador de alta intensidad.
3. Conocer si existen cambios en la densidad de las sinapsis en el hipocampo asociados al entrenamiento por medio de un estímulo aversivo intenso en comparación con el entrenamiento normal, cuantificando estos cambios por medio de la expresión de sinaptofisina en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo dorsal.

Consideraciones metodológicas

Una limitación de los estudios sobre la consolidación de la memoria que se realizan lesionando las áreas de interés, es que en caso de encontrarse un déficit en la ejecución de una prueba después del entrenamiento, no puede discernirse con claridad si la estructura dañada participa en la consolidación propiamente dicha o en la evocación de la tarea aprendida ya consolidada. También son ambiguas en este caso las interpretaciones sobre el papel de la estructura en el proceso que se estudia si se considera la reorganización funcional del sistema nervioso después de una lesión (Izquierdo y Medina, 1998).

Una aproximación experimental a este problema consiste en utilizar técnicas farmacológicas basadas en la inactivación reversible de las regiones bajo estudio en el sistema nervioso.

La inactivación temporal del estriado inducida por lidocaína, que es un bloqueador reversible de los canales de Na^+ con un tiempo estimado de acción de 2 horas, produce un efecto amnésico sobre la memoria de largo plazo en las ratas, que no se observa cuando se incrementa la intensidad del choque de entrenamiento (Perez-Ruiz y Prado-Alcalá, 1989). No obstante, en observaciones de nuestro laboratorio se encontró que la administración de lidocaína en el hipocampo no produce un cuadro amnésico después del entrenamiento, posiblemente porque su tiempo de acción no es lo suficientemente prolongado como para interferir con el proceso de consolidación en el hipocampo. La participación del hipocampo dorsal en la consolidación por al menos 90 minutos después del entrenamiento ha sido demostrada por Lorenzini *et al.* (1996) utilizando TTX. El mayor tiempo de acción de la TTX, permite observar diferencias significativas en la retención de animales a los cuales se les administra la toxina en el hipocampo dorsal durante el período inmediato posterior a la sesión de entrenamiento. La TTX actúa como un inactivador reversible con un mecanismo de acción similar a la

lidocaína, bloqueando reversiblemente los canales de Na^+ . A diferencia de la lidocaína, la TTX tiene un tiempo estimado de acción de 24 horas (Zhuravin y Bures, 1991; Boehnke y Rasmusson, 2001). Cuando esta toxina se aplica en el hipocampo ventral, se produce un cuadro amnésico menos pronunciado, que sólo es significativo al administrar la toxina dentro de los primeros 15 minutos después del entrenamiento (Lorenzini *et al.*, 1997). Sin embargo, no se ha reportado si el entrenamiento con un estímulo aversivo más intenso suprime el efecto amnésico de la TTX en ambas regiones del hipocampo, ni cuál es el efecto que produce en la retención a corto plazo la inactivación del hipocampo con esta toxina. Aunque es verdad que la evocación de la memoria de corto plazo se ha mostrado muy difícil de abatir, la posibilidad ya señalada de que bajo ciertas condiciones pueda inhibirse el establecimiento de la memoria de corto plazo al tiempo que el proceso de formación de la memoria de largo plazo permanece, justifica la pertinencia de probar el efecto del bloqueo reversible del hipocampo sobre la evocación de la memoria de corto plazo.

La dosis de TTX que se aplicó ($10 \text{ ng}/\mu\text{l}$), se eligió inicialmente tomando como base un reporte sobre el radio de la acción inhibitoria de esta dosis en esta dilución y el período de tiempo en el cual produce efectos después de la inyección (Zhuravin y Bures, 1991). En el trabajo citado se demuestra que la administración de esta dosis en el parénquima, inactiva reversiblemente la actividad de núcleos nerviosos aproximadamente en 1 mm de tejido circundante al sitio de inyección, alcanza su efecto en 25 minutos y no produce efectos detectables 24 horas después de la administración. Sin embargo, en los reportes de los estudios de inactivación por TTX reportados por Lorenzini *et al.* (1996, 1997), no se demuestra directamente la extensión de las regiones inactivadas en el hipocampo durante las fases posteriores al entrenamiento ni durante la prueba de retención, sino que se asume que la TTX presenta en las regiones estudiadas del hipocampo, la misma difusión y efectos en el tiempo que las que fueron reportadas para el núcleo de Eddinger-Wetsfall por Zhuravin y Bures (1991). Por lo tanto, como experimento adicional en el contexto de este proyecto, se probó directamente en el hipocampo la acción, en cuanto a extensión y tiempo, de la microinyección de TTX. Otro punto de consideración es que, en estos estudios, la inyección de TTX durante el período de

consolidación se llevó a cabo bajo los efectos de pentobarbital con el objetivo de facilitar la manipulación de los animales. La presencia de este barbitúrico durante el período de consolidación incorpora un artefacto que se evita en los experimentos descritos aquí.

Por otra parte, el hecho de que los mecanismos de consolidación varíen de acuerdo a la intensidad de la experiencia de aprendizaje, sugiere que las estructuras que participan activamente en él poseen algún género de interruptor o sensor, ya sea representado por una estructura concreta (o una combinación de ellas) o por una variación intrínseca del funcionamiento de los elementos implicados. Es destacable que, en el plano conductual, esta variación del desempeño en la retención varía de forma abrupta con el progresivo incremento en la intensidad del estímulo aversivo (Cruz-Morales *et al.*, 1992).

En el caso del hipocampo, una forma de aproximarse a los cambios intrínsecos que tienen lugar para que la consolidación se realice de una forma que depende directamente del hipocampo o de una forma que no lo hace, consiste en estudiar la densidad relativa de vesículas sinápticas en las áreas CA1 y CA3 por medio de la cuantificación de la expresión de sinaptofisina. Esta proteína se encuentra asociada a la membrana de las vesículas sinápticas y participa en la formación del canal a través del cual se libera el contenido de las vesículas durante el proceso de exocitosis. Los ensayos inmunohistoquímicos que revelan la presencia de esta proteína, ofrecen una medida de la densidad de sinapsis en el área estudiada (Calhoun *et al.*, 1996).

MÉTODO

Experimento 1

El objetivo de este experimento fue mostrar si las ratas entrenadas con un choque relativamente intenso eran capaces de recordar la tarea incluso cuando se inactivó en ellas el hipocampo después del entrenamiento, durante el periodo que se sabe ocurre la consolidación de la memoria. Para tener certeza de que la tarea sí fue adquirida, se midió la retención treinta minutos después del entrenamiento, en el momento en el que la interferencia con la actividad del hipocampo no tiene efectos sobre la evocación de la memoria.

Sujetos

Los datos reseñados en esta tesis se obtuvieron de un total de 76 ratas Wistar macho de 250-300 grs que pasaron las pruebas de verificación histológica y en las que las pruebas de entrenamiento, inyección y retención se realizaron sin contratiempos. En todas las ratas utilizadas para esta serie experimental, se implantaron bilateralmente cánulas mediante cirugía estereotáxica bajo anestesia general con pentobarbital (45 mg/kg, I.P.). Se utilizaron cánulas de doble pared fabricadas con agujas de acero inoxidable, calibres 23 y 30 (0.63 mm diámetro externo, 0.33 mm diámetro interno, respectivamente) de 12 mm de largo para ser implantadas en la región dorsal del hipocampo (AP= -4.1 L= \pm -2.5, V= -3.1 mm), como se ilustra en la figura 1, o de 10 mm de largo para el caso de la corteza parietal, que se encuentra en el mismo plano rostro-caudal, justo por arriba del hipocampo (AP = -4.1, L = \pm 2.5, V = -0.5) de acuerdo con el atlas de Paxinos y Watson (1997).

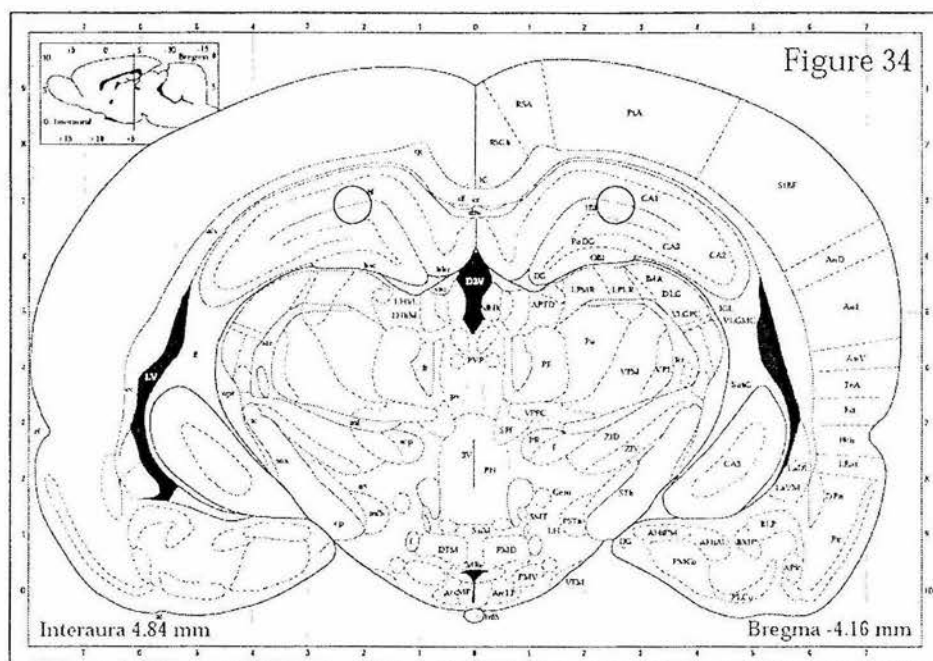


Figura 1. Diagrama que muestra el sitio de inyección de TTX en el hipocampo dorsal (círculos grises). Adaptado de Paxinos y Watson, 1997.

Aparatos

Cámara de condicionamiento de evitación inhibitoria

El entrenamiento de evitación inhibitoria y la prueba de retención se realizaron en una caja de condicionamiento constituida por dos compartimientos de las mismas dimensiones (30 x 30 x 30 cm) separados por una puerta tipo guillotina.(Figura 2)

El piso del compartimiento de seguridad fue hecho con barras de aluminio de 6 mm de diámetro separadas con 1.5 cm entre sí. Las paredes del compartimiento de castigo están compuestas de dos placas de acero inoxidable las cuales se encuentran separadas en la mitad del piso por una ranura de 1 cm, dando una forma de V, lo cual permitió que los sujetos hicieran contacto con ellas todo el tiempo y recibieran el choque eléctrico. El compartimiento de castigo podía estar electrificado utilizando un estimulador de pulsos cuadrados (Grass-Instruments Co., modelo S48) conectado en serie con una unidad de corriente constante (Grass-Instruments Co., modelo CCU-1A). La cámara de condicionamiento está ubicada en un cuarto sonoamortiguado (2.44 X 1.95 X 2.50 m) y con baja iluminación provista de un enmascarador de ruido (BRS/LVE, modelo AU-902).

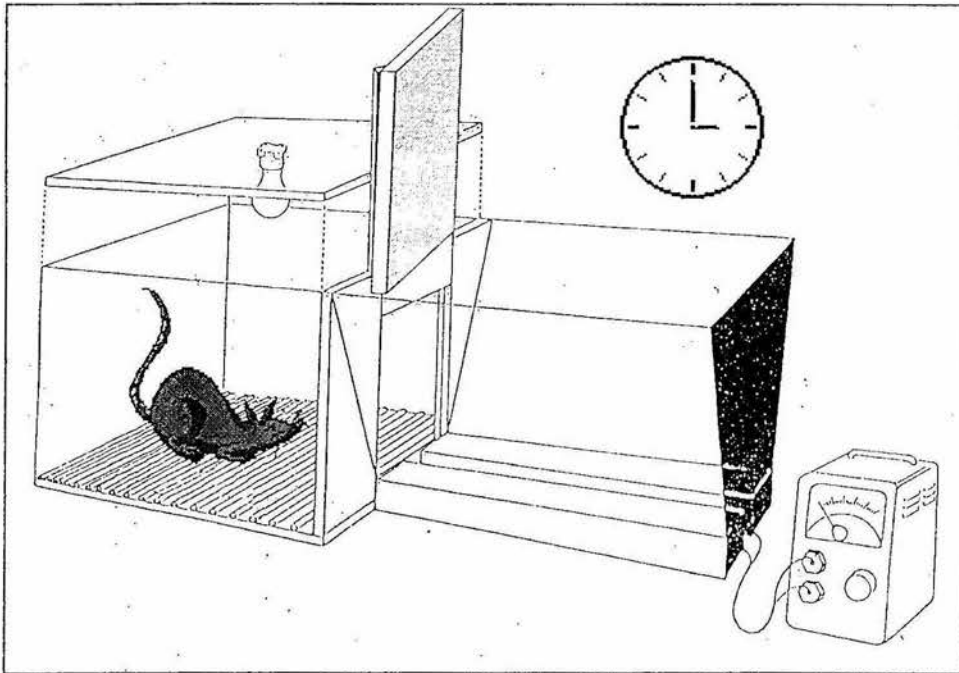


Figura 2. Aquí se ilustra esquemáticamente la cámara de evitación inhibitoria.

Procedimiento

Sesión de entrenamiento.

En el primer y único día de entrenamiento (sesión de adquisición o aprendizaje), cada sujeto se introdujo al compartimento de seguridad durante 10 segundos; transcurrido este tiempo se abrió la puerta y se midió el tiempo (latencia de adquisición) en que cruzaba con las cuatro patas al compartimento de castigo. En ese momento se cerró la puerta y se administró un choque durante 5 segundos; después se abrió la puerta y el choque se mantuvo hasta que la rata escapaba al compartimento de seguridad, midiéndose la latencia de escape. Posteriormente, se cerró la puerta y 30 segundos después se colocó al animal en su jaula individual dando por terminada la sesión. Las intensidades del choque fueron de 0.8 ó 1.0 mA; estos estímulos eléctricos tuvieron los siguientes parámetros: 100 volts, pulsos de 50 mseg de duración y 10 Hz.

Sesión de Retención.

Transcurridos 30 minutos ó 48 horas, de acuerdo al grupo experimental, se colocó a los sujetos en el compartimiento de seguridad y se midió la latencia para pasar al compartimiento de castigo, sin volver a aplicar el choque eléctrico. Si el sujeto no cruzaba en 200 segundos se daba por terminada la sesión y se asignaba una puntuación de 200 segundos.

Tratamientos.

Cinco minutos después del entrenamiento, a través de las cánulas implantadas se inyectó bilateralmente TTX con una dosis de 10 ng/ μ L por medio de dos microjeringas Hamilton acopladas a una bomba automática de infusión continua. La velocidad de infusión fue de 1 μ L/minutos. Los grupos control fueron inyectados con 1 μ L de solución salina isotónica (SS).

Diseño

El experimento se planeó de la siguiente forma:

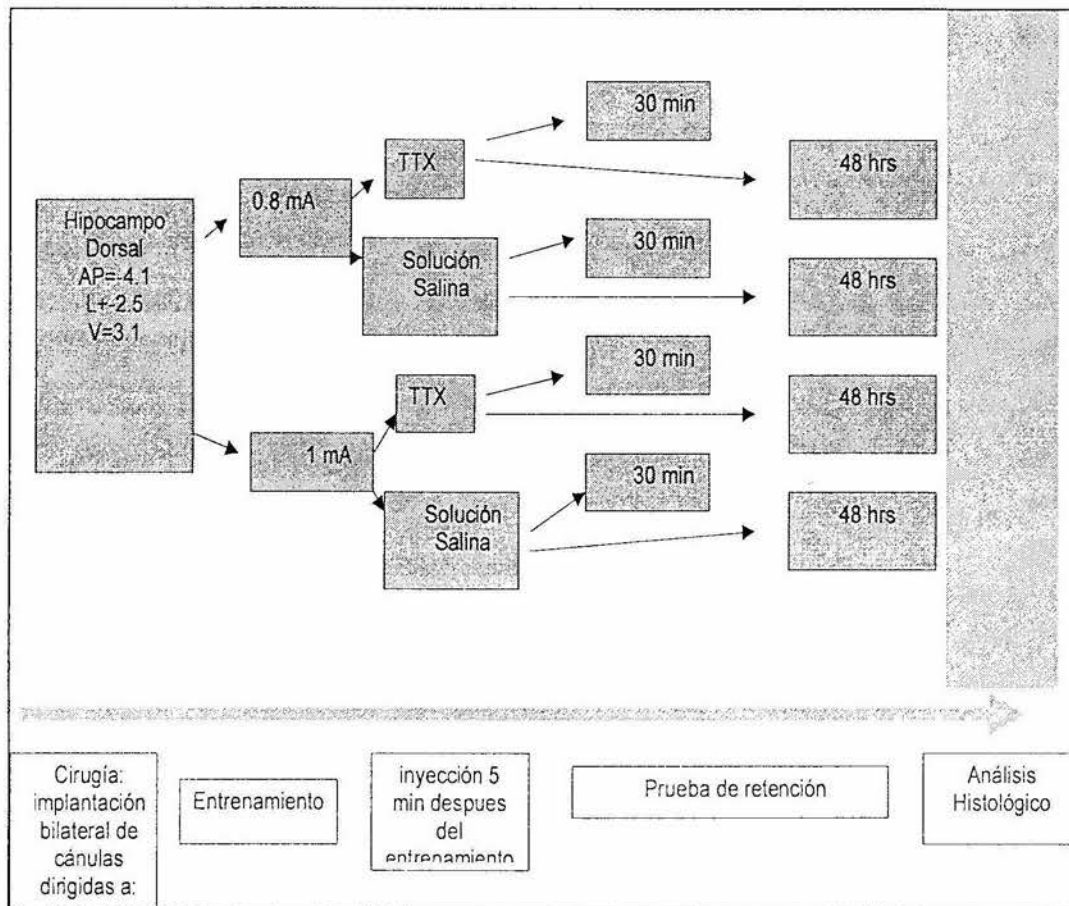


Figura 3. En este esquema se describen 8 grupos independientes. Se utilizaron entre 8 y 12 animales por grupo. El número total de animales cuyas latencias de retención fueron incluidas en la parte conductual de este estudio fue de 76 ratas.

Análisis Histológico.

Una vez terminados los experimentos conductuales, todos los animales fueron sacrificados con una dosis letal de pentobarbital sódico y perfundidos a través de la aorta ascendente con solución salina isotónica seguida de formaldehído al 4% en solución con amortiguador de fosfatos (PBS). Una vez terminada la perfusión se extrajo el cerebro y se colocó en un frasco con una mezcla de una solución de formaldehído al 4% y de una solución de sacarosa al 20% en una proporción de 1:1 por siete días. Posteriormente, se realizaron cortes coronales de 50 μ m de espesor que se fijaron a laminillas de observación, los cuales fueron teñidos con la técnica de violeta de cresilo. Todas aquellas ratas en las

que las cánulas estuvieron fuera del sitio escogido (hipocampo dorsal o corteza parietal) fueron descartadas y sus datos no fueron incluidos en los análisis estadísticos.

Estadística.

Se utilizó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney para comparar las latencias de entrenamiento, escape y retención de cada uno de los grupos tratados con TTX contra sus respectivos grupos control (vehículo).

Experimento 2

Se realizó un estudio complementario para conocer la extensión de tejido inactivado por la TTX. Este estudio complementario se hizo con el propósito de definir a qué distancia del sitio de inyección y en cuánto tiempo, la difusión de la toxina induce la inactivación en las células del hipocampo en el periodo posterior a la inyección.

Sujetos

Se emplearon un total de 25 ratas Wistar macho de 250-300 g en las cuales, mediante cirugía estereotáxica bajo anestesia general con pentobarbital (45 mg/kg, I.P.) se implantaron bilateralmente cánulas de doble pared fabricadas con agujas de acero inoxidable, calibres 23 y 30 (0.63 mm diámetro externo, 0.33 mm diámetro interno, respectivamente) de 12 mm de largo para situarlas en la región dorsal del hipocampo (AP= -4.1 L= \pm -2.5, V= -3.1 mm), de acuerdo con el atlas de Paxinos y Watson (1997).

Diseño

En 5 grupos independientes de ratas con cánulas implantadas bilateralmente, se realizó una prueba inmunohistoquímica contra *c-fos* en la región circundantes al sitio de inyección en el hipocampo dorsal. La expresión de esta proteína se reveló 30, 90 minutos y 48 horas después de la aplicación de la TTX, que corresponden, en el primer y tercer caso, al periodo de tiempo transcurrido entre el entrenamiento y las pruebas de retención.

Tratamientos

Para este estudio, la inyección de TTX (10 ng/ μ l) se realizó unilateralmente, mientras que en el hipocampo contralateral se inyectó de forma simultánea solución salina isotónica (1 μ l) como control. Ambas inyecciones se realizaron

con una velocidad de 1 μ l/minuto. Para dotar de resolución al ensayo inmunohistoquímico, se incrementó la expresión basal de *c-fos* en el giro dentado del hipocampo mediante la aplicación de una inyección i.p. de 10 mg/Kg de ácido kaínico (Herrera & Robertson, 1996; Willoughby *et al.*, 1997). Diez minutos después de la inyección de ácido kaínico, se sacrificó a los animales con una sobredosis de pentobarbital (180 mg/Kg). De forma similar, en dos de los cinco grupos independientes, se incrementó la expresión basal de *c-fos* en la corteza y los campos CA1, CA3 y giro dentado del hipocampo mediante la aplicación de una inyección i.p. de pentilenetetrazol (PTZ) en una dosis de 45 mg/kg (Erdtmann-Vourliotis *et al.*, 1998), 50 minutos antes del sacrificio del animal con sobredosis de pentobarbital.

El diseño de este experimento complementario es el siguiente:

Cirugía HC Dorsal	TTX 10 ng/ μ L Vs. SS 1 μ l	20 min	Kaínico 10 mg/kg i.p. 10 min prev.	Ensayo Inmunohistoquímico 30 min
Cirugía HC Dorsal	TTX 10 ng/ μ L Vs. SS 1 μ L	30 min	Kaínico 10 mg/kg i.p. 60 min prev.	Ensayo Inmunohistoquímico 90 min
Cirugía HC Dorsal	TTX 10 ng/ μ L Vs. SS 1 μ L	47 hr 40'	Kaínico 10 mg/kg i.p. 20 min prev.	Ensayo Inmunohistoquímico 48 hr
Cirugía HC Dorsal	TTX 10 ng/ μ L Vs. SS 1 μ L	47 hr 10'	PTZ 45 mg/kg i.p. 50 min prev.	Ensayo Inmunohistoquímico 48 hr
Cirugía HC Dorsal	TTX 10 ng/ μ L Vs. SS 1 μ L	20 min	PTZ 45 mg/kg i.p. 10 min prev.	Ensayo Inmunohistoquímico 30 min

Tabla 1. En esta tabla se muestra el diseño para las pruebas de difusión de TTX.

Procedimiento inmunohistoquímico

Para revelar la expresión de *c-fos*, las ratas fueron profundamente anestesiadas con una dosis de 180 mg/kg de pentobarbital y perfundidas a través de la aorta ascendente con solución salina isotónica a 36°C seguida de 500 ml de paraformaldehído al 4% (pH 9.5, 10°C). Los cerebros fueron extraídos y post-fijados durante 3 horas en paraformaldehído a 4% (4°C) y posteriormente en una solución de 10% de sucrosa en solución amortiguadora de fosfatos (PBS) 0.1 molar durante 12 horas (4°C). Los cerebros fueron posteriormente cortados coronalmente en series de 30 micras de espesor para ser colectados y almacenados a -20°C en solución anticongelante (30% etilenglicol y 20% glicerol en solución amortiguadora de fosfatos 0.05 molar. La presencia de *c-fos* fue revelada utilizando la técnica de complejo avidina-biotina-peroxidasa para localizar el anticuerpo monoclonal producido en conejo contra el fragmento sintético N-terminal de la proteína humana Fos (*Santa Cruz Biotechnology*).

Las secciones de cerebro fueron lavadas de la solución anticongelante, e incubadas por 10 minutos en solución al 0.01% de peróxido de hidrógeno en buffer de fosfatos (PBS). Esta reacción tiene como objetivo reducir la actividad de la peroxidasa endógena, que de otra forma, produce una reacción de revelado inespecífica. Posteriormente, las secciones fueron lavadas dos veces en PBS e incubadas en solución al 1% de borohidrato de sodio para reducir los aldehídos que se acumulan por el proceso de fijación del cerebro y pueden interferir con la especificidad del anticuerpo primario. Tras cinco lavados en PBS, las secciones fueron incubadas durante 48 horas a 4°C en una solución de PBS + 0.05% de Tritón x-100 + 5% suero fetal de cabra + anticuerpo primario dirigido contra fos en dilución 1:5000. El anticuerpo primario fue detectado con la técnica del complejo avidina-biotina-peroxidasa (Kit ABC Vectastain Elite de laboratorios Vector). Para hacer esto, se lavan 2 veces las secciones de la solución de anticuerpo primario y se incuban en una solución de 1:500 de antisuero biotinilado contra conejo + 1% de D-glucosa en PBS durante 24 horas a 4°C. Posteriormente se lava de nuevo 2 veces en PBS y se

añade la solución de avidina-peroxidasa del kit ABC de revelado, se incubó durante 10 minutos, se lava dos veces en PBS y se añade una solución de 5% de diaminobenzidina + 1% de sulfato de níquel + 0.01% de glucosa oxidasa . Esta solución produce una reacción de precipitación de níquel sobre el complejo avidina-biotina y revela el sitio donde se encuentra la proteína contra la que está dirigido el primer anticuerpo, *c-fos* en este caso. Esta última reacción se hizo a 4°C y se detuvo a los diez minutos de iniciada mediante la adición de PBS.

Análisis histológico

Las secciones se enjuagaron abundantemente en PBS y se montaron en cubreobjetos gelatinados. Se secaron durante 12 horas, se deshidrataron en soluciones progresivamente más concentradas de alcohol (50%, 70%, 85%, 96% y 100%), finalmente se aclararon con xilol y se cubrieron con cubreobjetos y resina *Entellan*.

Las secciones montadas fueron fotografiadas con una amplificación de 4x para obtener una imagen de la difusión de TTX y con una amplificación de 20x para corroborar el adecuado marcaje restringido al núcleo de las células.

Experimento 3

Esta serie experimental fue diseñada para cumplir con el tercer objetivo de esta tesis: conocer si existen cambios en la densidad de las sinapsis en el hipocampo asociados al entrenamiento por medio de un estímulo aversivo intenso en comparación con el entrenamiento normal. Estos cambios se cuantificaron por medio de la expresión de sinaptofisina en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo dorsal. Para ello, se comparó a dos grupos entrenados en la tarea de evitación inhibitoria con dos diferentes intensidades de choque, contra dos grupos sometidos también a una u otra intensidad de choque, pero que, debido al procedimiento, no modificaron su latencia de retención a consecuencia de ese choque; cabe decir, los grupos control reciben el choque pero no son sometidos al entrenamiento de evitación inhibitoria.

Con este diseño se pretende igualar entre los grupos control y los grupos experimentales el efecto del choque eléctrico y así discriminar los efectos producidos por la modificación de la conducta. Como puede apreciarse, en este caso un grupo control que no reciba un choque eléctrico no puede compararse con los grupos experimentales porque existen al menos dos variables que no incidirían en él: el efecto del choque y el efecto de la modificación de la conducta por el contexto, es decir, el aprendizaje. Si se utilizara un grupo sin choque como control, no sería posible atribuir a una variable concreta cualquier cambio observado en los niveles de sinaptofisina.

Sujetos

Se utilizaron 20 ratas macho Wistar, con un peso entre 250 y 300 grs. que fueron mantenidas en condiciones normales de iluminación (12h/12h) con libre acceso a agua y alimento.

Procedimiento

Con el fin de hacer una aproximación a los cambios que pueden originarse en el hipocampo a raíz del entrenamiento intenso, a nivel de la densidad de sinapsis, se realizó el siguiente ensayo inmunohistoquímico contra

sinaptofisina. Dos horas después de colocar a las ratas en la cámara de evitación inhibitoria para realizar la prueba de retención, las ratas fueron profundamente anestesiadas con una dosis de 180 mg/kg de pentobarbital y perfundidas a través de la aorta ascendente con solución salina isotónica a 36°C seguida de 500 ml de paraformaldehído al 4% (pH 9.5, 10°C). Los cerebros fueron extraídos y post-fijados durante 3 horas en paraformaldehído a 4% (4°C) y posteriormente en una solución de 10% de sucrosa en buffer de fosfatos 0.1 molar durante 12 horas (4°C). Los cerebros fueron posteriormente cortados coronalmente en series de 30 micras de espesor para ser colectados y almacenados a -20°C en solución anticongelante (30% etilenglicol y 20% glicerol en buffer de fosfatos 0.05 molar. La presencia de sinaptofisina fue revelada utilizando la técnica de complejo avidina-biotina-peroxidasa para localizar el anticuerpo monoclonal producido en conejo contra sinaptofisina.

Las secciones de cerebro fueron lavadas de la solución anticongelante, e incubadas por 10 minutos en solución al 0.01% de peróxido de hidrógeno en buffer de fosfatos (PBS). Este paso tiene como objetivo reducir la actividad de la peroxidasa endógena, que de otra forma, produce una reacción de revelado inespecífica. Posteriormente fueron lavadas dos veces en PBS e incubadas en solución al 1% de borohidrato de sodio para reducir los aldehídos que se acumulan por el proceso de fijación del cerebro y pueden interferir con la especificidad del anticuerpo primario contra la sinaptofisina. Después de cinco lavados en PBS, las secciones fueron incubadas durante 48 horas a 4°C en una solución de PBS + 0.05% de Tritón x-100 + 5% albúmina bovina + anticuerpo primario dirigido contra sinaptofisina en dilución 1:1000. El anticuerpo primario fue detectado con la técnica del complejo avidina-biotina-peroxidasa (Kit ABC Vectastain Elite de laboratorios Vector). Para hacer esto, se lavan 2 veces las secciones de la solución de anticuerpo primario y se incuban en una solución de 1:500 de antisuero biotinilado contra conejo + 1% de D-glucosa en PBS durante 24 horas a 4°C. Posteriormente se lava de nuevo 2 veces en PBS y se añade la solución de avidina-peroxidasa del kit ABC de revelado, se incuban durante 10 minutos, se lava dos veces en PBS y se añade una solución de 5% de diaminobenzidina + 1% de sulfato de níquel + 0.01% de glucosa oxidasa. Esta solución produce una reacción de precipitación de níquel sobre el complejo avidina-biotina y revela el sitio donde

se encuentra la proteína contra la que está dirigido el primer anticuerpo, sinaptofisina en este caso. Esta última reacción debe hacerse a 4°C y debe detenerse aproximadamente a los diez minutos de iniciada mediante la adición de PBS. Las secciones se enjuagan 5 veces mas en PBS y se montan en cubreobjetos gelatinados. Se dejan secar 12 horas, se deshidratan en soluciones progresivamente mas concentradas de alcohol (50%, 70%, 85%, 96% y 100%), finalmente se sumergen en xilol y se cubren con cubreobjetos y barniz Permount.

La captura de imágenes del análisis inmunohistoquímico se realizó con una amplificación de 40X en un solo plano focal. Se cuantificó el número de puntos inmunoreactivos a sinaptofisina en el estrato lúcido del campo CA3 con auxilio del programa de análisis de imágenes IPLab.

Se eligió el campo CA3 porque en esa región se localizan botones sinápticos aglomerados cuya disposición permite verlos individualmente. Adicionalmente, es ahí donde se reportó un incremento sustancial del área de fibras musgosas asociado al aprendizaje del laberinto acuático, (Ramírez-Amaya *et al.*, 1999; Ramírez-Amaya *et al.*, 2001) que se considera, al igual que la tarea de evitación inhibitoria, una tarea dependiente del hipocampo.

Diseño

El diseño de este experimento fue el siguiente:

Control (sin entrenamiento)	Choque 1 mA (5 seg)	Cámara de evitación inhibitoria	"Retención 48 hr"	Ensayo Inmunohistoquímico
entrenamiento	Cámara de evitación inhibitoria	Choque 1 mA (5 seg)	Retención 48 hr	Ensayo Inmunohistoquímico
Control (sin entrenamiento)	Choque 0.8 mA (5 seg)	Cámara de evitación inhibitoria	"Retención 48 hr"	Ensayo Inmunohistoquímico
entrenamiento	Cámara de evitación inhibitoria	Choque 0.8 mA (5 seg)	Retención 48 hr	Ensayo Inmunohistoquímico

Tabla 2. En esta tabla se muestra el diseño para los experimentos de cuantificación de la expresión de sinaptofisina asociada al entrenamiento con dos niveles de choque eléctrico

Estadística

Las latencias de retención fueron analizadas con la prueba *t* de Student para grupos independientes. Se compararon los grupos que recibieron choques eléctricos de la misma intensidad fuera o dentro de la cámara de evitación inhibitoria. Se eligió esta prueba porque, a diferencia de los datos generados en el experimento 1, las latencias de retención poseen una distribución normal.

Para el análisis de la intensidad de la reacción de revelado contra sinaptofisina en CA1, se utilizó un análisis de varianza de un factor para grupos independientes.

Para el análisis del número de puntos inmunoreactivos a sinaptofisina en CA3, también se utilizó el análisis de varianza de un factor para grupos independientes.

RESULTADOS

Experimento 1

El análisis histológico reveló que las puntas de las cánulas estuvieron alojadas en la región dorsal del hipocampo, a nivel del campo CA1 y de la hoja superior del giro dentado, como se muestra en la Figura 4.

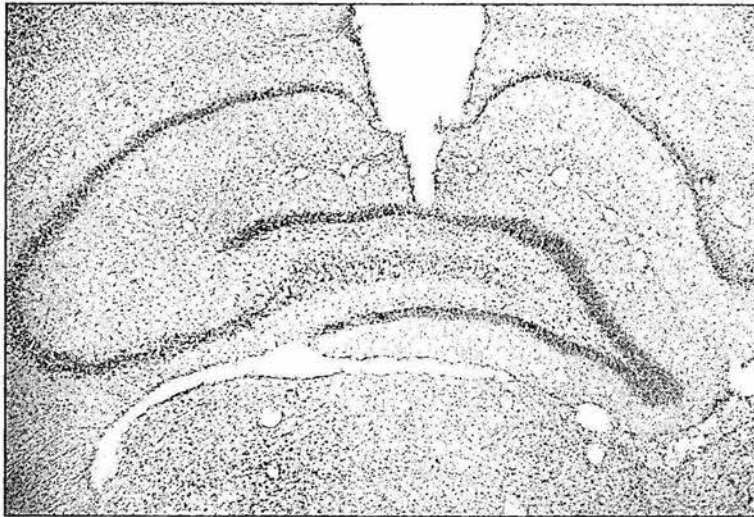


Figura 4. Fotomicrografía que muestra el tracto dejado por la cánula y por el inyector, en la zona de CA1 y Giro dentado.

En todos los grupos se registró la latencia de adquisición (el tiempo que tarda la rata en pasar del compartimiento iluminado al compartimiento oscuro, una vez que se abre la puerta durante la sesión de entrenamiento) y la latencia de escape (el tiempo que tarda la rata en regresar al compartimiento iluminado cinco segundos después de que se aplica el choque, también durante la sesión de entrenamiento). Estos datos no están ilustrados en esta tesis. El objetivo de este registro fue controlar la homogeneidad entre los grupos con respecto a la sensibilidad al choque y a su actividad motora, misma que podría variar la por implantación de las cánulas o alguna otra causa. No se encontraron diferencias entre los grupos en estas dos medidas, con lo que puede asumirse que todos los grupos poseen sensibilidad y capacidad motora similares al inicio de la sesión de entrenamiento.

Tanto las ratas que se entrenaron con 0.8 mA como las que se entrenaron con 1 mA y que fueron inyectadas 5 minutos después con TTX, mostraron una retención sin alteraciones significativas cuando ésta se midió 30 minutos después del entrenamiento. (Figura 5)

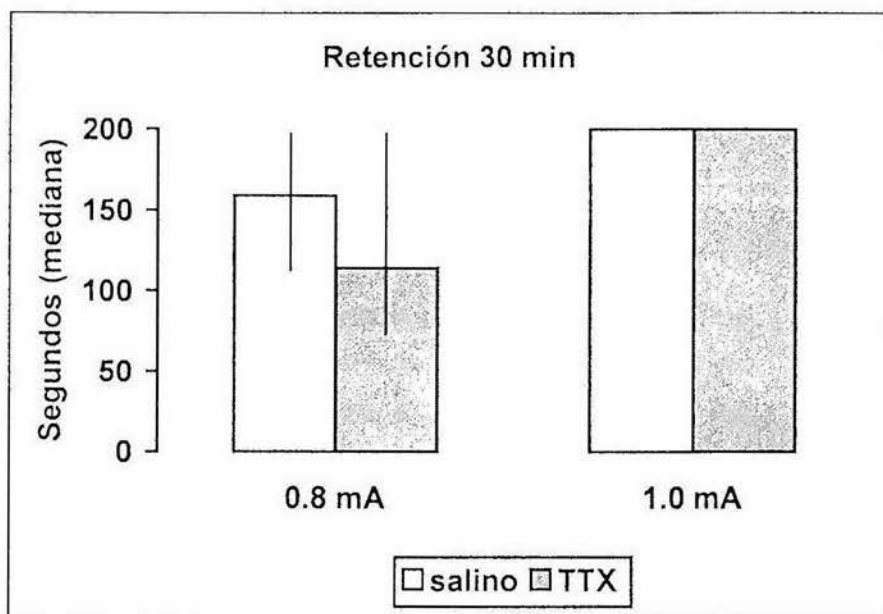


Figura 5. En esta gráfica se muestra la latencia de retención, 30 minutos después del entrenamiento, de 4 grupos de ratas en las que se aplicó un choque de 0.8 mA o de 1 mA y a las cuales se les inyectó 5 minutos después del entrenamiento solución salina (barras blancas) o TTX (barras grises). No existen diferencias significativas entre ninguno de los grupos.

El grupo que fue entrenado con un choque eléctrico de 0.8 mA e inyectado con TTX, presentó un déficit significativo en la retención ($p < 0.05$) comparado con el grupo control cuando ésta fue medida 48 horas después del entrenamiento. Sin embargo, cuando los animales fueron entrenados con un choque eléctrico de 1 mA, la inyección de TTX no produjo deterioro en la retención (Figura 6).

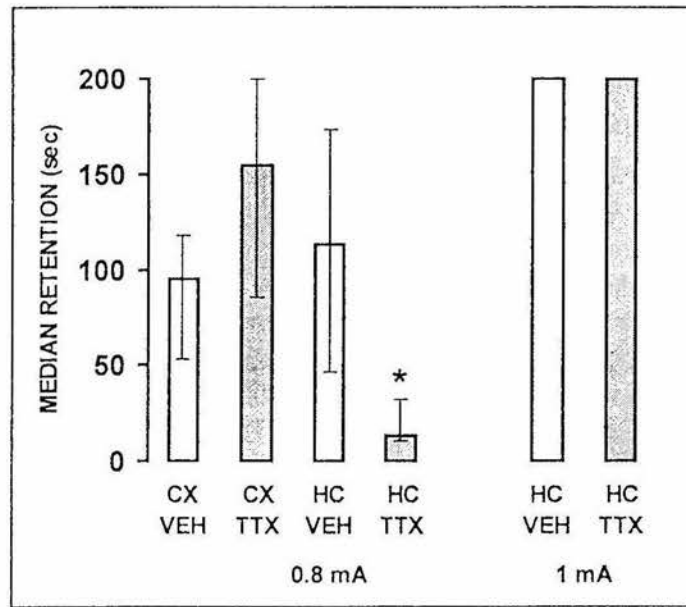


Figura 6. Mediana de los valores de la retención y rango intercuartil de los grupos entrenados en la tarea de evitación inhibitoria. Las ratas fueron inyectadas con vehículo (VEH, barras blancas) o 10 ng de TTX (barras grises) ya sea en la corteza parietal (CX) o en el hipocampo dorsal (HC). La inyección de TTX en el hipocampo produjo amnesia en el grupo entrenado con 0.8 mA, sin embargo, la inyección de TTX no tuvo efectos sobre la retención cuando fue administrada en el hipocampo a las ratas del grupo entrenado con 1.0 mA o en la corteza parietal a las ratas del grupo entrenado con 0.8 mA. *, $p < 0.02$ vs HC-VEH.

Experimento 2

El estudio realizado para analizar la acción de la TTX en el hipocampo, mostró que con la dosis y el volumen empleados, el giro dentado del hipocampo dorsal se encuentra inactivo tanto a los 30 como a los 90 minutos después de la inyección, y ha recuperado su actividad 48 horas mas tarde (Figura 7).

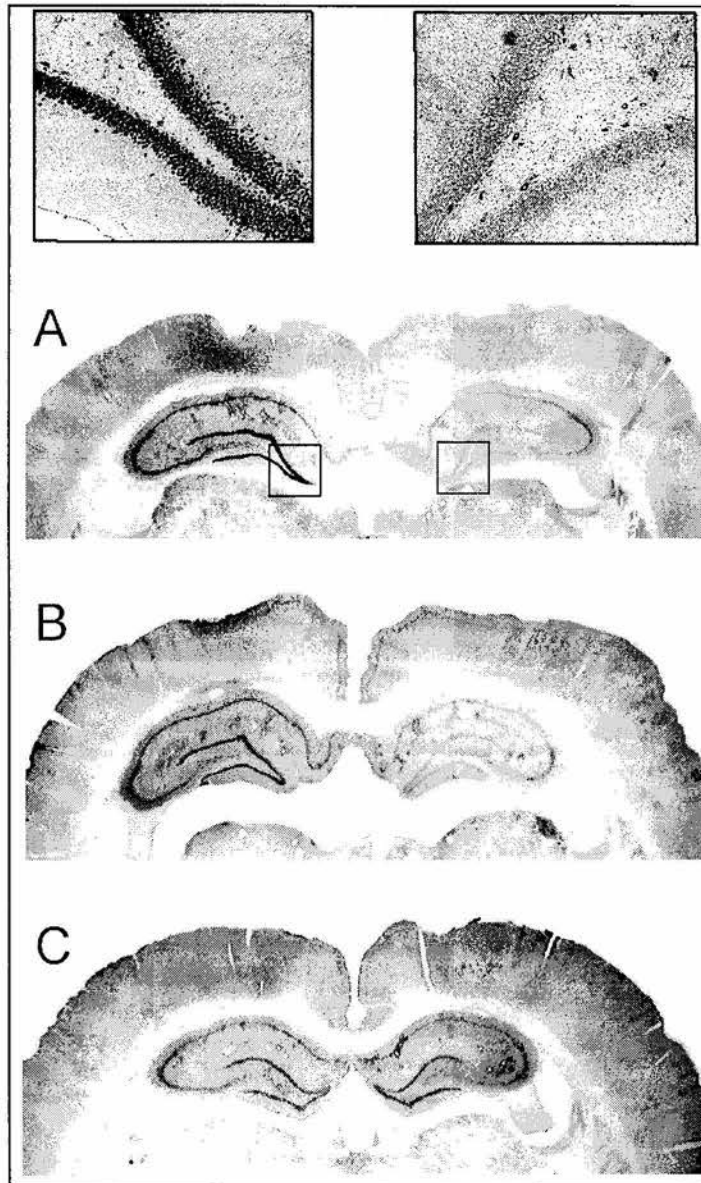


Figura 7. En cada animal, la TTX fue inyectada en el hipocampo izquierdo mientras en el hipocampo contralateral fue inyectada solución salina. La TTX suprime la expresión de *c-fos* inducida por el ácido kaínico a 30 (A) y 90 (B) minutos después de la inyección. Puede observarse una recuperación total 48 h después de la inyección (C) Los dos recuadros superiores son ampliaciones (200x) del giro dentado de cada hemisferio (imagen A) que muestran la intensidad de la expresión de *c-fos*. Las imágenes A, B y C tienen una ampliación 20x. (Adaptado de Quiroz *et al.*, 2003)

La estimulación de *c-fos* inducida por PTZ mostró una inhibición de la expresión de la proteína en la corteza en el hemisferio que recibió la toxina, hecho que sugiere que la TTX inactiva parcialmente la corteza cerebral.

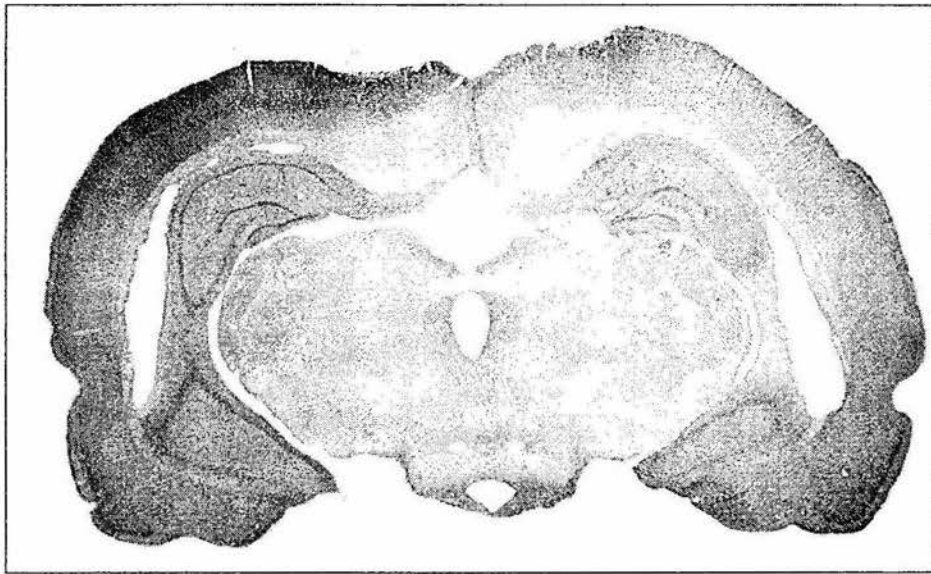


Figura 8. Imagen que muestra la expresión de *c-fos* 90 minutos después de la inyección de TTX y vehículo en el hemisferio derecho e izquierdo, respectivamente. En esta preparación, la expresión de *c-fos* fue estimulada con PTZ (50 mg/Kg, i.p.) 50 minutos antes del sacrificio de los animales.

Experimento 3

En este experimento el objetivo fue comparar la expresión de una proteína asociada a las sinapsis, la sinaptofisina, entre un grupo de ratas entrenadas con un choque lo suficientemente intenso como para producir aprendizaje, entendido como un cambio a largo plazo en la latencia de retención, (pero que mostró ser sensible a la inactivación del hipocampo); y otro grupo de ratas entrenadas con un choque capaz de lograr que la consolidación de este aprendizaje se realice aún sin la participación del hipocampo.

Una vez establecido que la inactivación del hipocampo dorsal no impide la consolidación bajo el entrenamiento con un choque intenso, se llevó a cabo el análisis de la expresión de sinaptofisina en la región CA3 del hipocampo dorsal.

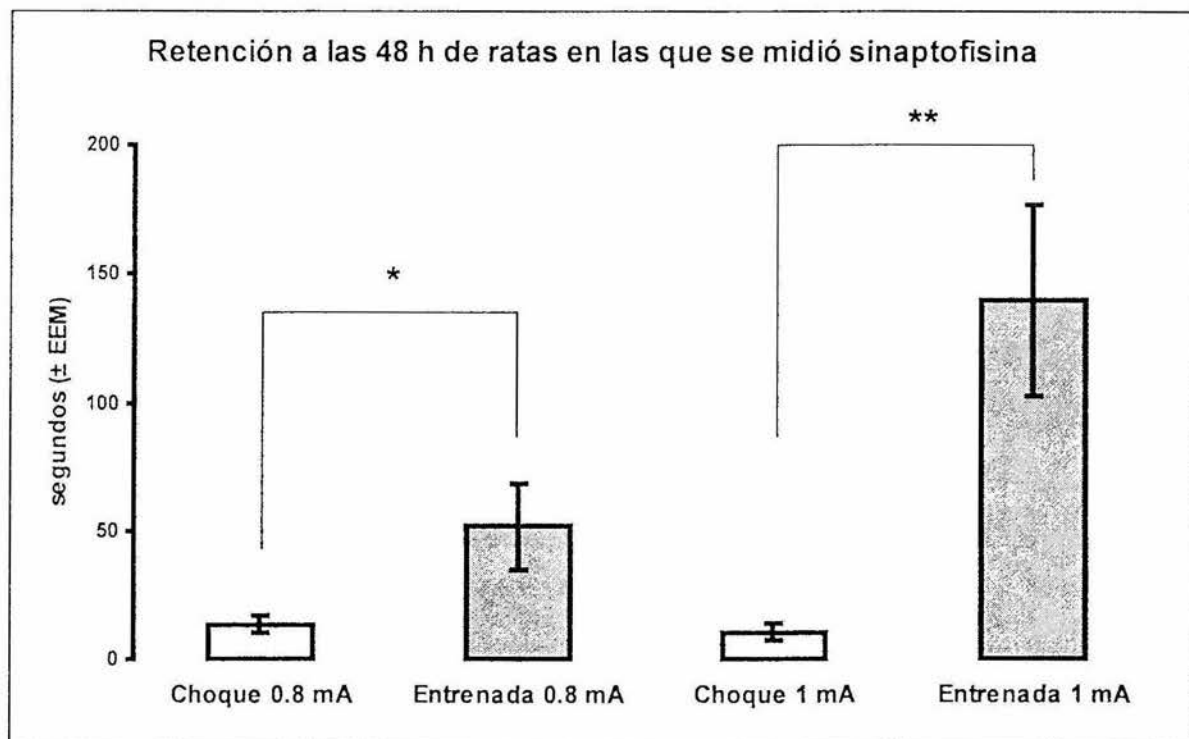


Figura 9. En esta gráfica se muestra la media de la latencia de retención en la cámara de evitación inhibitoria de ratas que recibieron un choque en una cámara distinta a la de prueba (grupos *Choque*) y ratas que recibieron el choque en la misma cámara de prueba (grupos *Entrenada*). * $p < 0.05$; ** $p < 0.02$.

El análisis de los resultados conductuales mostró, como era previsto, que al igual que en el Experimento 1, el grupo que fue entrenado con el estímulo aversivo de mayor intensidad tuvo mejor retención de la tarea, seguido por el entrenado con la intensidad baja de choque eléctrico; en contraste, los animales controles que recibieron el choque de 0.8 o el choque de 1.0 mA, pero que no fueron entrenados en la tarea de evitación inhibitoria, no mostraron signos de retención, tal como se muestra en la Figura 9.

El objetivo principal de este experimento fue explorar qué sucede en el hipocampo para que deje de ser una estructura profundamente involucrada en la consolidación de esta tarea y se convierta en una estructura prescindible en este proceso. Se utilizó como aproximación la expresión de proteínas asociadas a las sinapsis porque constituye un indicador estrechamente relacionado con los procesos plásticos que se asocian a la formación de la memoria. La expresión de sinaptofisina fue cuantificada tanto por la intensidad de la reacción en CA1, como por el número de puntos inmunoreactivos en la región CA3 en los planos situados entre bregma -2.5 y bregma -4.5 en el plano anteroposterior (Figura 10).

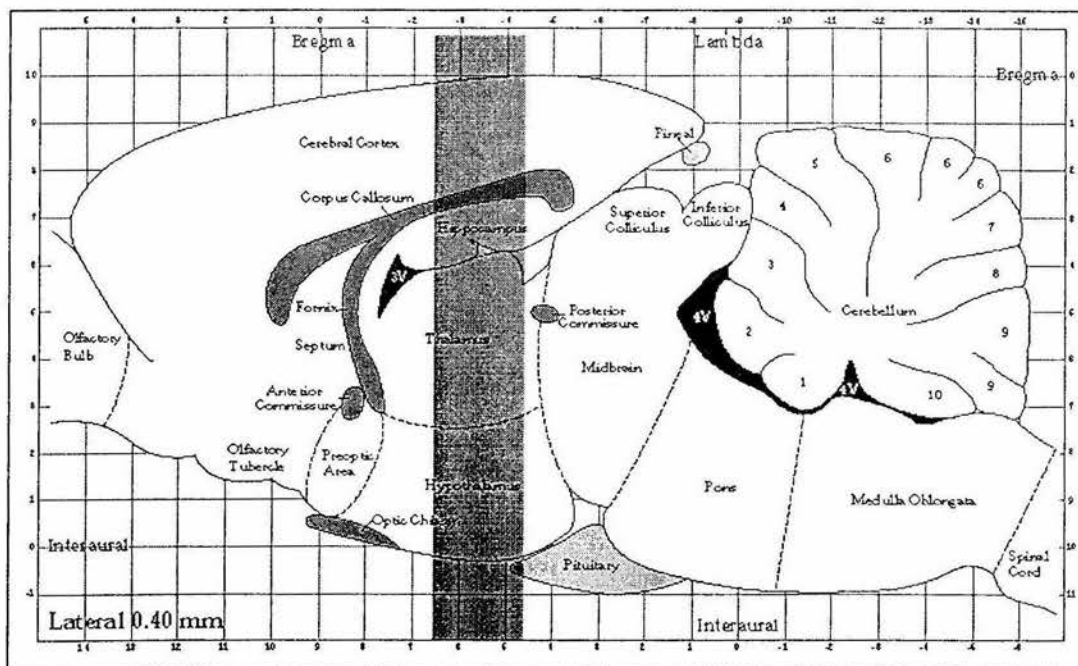


Figura 10. Esquema de un corte longitudinal del cerebro de rata, en el que se representa la zona en la que se cuantificó la expresión de sinaptofisina, indicado con una franja roja entre bregma -2.5 y bregma -4.5 (Adaptado de Paxinos y Watson, 1997).

La Figura 11 ilustra la zona de análisis.

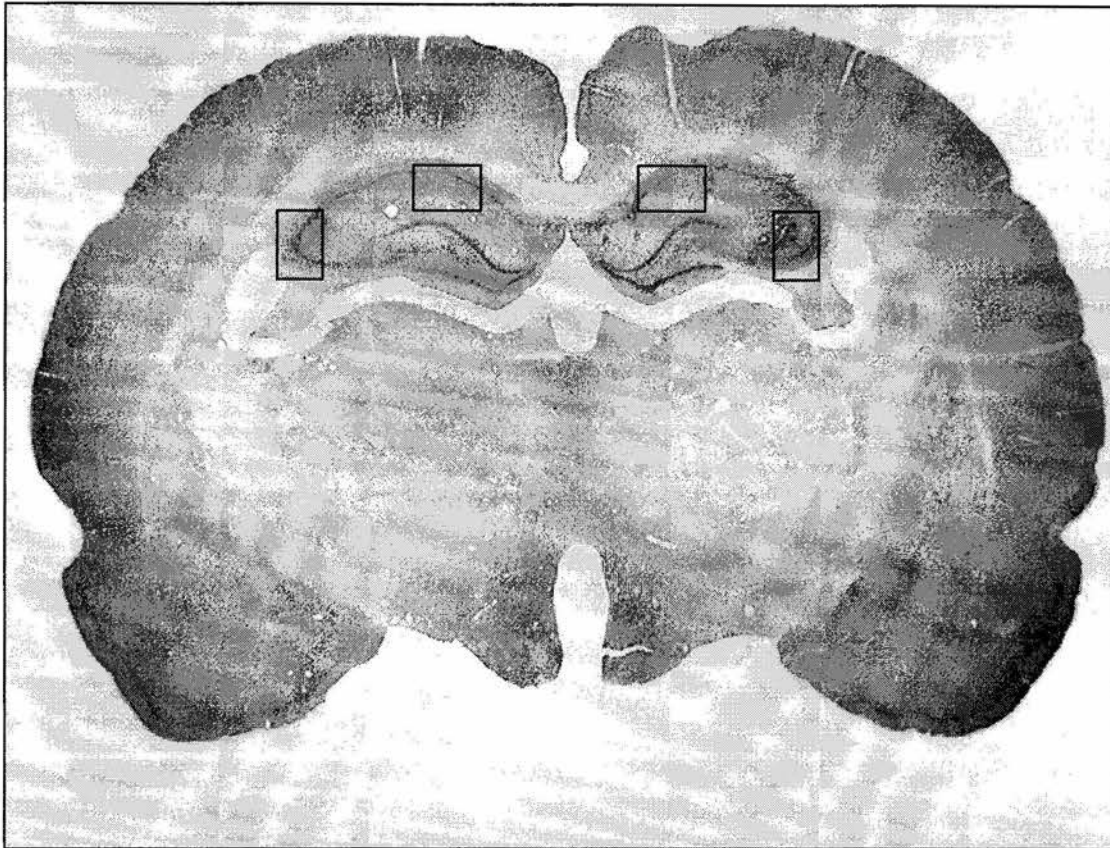


Figura 11. Fotografía donde se muestran, señaladas por rectángulos, las zonas de análisis en CA1 y CA3.

El resultado del análisis mostró que, en el hipocampo dorsal, la intensidad de la reacción que revela la presencia de sinaptofisina en CA1 es equivalente entre todos los grupos. Los datos de este análisis se resumen en la tabla 3.

	0.8 mA solo choque	0.8 mA Entrenada	1 mA solo choque	1 mA Entrenada
Promedio	118.25	106.38	132.40	125.62
Desviación (+/-)	9.930	11.178	11.333	10.598

Tabla 3. Aquí se resumen las medias de los valores de cada grupo cuantificadas como saturación de gris en CA1 y sus respectivas desviaciones. No se observaron diferencias significativas entre los grupos.

En el campo CA3, el número de puntos inmunoreactivos a sinaptofisina fue significativamente menor en el grupo control que recibió un choque de 0.8 mA fuera de la cámara de evitación inhibitoria al compararlo contra los otros tres grupos. No se encontraron diferencias entre los grupos control y experimental de las ratas que recibieron un choque de 1 mA.

	0.8 mA solo choque (*)	0.8 mA Entrenada	1 mA solo choque	1 mA Entrenada
Promedio	1045	1253	1318	1280
Desviación (+/-)	45.477	47.584	50.474	58.845

Tabla 4. En esta tabla se resumen las medias del número de puntos inmunoreactivos a sinaptofisina en el área CA3 del hipocampo de cada uno de los 4 grupos. El grupo *0.8 mA solo choque*, señalado con *, tiene una media significativamente menor que el resto de los grupos.

Las siguientes imágenes, en la Figura 12, son ejemplos representativos de la inmunoreactividad a la sinaptofisina en los 4 grupos experimentales.



Figura 12. Microfotografías que muestran imágenes representativas de la inmunoreactividad a sinaptofisina en el área CA3 del hipocampo dorsal en ratas pertenecientes a cada uno de los cuatro diferentes grupos experimentales. Las imágenes tienen una amplificación de 40X. El panel superior muestra los puntos reactivos a sinaptofisina de ratas que recibieron un choque fuera del contexto de la tarea de evitación inhibitoria. El panel inferior muestra los puntos reactivos de ratas que fueron entrenadas en la tarea, ya sea con un choque de 0.8 o de 1 mA. Se puede observar un menor número de puntos reactivos en la imagen que corresponde a una rata que recibió el choque fuera de la cámara de evitación inhibitoria (arriba, izquierda). No se encontraron diferencias entre los otros tres grupos.

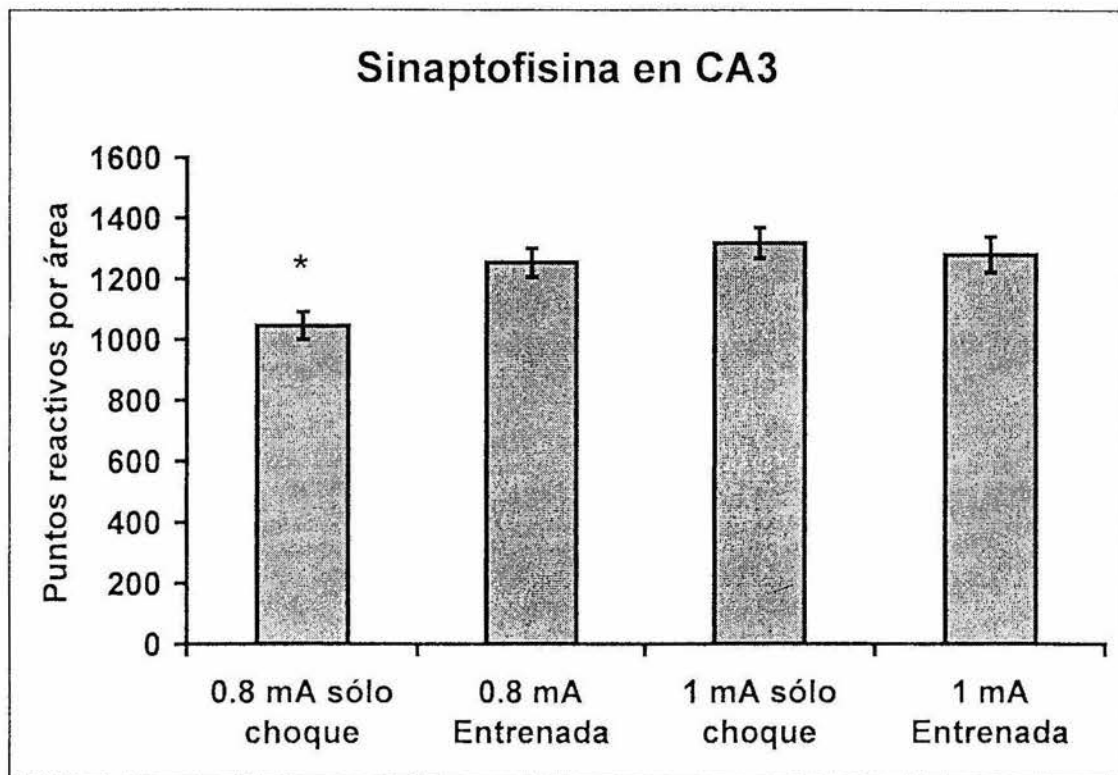


Figura 13. Cuantificación de puntos reactivos a sinaptofisina en la región CA3 del hipocampo dorsal. En el grupo de ratas entrenadas con 0.8 mA se encontró una mayor cantidad de puntos reactivos en esta área al compararla con el grupo de ratas que recibieron un choque de la misma intensidad, pero que no fueron entrenadas en la tarea. (0.8 mA sólo choque). *, $p < 0.05$.

El análisis cuantitativo puso en evidencia que, tal como se muestra en la figura 13, en las ratas que recibieron el choque eléctrico de 0.8 mA y que modificaron su latencia de retención a raíz de ese choque, se observó un mayor número de puntos inmunoreactivos a sinaptofisina comparadas con aquellas que recibieron el choque, pero no adquirieron la tarea. Estos resultados se interpretan como una mayor densidad de sinapsis en el campo CA3 en el grupo entrenado y por lo tanto como un cambio directamente asociado al aprendizaje de la tarea. Por el contrario, en el grupo entrenado con 1 mA, no se observó una diferencia con respecto al grupo sometido al choque, pero que no aprendió la tarea. Es este caso no existe un cambio en la densidad de las sinapsis asociado al aprendizaje. Por otra parte, en las ratas sometidas al choque de 1 mA se observó un incremento en los puntos reactivos a sinaptofisina con respecto a las ratas sometidas a un choque de 0.8 mA. Este resultado muestra

que el sólo incremento en la intensidad del choque eléctrico produce un incremento en la densidad de las sinapsis, pero este incremento no está asociado al aprendizaje de la tarea de evitación inhibitoria. Es posible que este incremento se encuentre asociado al aprendizaje del contexto entre la cámara donde se recibió el choque y el choque mismo. Este aprendizaje podría ser más robusto en el caso de los animales sometidos al choque de 1 mA y esta cualidad se ve reflejada en el aumento de puntos reactivos a sinaptofisina. Sin embargo, este experimento tiene otro objetivo y por lo tanto, no puede mostrarse únicamente con estos datos si el incremento de la densidad de las sinapsis en los grupos control está o no asociada a la formación de la memoria. Lo que sí puede afirmarse, es que en los grupos control, el incremento de sinaptofisina está asociado al incremento en la intensidad del choque eléctrico.

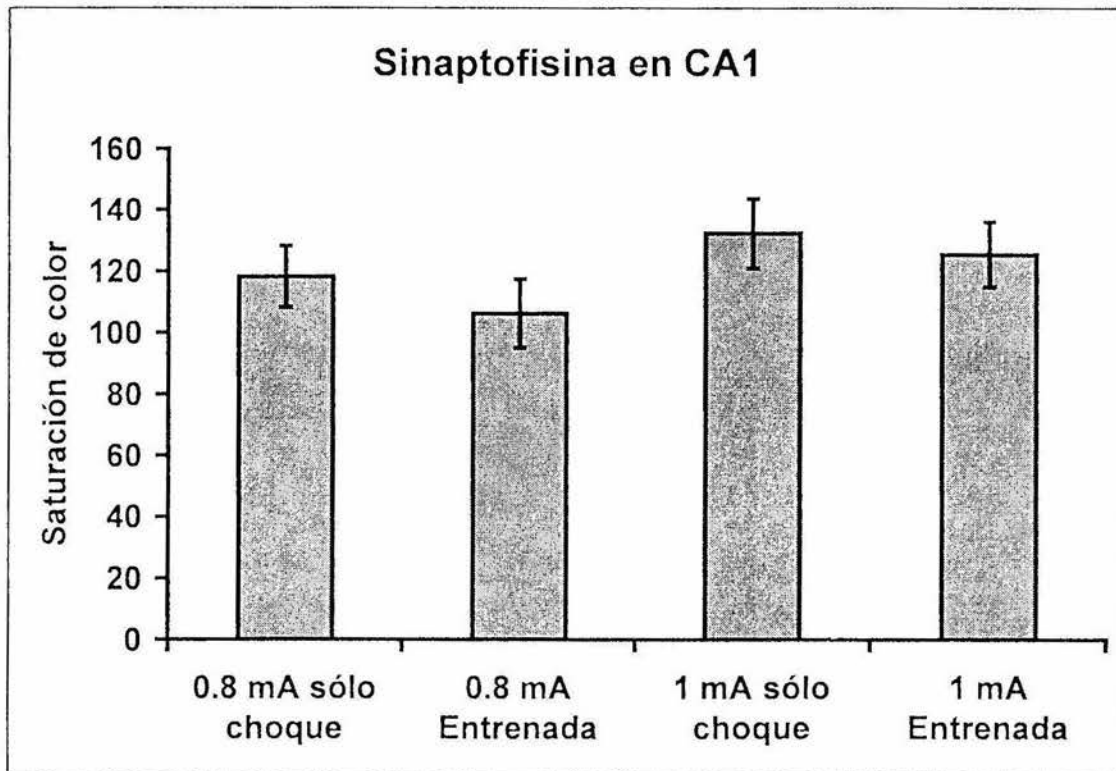


Figura 14. En esta gráfica se muestra la intensidad de la reacción que revela la presencia de sinaptofisina en el área CA1 del hipocampo, cuantificada como intensidad de color en grupos de ratas entrenadas con 0.8 ó 1 mA (Entrenada), o que recibieron un choque eléctrico en una cámara diferente a la de la prueba de evitación inhibitoria (Sólo choque). No existen diferencias significativas entre los grupos.

El análisis de los datos en CA1 no mostró diferencias entre ninguno de los grupos, a pesar de que esta región del hipocampo, de acuerdo con la literatura, es señalada como un lugar donde los cambios sinápticos asociados a la formación de la memoria son muy probables. Es posible que en este caso concreto, la resolución que permite esta preparación sea un límite para observar cambios en esta región del hipocampo. Cabe recordar que la cuantificación como saturación de color en esta región se hizo porque con la resolución del microscopio óptico no es posible observar individualmente el marcaje de las sinapsis.

La otra interpretación de estos resultados, es que no ocurren cambios significativos en la densidad de las sinapsis en esta región asociados a la formación de la memoria en esta tarea, lo que no descarta que la modulación

de estas sinapsis ocurra en un nivel más sutil que el que puede ser revelado con la cuantificación de los niveles de sinaptofisina.

DISCUSIÓN

Alto choque e inactivación del hipocampo

Los resultados muestran que cuando el hipocampo dorsal es inactivado con TTX durante el período inmediato posterior al entrenamiento con un choque de 0.8 mA, se observa un cuadro amnésico en la prueba de retención realizada 48 horas después. Durante la prueba de retención 48 horas después del entrenamiento, la toxina ya no ejerce efecto sobre el hipocampo (según demuestran los ensayos inmunohistoquímicos); por lo tanto, el cuadro amnésico puede explicarse por un bloqueo en el proceso de consolidación en el hipocampo. Es posible descartar la explicación de que el cuadro amnésico observado se debe a una interferencia en el proceso de evocación, porque en el momento en el que se realiza la prueba de retención, la toxina ya no produce efectos inhibitorios detectables. El tiempo de inactivación y recuperación después de la administración de TTX se corrobora con el experimento donde se observa la expresión inducida de c-fos.

Estos resultados son totalmente congruentes con reportes previos (eg. Lorenzini *et al.*, 1996, 1997) y muestran nuevamente la participación del hipocampo para la consolidación de esta tarea. Sin embargo, debe resaltarse que este cuadro amnésico aparece cuando la intensidad del choque de entrenamiento es de 0.8 mA. Cuando esta intensidad de choque se incrementa a 1 mA, el bloqueo de la actividad del hipocampo dorsal no impide la consolidación y la posterior evocación de la tarea.

Retención medida 30 minutos después del entrenamiento

El resultado de los experimentos en los que la prueba de retención se realiza 30 minutos después del entrenamiento, muestra que aún cuando el hipocampo dorsal se encuentra inactivo, la latencia de retención es similar a los controles, es decir, no hay pérdida significativa de la memoria. Este hecho señala que el hipocampo dorsal no participa en la evocación de esta tarea a corto plazo bajo ninguna de las dos condiciones de entrenamiento. Resultados similares fueron reportados por Martínez *et al.* (2002) después de haber producido una lesión irreversible con ácido kaínico, tanto en el hipocampo dorsal como en el ventral. Los datos también indican que con ambos niveles de intensidad del choque, 0.8 y 1 mA, la tarea puede ser adquirida y evocada.

Los resultados de la retención medida 30 minutos después del entrenamiento, son coherentes con la mayoría de las descripciones del papel del hipocampo en la adquisición y evocación del aprendizaje en el corto plazo. Estos datos poseen concordancia con los reporte hechos en este mismo laboratorio, con respecto al cambio en el papel funcional de estructuras implicadas en la consolidación de la memoria en dependencia de la intensidad del entrenamiento en tareas aversivas (Solana-Figueroa *et al.*, 2002; Cobos-Zapiaín *et al.*, 1996; Ortega *et al.*, 1996; Díaz del Guante *et al.*, 1990; Duran-Arévalo *et al.*, 1990; Cruz-Morales *et al.*, 1992; Perez-Ruiz y Prado-Alcalá, 1989; Giordano y Prado-Alcalá, 1986). De forma parecida, otros estudios semejantes sobre la participación del hipocampo en la tarea de evitación inhibitoria arrojan resultados totalmente compatibles (Lorenzini *et al.*, 1996; Izquierdo y Medina, 1997; Stublely-Weatherly *et al.*, 1996).

Los conceptos clásicos de la memoria señalan la independencia del hipocampo con respecto al mantenimiento y la evocación de la memoria de corto plazo, y a ese respecto, los datos obtenidos en los experimentos de esta tesis en los que se midió la memoria 30 minutos después del entrenamiento son congruentes con las nociones existentes.

Existe, sin embargo, una inconsistencia con algunos resultados existentes en la literatura al comparar los resultados de la memoria de corto plazo medida a los treinta minutos del entrenamiento con los trabajos revisados por Izquierdo y sus colaboradores, con respecto a la separación parcial del proceso de consolidación desde la memoria de corto plazo a la memoria de largo plazo (Izquierdo *et al.*, 1998). En la revisión citada, la administración en el hipocampo del agonista de los receptores 5-HT_{1a}, DPAT, del antagonista a los receptores AMPA de glutamato, CNQX, y del agonista de los receptores a GABA_A, muscimol, después del entrenamiento, inhiben la expresión de la memoria de corto plazo medida como latencia de retención 90 minutos después del entrenamiento. En cambio, midiendo la latencia de retención 120 minutos, 4 horas y 24 horas después, ésta es equivalente a la de los grupos control.

La administración de TTX bloquea la actividad de las células del hipocampo, incluyendo, al menos en principio, la actividad inducida por la activación de los receptores 5-HT_{1a}, blanco del DPAT, y la actividad producida por la activación de los receptores metabotrópicos a glutamato, blanco del CNQX. Por lo tanto, sería de esperar una deficiencia en la retención medida a los 30 minutos, cuando la actividad del hipocampo ha sido suprimida por acción de la TTX.

Sin embargo, en el trabajo experimental de esta tesis, no se observa deficiencia en la retención de la memoria medida 30 minutos después del entrenamiento. Ni aún en los grupos entrenados con un choque moderado cuya retención de largo plazo, a las 48 horas, es abolida por el tratamiento de TTX.

Existen varios argumentos para explicar las diferencias entre los resultados de ambos experimentos: el primero guarda relación con el período de tiempo transcurrido entre el entrenamiento y la prueba de retención, de 30 minutos en el caso de los experimentos reportados aquí y de 90 minutos para los trabajos de Izquierdo y sus colaboradores. En ambos casos se asume que se está midiendo la memoria de corto plazo, misma que no es dependiente de la síntesis de proteínas y sí de cambios en las proteínas preexistentes. Esta diferencia de tiempo entre ambas pruebas de retención puede explicar porqué sí se observa una retención eficiente en el caso de los animales cuyo

hipocampo está inactivo y son probados treinta minutos después del entrenamiento.

Esta hipótesis puede probarse midiendo la retención 90 minutos después del entrenamiento a sujetos en los que se ha inactivado con TTX el hipocampo después del entrenamiento o, en su caso, probando la retención de ratas inyectadas inmediatamente después del entrenamiento con DPAT, CNQX o musimol, treinta minutos después del entrenamiento.

El mismo Izquierdo reporta los resultados de la infusión de algunos fármacos en la región CA3 del hipocampo justo antes del entrenamiento, realizando la prueba de retención inmediatamente después del entrenamiento. Los datos demuestran que agonistas de los receptores GABA_A producen un deterioro significativo en la evocación de la tarea. Sin embargo, el administrar algunos de estos fármacos antes del entrenamiento hace difícil distinguir si el deterioro en la retención medido menos de 10 minutos después del aprendizaje puede atribuirse a una deficiencia en la evocación o a que, bajo los efectos de los fármacos, la tarea no fue adquirida.

Estos resultados no son coherentes con los resultados obtenidos en el presente estudio al medir la retención 30 minutos después del entrenamiento. De acuerdo con los resultados de Izquierdo y colaboradores, el agonista de los receptores GABA, musimol, que actúa en la misma dirección que la TTX inhibiendo la actividad de las células, produce un deterioro en la retención de la tarea cuando esta retención es medida dentro del primer minuto después del entrenamiento. Este deterioro se observa también cuando la retención es medida 90 minutos después del entrenamiento.

Es más probable que se encuentre que a los treinta minutos estas ratas con tratamientos que sugieren la disociación entre el mantenimiento de la memoria de corto plazo y la memoria de largo plazo, tengan una retención eficiente. De hecho, según los estudios citados, se eligió hacer esta prueba a los 90 minutos (y no antes) porque se asume que la memoria que puede ser medida inmediatamente después del entrenamiento depende más de fenómenos

descritos por el modelo de reverberación de circuitos que de la modificación covalente de proteínas existentes.

Otra de las explicaciones posibles para la disparidad de resultados en el caso del musimol, es que aunque actúa en la misma dirección que la TTX, promoviendo la inhibición de las células nerviosas, lo hace a través de la activación de receptores a GABA, mientras la TTX actúa funcionalmente como bloqueador de los canales de Na^+ , En cada caso se encuentra implicado un mecanismo diferente de inactivación.

El caso más interesante resulta del análisis de los resultados obtenidos aquí al medir la retención a corto plazo y los resultados reportados cuando se administra el agonista de los receptores 5HT1a, DPAT, en el hipocampo. La población de células inmunopositivas al receptor 5-HT1a es escasa en la región CA1 del hipocampo dorsal. Existe una concentración importante de las células del hipocampo que poseen este receptor en la región CA3. (Figura 15).

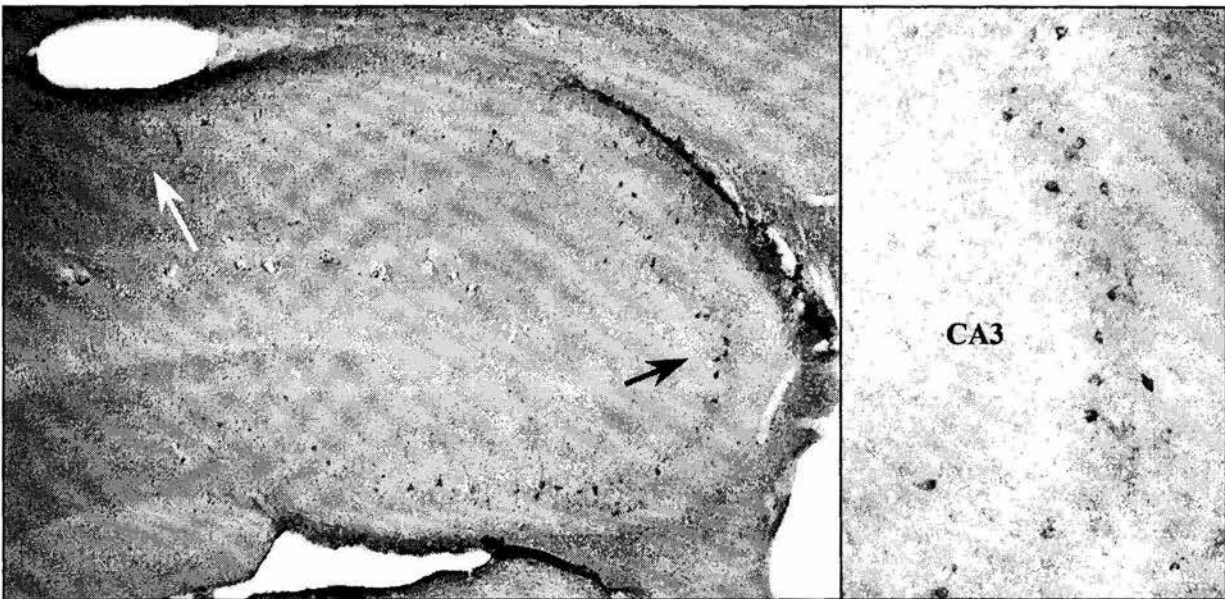


Figura 15. Distribución de las células que poseen el receptor 5-HT1a en el hipocampo dorsal. En el campo CA3 se observan células marcadas por inmunohistoquímica con el anticuerpo contra los receptores 5-HT1a (flecha negra), ampliadas en el recuadro a la derecha. En el campo CA1 (flecha blanca) se aprecian menos células marcadas.

Los estudios de difusión de la TTX muestran que, treinta minutos después de inyectarla, se encuentra inactiva la región CA1 mientras permanece con cierta actividad la región CA3. Noventa minutos después de inyectar TTX, la región CA3 pierde también su actividad. Esta diferencia entre la difusión de la TTX a los 30 minutos (cuando aún no alcanza la región CA3 del hipocampo dorsal) y la difusión 90 minutos después de ser inyectada (cuando las células del campo CA3 se encuentran ya inactivas), puede ser la razón de la diferencia de resultados observada entre los reportes de Izquierdo midiendo retención a los 90 minutos y hallando amnesia, y los resultados reportados aquí, donde a los 30 minutos del entrenamiento, la inactivación del hipocampo con TTX no produce un cuadro amnésico.

Los ensayos inmunohistoquímicos revelan que la TTX mantiene inactivo al hipocampo durante la prueba de retención, 30 minutos después del entrenamiento. De igual forma, revelan que su efecto se mantiene al menos 90 minutos tras su aplicación y que 48 horas después su efecto ha cesado completamente.

Los ensayos en los que se utilizó PTZ como estimulador de la expresión de *c-fos*, sugieren que la inactivación producida por la inyección de TTX no se limita al hipocampo sino que, bajo nuestras condiciones experimentales, en algunos sujetos puede extenderse a la corteza parietal. Para descartar la posibilidad de que la inactivación en la corteza producida por la TTX sea la responsable del deterioro en la consolidación al entrenar a los animales con 0.8 mA, se añadió un grupo control en el cual, 5 minutos después del entrenamiento, se realizó la inyección de 10 ng/ μ l de TTX directamente en la corteza parietal. Los resultados conductuales mostraron que la infusión de TTX en la corteza después del entrenamiento no impide la consolidación de la tarea (figura 6).

Cambios en la expresión de sinaptofisina

La cuantificación de los niveles de sinaptofisina de cada grupo experimental es una tentativa para discernir cuál es la naturaleza de los cambios que ocurren en el hipocampo y que le permiten transformarse de una estructura crucial para la consolidación de esta tarea, en una estructura prescindible. Para cada uno de los dos grupos experimentales, el grupo control consistió en ratas a las que se aplicó un choque eléctrico de la misma intensidad fuera de la cámara de condicionamiento, y que a consecuencia de ese choque no modificaron su latencia de retención en la prueba conductual en la que esa retención se midió; es decir, no aprendieron la tarea de evitación inhibitoria.

La aplicación de un choque eléctrico por sí sólo, fuera del contexto de una prueba conductual, produce cambios en la expresión de proteínas (Imaki *et al.*, 1993; Rassnick *et al.*, 1998; Passerin *et al.*, 2000). Además de los efectos previsibles sobre la liberación de epinefrina y hormonas corticoides, muy probablemente los sujetos sometidos a este tipo de protocolos experimentales crean una asociación entre el lugar donde se aplican los choques y el choque mismo, tal como ocurre cuando se condiciona contextualmente el miedo en las ratas. Sin embargo, en el presente experimento las consecuencias de esta probable asociación en el comportamiento no se miden. Lo que se mide es la latencia de retención cuando las ratas son expuestas de nuevo al ambiente donde recibieron el choque y pueden modificar su conducta para evitarlo. Los grupos control, bajo este diseño, reciben igualmente el choque, pero no modifican su comportamiento a raíz de esta experiencia porque no vuelven a exponerse al ambiente en el que lo recibieron.

Una hipótesis acerca de porqué la consolidación puede llevarse adelante sin la participación del hipocampo bajo condiciones de entrenamiento intenso, es que este proceso es llevado a cabo por alguna otra estructura, tal como la amígdala, o la corteza. Se ha demostrado una importante participación de la amígdala en las tareas condicionadas aversivamente. McGaugh (1996, 2002) reseña que la presencia de estímulos aversivos intensos promueve la

participación de la amígdala en el proceso de consolidación. A su vez, la amígdala modula la participación de otras regiones adicionales en el cerebro para que la consolidación se lleve a cabo. La activación de receptores β -adrenérgicos y receptores a glucocorticoides en la amígdala después del entrenamiento incrementan la retención. Sin embargo, la memoria ya consolidada puede evocarse aún sin la participación de la amígdala.

De hecho, se propone un modelo de diferentes pesos del papel funcional del hipocampo y la amígdala que cambia en función de la intensidad del estímulo aversivo o, vale decir, de la relevancia del evento de aprendizaje para el organismo. En este esquema de importancia relativa en dependencia de la intensidad del estímulo, el hipocampo participa preferentemente cuando esta intensidad es relativamente baja, mientras la amígdala no se involucra en este nivel de estimulación. Por el contrario, cuando la intensidad del estímulo aversivo presente en el evento de aprendizaje se incrementa, la amígdala participa activamente, restando preponderancia a la participación del hipocampo. Numerosos estudios experimentales ofrecen datos que sustentan este modelo.

El incremento en la expresión de sinaptofisina asociado al aprendizaje bajo este diseño experimental, es por sí sólo un hallazgo interesante. Los modelos más aceptados sobre la presencia de cambios estructurales en el sistema nervioso asociados al aprendizaje sugieren que estos cambios ocurren en las sinapsis. Sin embargo, aún cuando estos modelos proponen que tales modificaciones son uno de los requisitos fundamentales del establecimiento de la memoria, las pruebas directas de éstas no son especialmente abundantes en la literatura.

Moser (1994) reportó un incremento en la densidad sináptica del campo CA1 en ratas adultas, asociado al entrenamiento en tareas espaciales. Sin embargo, las diferencias no fueron medidas en grupos entrenados y no entrenados, sino en grupos expuestos a ambientes enriquecidos que aprendían más eficientemente la tarea. Moser midió la morfología general de las terminales, pero no proteínas específicas asociadas a las sinapsis. Sus resultados ilustran

que el incremento ocurre en los botones sinápticos, mientras la longitud de las terminales no varía.

Rusakov *et al.* (1997) no encontraron cambios morfológicos asociados al entrenamiento en la tarea de laberinto acuático después de un exhaustivo análisis ultraestructural de las sinapsis de CA1 y del giro dentado del hipocampo. La única diferencia entre animales entrenados y no entrenados hallada en el estudio de Rusakov fue una mayor frecuencia de terminales sinápticas próximas en CA1.

Otras aproximaciones han tenido resultados más acordes con su fundamento teórico: Ramírez-Amaya y sus colaboradores (1999, 2001) encontraron un incremento en el área reactiva a la tinción de Timm en la región CA3 del hipocampo dorsal asociado al entrenamiento en la tarea de laberinto acuático de Morris. Asociado a la consolidación de la memoria en la misma tarea, O'Malley *et al.* (2000) encontraron un incremento en la densidad de espinas dendríticas en el giro dentado del hipocampo. Dos años antes, O'Malley *et al.* (1998) habían reportado cambios ultraestructurales asociados a la tarea de evitación inhibitoria en el giro dentado del hipocampo.

En una continuación del trabajo de Rusakov, Eyre *et al.*, 2003, mostraron que sí existe un incremento en la cantidad de sinapsis en el giro dentado del hipocampo asociado al entrenamiento en la tarea del laberinto acuático, pero este incremento es solo temporal y se observa a las 9 horas después del último ensayo en la tarea. En contraste, este incremento no pudo ser observado ni 3 ni 24 horas después de la última sesión de entrenamiento.

Este punto en el tiempo durante el cual pueden observarse los cambios en la densidad de las sinapsis posee una interesante similitud con el periodo de tiempo reportado por el grupo de Izquierdo y Medina (1997), durante el cual la consolidación de la memoria es sensible a la interferencia con la cascada de señales de la MAPK (Walz *et al.*, 2000), a la interrupción de la producción de ARNm (Igaz *et al.*, 2002) o al bloqueo de la síntesis de proteínas con anisomicina (Quevedo *et al.*, 1999).

Otro de los fenómenos que se presentan en el aprendizaje asociado a estímulos aversivos intensos en las ratas es la liberación de hormonas corticoides y adrenalina por las glándulas suprarrenales.

El estrés producido por choques eléctricos repetidos durante 15 minutos produce una acumulación del marcador de actividad neuronal *c-fos* en el hipocampo, además de otras áreas relacionadas íntimamente con la respuesta del organismo al estrés. Estas áreas coinciden en su mayor parte con la expresión de *c-fos* inducida después de inyectar en los ventrículos el factor liberador de corticotropina para simular la respuesta neuroendocrina a esta condición (Imaki *et al.*, 1993).

La acción de estas hormonas cambia notablemente la forma en que se produce la consolidación y evocación (Cordero *et al.*, 2002). A su vez, tanto la consolidación como la evocación se encuentran moduladas principalmente por la activación de receptores α_1 -adrenérgicos, β -adrenérgicos y receptores a glucocorticoides en la amígdala (Roozendaal *et al.*, 2002). Se ha demostrado ampliamente que la presencia de estas hormonas facilita la formación de la memoria (Sandi, 1998; Cordero y Sandi, 1998; Cordero *et al.*, 1998). Por el contrario, la supresión adrenocortical elimina esta facilitación (Liu *et al.*, 1999,). Singularmente, en algunos casos el estrés que facilita la formación de la memoria produce una disminución de las sinapsis en CA3, mientras el cambio en el comportamiento persiste (Sandi *et al.*, 2003). Se ha probado que la estimulación de la expresión en el hipocampo de un gen denominado *serum- and glucocorticoid-inducible kinase (skg)*, que es activado precisamente por la presencia de glucocorticoides, favorece la consolidación de la memoria en la tarea de laberinto acuático de Morris (Tsai *et al.*, 2002).

La aplicación de un choque eléctrico como el que se utilizó en los experimentos descritos en esta tesis, constituye un estímulo lo suficientemente intenso para que la cantidad de hormonas asociadas al estrés se incremente en forma importante y active receptores que pueden constituir algunas de las vías alternas a las que involucran al hipocampo, a través de las cuáles el proceso de consolidación se lleva finalmente a cabo. Es posible que, como este tipo de

señales viaja por la corriente sanguínea y ésta a su vez irriga todo el cerebro, estas hormonas y mensajeros químicos representen las conexiones paralelas que intervienen en la consolidación de la memoria bajo condiciones de alto reforzamiento. Se ha mostrado que la acción de estas hormonas y de la epinefrina sobre la formación de la memoria se encuentra mediada principalmente por la amígdala; la administración de antagonistas de los receptores adrenérgicos en esta estructura, bloquea la facilitación de la memoria producida por la activación de receptores a glucocorticoides con dexametasona (Quirarte *et al.*, 1997). Otro estudio muestra que a lesión de la amígdala deteriora la adquisición de la conducta asociada al condicionamiento contextual, y este deterioro no puede ser superado por un protocolo de reforzamiento intensivo (Maren, 1998).

Estos datos, sumados a los resultados descritos aquí, sugieren que el efecto del alto choque eléctrico sobre la consolidación de la memoria puede ser mediado por la activación simultánea de receptores glucocorticoides y β -adrenérgicos en la amígdala basolateral. Los procesos desencadenados por la activación de estos receptores en la amígdala, pueden ser los que permiten la consolidación de la memoria aún en ausencia de la actividad del hipocampo dorsal. Esta es precisamente una de las líneas de trabajo que en este momento se exploran en el laboratorio. No obstante, es importante acotar que esta explicación de los mecanismos que operan en el efecto del alto reforzamiento se restringe a los aprendizajes motivados por estímulos aversivos.

Los datos arrojados por un estudio donde se observa el efecto del alto reforzamiento en tareas apetitivas, sugieren la posibilidad de que el proceso de consolidación se acelere (Díaz del Guante *et al.*, 1993). En este contexto, otra hipótesis acerca de cómo se consolida esta tarea sin la participación del hipocampo en condiciones de alto reforzamiento, consiste en que con el choque intenso, el papel del hipocampo en la consolidación puede acelerarse hasta el punto de que en pocos minutos cumpla con su papel crucial en este proceso, de forma que cuando la toxina inactiva las células en el hipocampo, la estructura ya ha dejado de constituir un punto sensible en la fase de la consolidación. Esta hipótesis puede probarse experimentalmente inyectando el

inactivador antes de la sesión de entrenamiento con un choque intenso; de esta forma no hay oportunidad de que los procesos que ocurren en el interior de la estructura se lleven a cabo. Los resultados preliminares de este experimento, realizados por Garín-Aguilar *et al.*, (2003), muestran que la administración de TTX en el hipocampo, previa al entrenamiento con un choque intenso, no impide la posterior evocación de la tarea. Con estos datos, la hipótesis de que el choque intenso acelera la consolidación en el hipocampo pierde sustento.

Implicaciones de los resultados en la práctica psicológica

Resulta necesario mencionar brevemente que las alteraciones en la función del hipocampo, ya sea producidas reversiblemente en modelos animales o las que presentan algunos pacientes, impiden la consolidación de tareas que en humanos se clasifican como dependientes de la memoria declarativa, pero no impiden la consolidación de tareas de memoria no declarativa. Es decir, el hipocampo parece desempeñar al menos dos funciones en el contexto de la formación de la memoria: la adquisición de tareas espaciales, y la consolidación del tipo de tareas que se clasifican como memoria declarativa o explícita. La consolidación de tareas no declarativas o implícitas no parece verse afectada por la interferencia en la actividad del hipocampo.

Este hecho se traduce en este contexto como que la consolidación de la memoria para ciertas tareas, se lleva adelante sin la participación del hipocampo, pero esto sucede con las tareas de tipo no declarativo. ¿En qué forma el aprendizaje con un alto reforzador provoca que las tareas de tipo declarativo adquieran la característica de ser consolidadas independientemente de la actividad del hipocampo, propia de las memorias de tipo implícito?

En humanos, el momento en el que es más notoria la distinción entre el tipo de recuerdos que pueden conservarse y los que no, es durante los primeros meses y aún años de vida, en los cuales la formación del hipocampo no posee aún la funcionalidad de un individuo de mayor edad. El hecho de que nuestros resultados indiquen que es posible llevar adelante la consolidación de la memoria sin la participación del hipocampo, tiene interesantes implicaciones para la práctica neuropsicológica. Las lesiones agudas o difusas del lóbulo temporal producidas por un traumatismo, un accidente vascular o por epilepsia, pueden producir cuadros de amnesia de diferentes características. Generalmente se producen cuadros de amnesia anterógrada, los cuales consisten en que la memoria reciente se consolida con mucha dificultad y no pasa a formar parte de la memoria de largo plazo. Ciertos contenidos son más difíciles de consolidar que otros y esa diferencia puede depender de la región

comprometida, del tipo de lesión y de las estrategias cognoscitivas con las que el sujeto compensa su deficiencia. Algunas de las aportaciones con las que pueden contribuir los resultados en este trabajo a la práctica psicológica incluyen el concepto de que bajo ciertas condiciones, es posible consolidar la memoria aunque las estructuras implicadas en la consolidación bajo circunstancias normales estén seriamente comprometidas. Nuestros resultados, en primer lugar, señalan que esto es posible aún para el tipo de tareas en las que el hipocampo se encuentra estrechamente relacionado.

Es importante resaltar que aunque aquí se muestra que la memoria de tipo asociativo puede formarse incluso con el hipocampo inactivo, reproduciendo parcialmente el efecto de una lesión, este no necesariamente se puede extrapolar a la función de un individuo con una lesión permanente en el hipocampo. La estrategia de la inactivación reversible se escogió para describir algunas cualidades del sistema de consolidación de la memoria, no para reproducir en un modelo animal los signos clínicos producidos por la lesión del hipocampo y la forma de revertirlos. Sin embargo, es posible extrapolar que bajo los efectos agudos de un fármaco, tal como sucede en el caso de una intoxicación alcohólica, o bajo los efectos agudos de depresores del sistema nervioso tales como las benzodiazepinas, los episodios de lagunas mentales que implican fallas temporales en la consolidación de la memoria no se observarán en el caso de eventos de gran relevancia para el sujeto. De acuerdo con lo que se conoce sobre la capacidad de consolidar un evento o de evocar la memoria sobre un evento ya consolidado, la memoria sobre un evento relevante persistirá.

Autores como McGaugh *et al.*, (1996, 2002) han propuesto la aplicación de los hallazgos de la neurobiología de la memoria a la terapia clínica en síndrome de estrés posttraumático de acuerdo con las premisas de que la presencia de un evento emocionalmente intenso refuerza la memoria y se conoce que esta memoria es muy resistente y recurrente.

Sin embargo, algunas de las características indeseables de la memoria adquirida en eventos traumáticos podrían atenuarse si es posible actuar sobre

ellos dentro de un corto margen de tiempo. El fenómeno de interferencia sucede cuando la memoria se está consolidando y consiste en que se bloquea la formación de la memoria sobre un evento inmediatamente anterior. En investigación básica, se ha mostrado que la interferencia de un aprendizaje nuevo causada por un evento anterior ocurre probablemente por el agotamiento temporal del sustrato de las proteínas que deben ser fosforiladas para que la consolidación suceda (Izquierdo, 2002).

Otros trabajos recientes rescatan la idea de que la evocación de un evento, es decir, la recuperación de la memoria de largo plazo ya consolidada, hace que esta memoria evocada tenga las características de la memoria de corto plazo, incluyendo la susceptibilidad de ser interferida en este periodo (Myers y Davis, 2002). Sin embargo, es posible que esto ocurra sólo con la memoria de eventos no muy relevantes y que la memoria de eventos traumáticos sea muy resistente a la interferencia.

Tal como describe Jorge Luis Borges a su personaje Irineo Funes, en *Funes el memorioso*, él era capaz no sólo de recordar cada hoja de cada árbol que había visto, sino también cada una de las veces que las había recordado. En el caso de la memoria prodigiosa de este personaje, este recordar sobre los recuerdos era tan preciso y duradero como la memoria que tenía sobre lo que sucedía en el mundo delante de sus ojos.

Conclusiones

Los datos generados por este proyecto de investigación muestran que el hipocampo dorsal forma parte de las estructuras cuyo papel en la consolidación se reorganiza a raíz del entrenamiento intenso en evitación inhibitoria, es decir, participa en la consolidación de la memoria en una tarea específica, pero con altos niveles de reforzamiento la consolidación de la memoria para esta tarea es posible aún sin la actividad del hipocampo dorsal. Esta reorganización funcional se encuentra asociada a un cambio en la densidad de la sinaptofisina en la región CA3 del hipocampo. Los resultados indican que existe una representación diferente del aprendizaje en el hipocampo dependiendo de la intensidad de entrenamiento y sugieren que parte de esa diferencia en algunos de los elementos del sistema nervioso implicados en la formación de la memoria es producida por el incremento en la densidad de sinaptofisina en el aprendizaje no sobrerreforzado. Este incremento no ocurre en el caso del entrenamiento con un estímulo intenso. De esta forma, el sistema nervioso de los mamíferos que comparten las características de la especie en la que se realizaron estos estudios, en lo que se refiere a la formación de la memoria, posiblemente ha logrado desarrollar una forma de asegurar su persistencia para aquellos eventos que poseen una relevancia muy alta para la supervivencia.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ambrogio Lorenzini, C.G., Baldi, E., Bucherelli, C., Sacchetti, B. & Tassoni, G. (1999). Neural topography and chronology of memory consolidation, review of functional inactivation findings. *Neurobiology of Learning and Memory*, **71**(1)1-18.
- Barros, D., Mello, T., De David, T., Choi, H., Aguzzoli, A., Madche, C., Ardenghi, P., Medina, J. & Izquierdo, I. (2001). Simultaneous modulation of retrieval by dopaminergic D1, b-noradrenergic, serotonergic-1^a and cholinergic muscarinic receptors in cortical structures of the rat. *Behavioural Brain Research*, **124**,1-7.
- Bernabeu, R., Bevilaqua, L., Ardenghi, P., Bromberg, E., Schmitz, P., Bianchin, M., Izquierdo, I. & Medina, J.H. (1997). Involvement of hippocampal cAMP/cAMP-dependent protein kinase signaling pathways in a late memory consolidation phase of aversively motivated learning in rats. *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**, 7041–7046.
- Bianchin, M., Da Silva, R.C., Schmitz, P.K., Medina, J.H. & Izquierdo, I. (1994). Memory of inhibitory avoidance in the rat is regulated by glutamate metabotropic receptors. *Behavioral Pharmacology*, **5**, 356–357.
- Boehnke, S. & Rasmusson, D. (2001). Time course and effective spread of lidocaine and tetrodotoxin delivered via microdialysis: an electrophysiological study in cerebral cortex. *Journal of Neuroscience Methods*, **105**, 133–141.
- Calhoun, M.E., Jucker, M., Martin, L.J., Thinakaran, G., Price, D.L. & Mouton, P.R. (1996). Comparative evaluation of synaptophysin-based methods for quantification of synapses. *Journal of Neurocytology*, **25**, (12), 821-828.
- Cammarota, M., Izquierdo, I., Wolfman, M., Levi de Stein, M., Bernabeu, Jerusalinsky, D., & Medina, J.H. (1995). Inhibitory avoidance training induces rapid and selective changes in [3H]AMPA receptor binding in the rat hippocampal formation. *Neurobiology of Learning and Memory*, **64**, 257–264.
- Cavallaro, S., Schreurs, B.G., Zhao, W., D'Agata, V., & Alkon, D.L. (2001). Gene expression profiles during long-term memory consolidation. *European Journal of Neuroscience*, **13**, (9), 1809-1815.
- Cavallaro, S., D'Agata, V., Manickam, P., Dufour, F. & Alkon, D.L. (2002). Memory-specific temporal profiles of gene expression in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA*, **99**, (25), 16279-16284. Addendum.

Cavallaro, S., D'Agata, V. & Alkon, D.L. (2002). Programs of gene expression during the laying down of memory formation as revealed by DNA microarrays. *Neurochemical Research*, **27**, (10), 1201-1207.

Cavallaro, S. & D'Agata, V. (2003) A genomic approach to explore the pathophysiology of cognition. Sixth IBRO World Congress of Neuroscience.

Cimadevilla, J.M., Fenton, A.A. & Bures, J. (2000). Functional inactivation of dorsal hippocampus impairs active place avoidance in rats. *Neuroscience Letters*, **285**, (1), 53-56.

Cobos-Zapíaín, G., Salado-Castillo, R., Sánchez-Alavez, M., Quirarte, G., Roldán-Roldán, G., Díaz del Guante, M. & Prado-Alcalá, R. (1996). High level of footshock during inhibitory avoidance training prevents amnesia induced by intranigral injection of GABA antagonists. *Neurobiology of learning and memory*, **65**, 202-206.

Colombo, P.J., Brightwell, J.J. & Countryman, R.A. (2003). Cognitive strategy-specific increases in phosphorylated cAMP response element-binding protein and *c-fos* in the hippocampus and dorsal striatum. *Journal of Neuroscience*, **23**, (8), 3547-3554.

Cordero, M.I., Merino, J.J. & Sandi, C. (1998). Correlational relationship between shock intensity and corticosterone secretion on the establishment and subsequent expression of contextual fear conditioning. *Behavioral Neuroscience*, **112**, (4), 885-891.

Cordero, M.I. & Sandi, C. R. (1998). A role for brain glucocorticoid receptors in contextual fear conditioning: dependence upon training intensity. *Brain Research*, **786**, (1-2), 11-17.

Cordero, M., Kruyt, N., Merino, J. & Sandi, C. (2002). Glucocorticoid Involvement in Memory Formation in a Rat Model for Traumatic Memory. *Stress*, **5**, (1), 73-79.

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

Díaz del Guante, M.A., Carbonell-Hernández, C., Quirarte, G., Cruz-Morales, S.E., Rivas-Arancibia, S. & Prado-Alcalá, R.A. (1993). Intrastratial injection of choline accelerates the acquisition of positively rewarded behaviors. *Brain Research Bulletin*, **30**, (5-6), 671-675.

Díaz del Guante, M.A., Rivas-Arancibia, S., Quirarte, G. & Prado-Alcalá, R.A. (1990). Over-reinforcement protects against memory deficits induced by muscarinic blockade of the striatum. *Bol Estud Med Biol*, **38**, (3-4), 49-53.

- Donahue, C.P., Jensen, R.V., Ochiishi, T., Eisenstein, I., Zhao, M., Shors, T. & Kosik, K.S. (2002). Transcriptional profiling reveals regulated genes in the hippocampus during memory formation. *Hippocampus*, **12**, (6), 821-833.
- Durán-Arévalo, M., Cruz-Morales, S. & Prado-Alcalá, R. (1990) Is Acetylcholine involved in memory consolidation of over-reinforced learning? *Brain Research Bulletin*, **24**, 725-727.
- Eichenbaum, H. (1996). Is the rodent hippocampus just for 'place'? *Current Opinion in Neurobiology*, **6**, 187-195.
- Eichenbaum, H., Otto, T. & Cohen, N. (1992). The Hippocampus-What does it do? *Behavioral and Neural Biology*, **57**, 2-36.
- Erdtmann-Vourliotis, M., Riechert, U., Mayer, P., Grecksch, G. & Höllt, V. (1998) Pentylentetrazole (PTZ)-induced c-fos expression in the hippocampus of kindled rats is suppressed by concomitant treatment with naloxone. *Brain Research*, **792**, 299-308.
- Eyre, M.D., Richter-Levin, G., Avital, A. & Stewart, M.G. (2003). Morphological changes in hippocampal dentate gyrus synapses following spatial learning in rats are transient. *European Journal of Neuroscience*, **17**, (9), 1973-1980.
- Fisher, R. (1989). Animal models of the epilepsies. *Brain Research. Brain Research Reviews*, **14**, (3), 245-278.
- Fox, G.B., Fichera, G., Barry, T., O'Connell, A.W., Gallagher, H.C., Murphy, K.J. & Regan, C.M. (2000). Consolidation of passive avoidance learning is associated with transient increases of polysialylated neurons in layer II of the rat medial temporal cortex. *Journal of Neurobiology*, **45**, (3), 135-141.
- Garín-Aguilar, M., Quiroz, C., Quirarte, G. & Prado-Alcalá, R.A. (2003). Efecto de tetrodotoxina administrada en el hipocampo de rata antes del entrenamiento de una tarea de evitación inhibitoria. Memoria del XLVI Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas.
- Giordano, M. & Prado-Alcalá, R. (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.
- Gisquet-Verrier, P., Dutrieux, G., Richer, P. & Doyere, V. (1999). Effects of lesions to the hippocampus on contextual fear: evidence for a disruption of freezing and avoidance behavior but not context conditioning. *Behavioral Neuroscience*, **113**, (3), 507-522.

- Goldman-Rakic, P. (1996). Regional and cellular fractionation of working memory. *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**, 13473–13480.
- Guzowski, J.F., Setlow, B., Wagner, E.K. & McGaugh, J.L. (2001). Experience-dependent gene expression in the rat hippocampus after spatial learning: a comparison of the immediate-early genes *Arc*, *c-fos*, and *zif-268*. *Journal of Neuroscience*, **21**, (14), 5089-5098.
- He, J., Yamada, K. & Nabeshima, T. (2002). A Role of Fos Expression in the CA3 Region of the Hippocampus in Spatial Memory Formation in Rats *Neuropsychopharmacology*, **26**, 259–268.
- Hernandez, P., Sadeghian, K. & Kelley, A. (2002). Early consolidation of instrumental learning requires protein synthesis in the nucleus accumbens. *Nature Neuroscience*, **5**, (12), 1327-1331.
- Herrera, D. & Robertson, H. (1996). Activation of c-fos in the brain. *Progress in Neurobiology*, **50**, 83-107.
- Hölscher, C. (1999). Synaptic Plasticity and Learning and Memory: LTP and Beyond. *Journal of Neuroscience Research*, **58**, 62–75.
- Igaz, L.M., Vianna, M.R., Medina, J.H. & Izquierdo, I. (2002). Two time periods of hippocampal mRNA synthesis are required for memory consolidation of fear-motivated learning. *Journal of Neuroscience*, **22**, (15), 6781-6789.
- Imaki, T., Shibasaki, T., Hotta, M. & Demura, H. (1993). Intracerebroventricular administration of corticotropin-releasing factor induces c-fos mRNA expression in brain regions related to stress responses: comparison with pattern of c-fos mRNA induction after stress. *Brain Research*, **616**, (1-2) 114-125.
- Izquierdo, I., Barros, D.M., Mello e Souza, T., de Souza, M.M., Izquierdo, L.A. & Medina, J.H. (1998). Mechanisms for memory types differ. *Nature*, **393**, 635-636.
- Izquierdo, I., Medina, J., Vianna, M., Izquierdo, L. & Barros, D. (1999). Separate mechanisms for short- and long-term memory. *Behavioural Brain Research*, **103**, 1-11.
- Izquierdo, I. & Medina, J. (1997). Memory Formation: The Sequence of Biochemical Events in the Hippocampus and Its Connection to Activity in Other Brain Structures. *Neurobiology of learning and memory*, **68**, 285–316.
- Izquierdo, I. & Medina, J.H. (1998). On brain lesions, the milkman and Sigmunda. *Trends in Neuroscience*, **21**, 423–426. (addendum)
- Izquierdo, I., Quillfeldt, J.A., Zanatta, M.S., Quevedo, J., Schaeffer, E., Schmitz, P.K. & Medina, J.H. (1997). Sequential role of hippocampus and

- amygdala, entorhinal cortex and parietal cortex in formation and retrieval of memory for inhibitory avoidance in rats. *European Journal of Neuroscience*, **9**, 786–793.
- Jarrard, L. (1993). On the role of the hippocampus in learning and memory in the rat. *Behavioral and Neural Biology*, **60**, 9-26.
- Kandel, E. (2001). The molecular biology of memory storage: A dialogue between genes and synapses. *Science*, **294**, 1030-1038.
- Kim, J. & Fanselow, M. (1992). Modality-specific retrograde amnesia of fear. *Science*, **256**, 675-677.
- Kitabatake, Y., Hikida, T., Watanabe, D., Pastan, I. & Nakanishi, S. (2003). Impairment of reward-related learning by cholinergic cell ablation in the striatum. *Proc Natl Acad Sci USA*. **100**, (13), 7965-7970.
- Leil, T.A., Ossadtchi, A., Cortes, J.S., Leahy, R.M. & Smith, D.J. (2002). Finding new candidate genes for learning and memory. *Journal of Neuroscience Research*, **68**, (2), 127-137.
- Liu, L., Tsuji, M., Takeda, H., Takada, K. & Matsumiya, T. (1999). Adrenocortical suppression blocks the enhancement of memory storage produced by exposure to psychological stress in rats. *Brain Research*, **821**, (1), 134-140.
- Lorenzini, C., Baldi, E., Bucherelli, C., Sacchetti, B. & Tassoni, G. (1996). Role of dorsal hippocampus in acquisition, consolidation and retrieval of rat's passive avoidance response: a tetrodotoxin functional inactivation study. *Brain Research*, **730**, 32-39.
- Lorenzini, C., Baldi, E., Bucherelli, C., Sacchetti, B. & Tassoni, G. (1997). Role of ventral hippocampus in acquisition, consolidation and retrieval of rat's passive avoidance response memory trace. *Brain Research*, **768**, 242-248.
- Maren, S. (1998). Overtraining does not mitigate contextual fear conditioning deficits produced by neurotoxic lesions of the basolateral amygdala. *Journal of Neuroscience*, **18**, (8), 3088-3097.
- Martínez, I., Quirarte, G.L., Díaz-Cintra, S., Quiroz, C. & Prado-Alcalá, R.A. (2002). Effects of lesions of hippocampal fields CA1 and CA3 on acquisition of inhibitory avoidance. *Neuropsychobiology*, **46**, (2), 97-103.
- McGaugh, J. (2002). Memory consolidation and the amygdala, a systems perspective. *Trends In Neuroscience*, **25**, (9), 456-461.
- McGaugh, J., Cahill L, & Roozendaal B. (1996). Involvement of the amygdala in memory storage: Interaction with other brain systems. *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**, 13508-13514.

- Meiri, N. & Rosenblum, K. (1998). Lateral ventricle injection of the protein synthesis inhibitor anisomycin impairs long-term memory in a spatial memory task. *Brain Research*, **789**, (1), 48-55.
- Moser, E., Moser, M., & Andersen, P. (1993). Spatial-learning impairment parallels the magnitude of dorsal hippocampal-lesions, but is hardly present following ventral lesions. *Journal of Neuroscience*, **13**, 3916-3925.
- Moser, M.B., Trommald, M. & Andersen, P. (1994). An increase in dendritic spine density on hippocampal CA1 pyramidal cells following spatial learning in adult rats suggests the formation of new synapses. *Proc Natl Acad Sci USA*, **91**, 12673-12675.
- Myers K. & Davis, M. (2002) Systems-level reconsolidation: reengagement of the hippocampus with memory reactivation. *Neuron*. **36** (3) : 340-343.
- Nosten-Bertrand, M., Errington, M., Murphy, K., Tokugawa, Y., Barboni, E., Kozlova, E., Michalovich, D., Morris, R., Silver, J., Stewart, C., Bliss, T & Morris, R. (1996). Normal Spatial learning despite regional inhibition of LTP in mice lacking Thy-1. *Nature*, **379**, 826-829.
- O'Connell, C., Gallagher, H.C., O'Malley, A., Bourke, M. & Regan, C.M. (2000). CREB phosphorylation coincides with transient synapse formation in the rat hippocampal dentate gyrus following avoidance learning. *Neural Plasticity*, **7**, (4), 279-289.
- O'Connell, C., O'Malley, A. & Regan, C.M. (1997). Transient learning-induced ultrastructural change in spatially-clustered dentate granule cells of the adult rat hippocampus. *Neuroscience*, **76**, 55-62.
- O'Malley, A., O'Connell, C. & Regan, C.M. (1998). Ultrastructural analysis reveals avoidance conditioning to induce a transient increase in hippocampal dentate spine density in the 6 hour post-training period of consolidation. *Neuroscience*, **87**, (3), 607-613.
- O'Malley, A., O'Connell, C., Murphy, K.J. & Regan, C.M. (2000). Transient spine density increases in the mid-molecular layer of hippocampal dentate gyrus accompany consolidation of a spatial learning task in the rodent. *Neuroscience*, **99**, (2), 229-232.
- Ortega, A., Diaz del Guante, M.A., Prado-Alcalá, R.A. & Alemán, V. (1996) Changes in rat brain muscarinic receptors after inhibitory avoidance learning. *Life Sciences*, **58**, 779-809.
- Parent, M.B., Quirarte, G.L., Cahill, L. & McGaugh, J.L. (1995). Spared retention of inhibitory avoidance learning after posttraining amygdala lesions. *Behavioral Neuroscience*, **109**, (4), 803-807.

- Passerin, A.M., Cano, G., Rabin, B.S., Delano, B.A., Napier, J.L. & Sved, A.F. (2000). Role of locus coeruleus in foot shock-evoked Fos expression in rat brain. *Neuroscience*, **101**, (4), 1071-1082.
- Paxinos, G., & Watson, C. (1997) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Compact third edition. New York: Academic Press.
- Perez-Ruiz, C. & Prado-Alcalá, R. (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. (1985). Is cholinergic activity of the caudate nucleus involved in memory? *Life Sciences*, **37**, 2135-2142.
- Prado-Alcalá, R.A. (1995). Serial and parallel processing during memory consolidation. En: J. L. McGaugh, F. Bermúdez-Rattoni & R. A. Prado-Alcalá (Eds.), *Plasticity in the Central Nervous System. Learning and Memory*. (pp. 57-65). London: Lawrence Erlbaum Publishers.
- Prado-Alcalá, R.A., Bermúdez-Rattoni, F. Velázquez-Martínez, D. & Bacha, 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. & Cobos-Zapalaín, G. (1977). Learning deficits induced by cholinergic blockade of the caudate nucleus as a function of experience. *Brain Research*, **138**, 190-196.
- Quevedo, J., Vianna, M.R., Roesler, R., de-Paris, F., Izquierdo, I. & Rose, S.P. (1999). Two time windows of anisomycin-induced amnesia for inhibitory avoidance training in rats: protection from amnesia by pretraining but not pre-exposure to the task apparatus. *Learning and Memory*, **6**, (6), 600-607.
- Quirarte, G., Cruz-Morales, S., Díaz del Guante, M., García, M. & Prado-Alcalá, R.A. (1993). Protective effect of under-reinforcement of passive avoidance against scopolamine-induced amnesia. *Brain Research Bulletin*, **32**, 521-524.
- Quirarte, G.L., Roozendaal, B. & McGaugh, J.L. (1997). Glucocorticoid enhancement of memory storage involves noradrenergic activation in the basolateral amygdala. *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**, (25), 14048-14053.
- Quiroz C, Martinez I, Quirarte GL, Morales T, Diaz-Cintra S, Prado-Alcala RA. (2003) Enhanced inhibitory avoidance learning prevents the memory-impairing effects of post-training hippocampal inactivation. *Experimental Brain Research* **153** (3) : 400-402.

- Ramírez-Amaya, V., Escobar, M., Chao, V. & Bermudez-Rattoni, F. (1999). Synaptogenesis of Mossy Fibers Induced by Spatial Water Maze Overtraining. *Hippocampus*, **9**, 631–636.
- Ramírez-Amaya, V., Balderas, I., Sandoval, J., Escobar, M.L. & Bermudez-Rattoni, F. (2001). Spatial long-term memory is related to mossy fiber synaptogenesis. *Journal of Neuroscience*, **21**, (18), 7340-7348.
- Rassnick, S., Hoffman, G.E., Rabin, B.S. & Sved, A.F. (1998). Injection of corticotropin-releasing hormone into the locus coeruleus or foot shock increases neuronal Fos expression. *Neuroscience*, **85**, (1), 259-268.
- Roosendaal, B., Quirarte, G.L. & McGaugh J.L. (2002). Glucocorticoids interact with the basolateral amygdala beta-adrenoceptor--cAMP/cAMP/PKA system in influencing memory consolidation. *European Journal of Neuroscience*, **15**, (3), 553-560.
- Rusakov, D., Davies, H. Harrison, E., Diana, G., Richter-Levin, G., Bliss, T & Stewart, M. (1997). Ultrastructural synaptic Correlates of spatial learning in rat hippocampus. *Neuroscience*, **80**, (1), 69-77.
- Sandi, C. (1998) The role and mechanisms of action of glucocorticoid involvement in memory storage. *Neural Plasticity*, **6**, (3), 41-52.
- Sandi, C., Davies, H.A., Cordero, M.I., Rodríguez, J.J., Popov, V.I. & Stewart, M.G. (2003). Rapid reversal of stress induced loss of synapses in CA3 of rat hippocampus following water maze training. *European Journal of Neuroscience*, **17**, (11), 2447-2456.
- Smith, T.D., Adams, M.M., Gallagher, M., Morrison, J.H. & Rapp, P.R. (2000). Circuit-specific alterations in hippocampal synaptophysin immunoreactivity predict spatial learning impairment in aged rats. *Journal of Neuroscience*, **20**, (17), 6587-6593.
- Solana-Figueroa, R., Salado-Castillo, R., Quirarte, G.L., Galindo, L.E. & Prado-Alcalá, R.A. (2002). Enhanced inhibitory avoidance training protects against the amnesic effect of p-chloroamphetamine. *Life Sciences*, **71**, (4), 391-399.
- Stark, C.E., Bayley, P.J. & Squire, L.R. (2002) Recognition memory for single items and for associations is similarly impaired following damage to the hippocampal region. *Learning and Memory*, **9**, (5), 238-242.
- Stubley-Weatherly, L., Harding, J. & Wright, J. (1996). Effects of discrete kainic acid-induced hippocampal lesions on spatial and contextual learning and memory in rats. *Brain Research*, **716**, 29-38.
- Tsai, K.J., Chen, S.K., Ma, Y.L., Hsu, W.L. & Lee, E. H. R. (2002). *sgk*, a primary glucocorticoid-induced gene, facilitates memory consolidation of spatial learning in rats. *Proc Natl Acad Sci USA*, **99**,(6), 3990-3995.

- Thompson, R. & Kim, J. (1996). Memory systems in the brain and localization of a memory. *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**, 13438-13444.
- Walz, R., Roesler, R., Quevedo, J., Sant'Anna, M., Madruga, M., Rodrigues, C., Gottfried, C., Medina, J.H. & Izquierdo, I. (2000). Time-dependent impairment of inhibitory avoidance retention in rats by posttraining infusion of a mitogen-activated protein kinase kinase inhibitor into cortical and limbic structures. *Neurobiology of Learning and Memory*, **73**, (1), 11-20.
- Willoughby, J., Mackenzie, L., Medvedev, A & Hiscock, J. (1997). Fos induction following systemic kainic acid: Early expression in hippocampus and later widespread expression correlated with seizure. *Neuroscience*, **77**, 379-392.
- Zamanillo, D., Sprengel, R., Hvalby, O., Jensen, V., Burnashev, N., Rosov, A., Kaiser, K., Koster, H., Borchardt, T., Worley, P., Lubke, J., Frotscher, M., Kelly, P., Sommer, B., Andersen, P., Seeburg, P & Sakmann, B. (1999). Importance of AMPA receptors for hippocampal synaptic plasticity but not for spatial learning. *Science*, **284**, 1805-1811.
- Zhuravin, Y. & Bures, J. (1991). Exent of the tetrodotoxin induced blockade exmined by pupillary paralysis elicited by intracerebral injection of the drug. *Experimental Brain Research*, **83**, 687-690.
- Zhang, J., McQuade, J.M., Vorhees, C.V. & Xu, M. (2002). Hippocampal expression of c-fos is not essential for spatial learning. *Synapse*, **46**,(2), 91-99.