

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

.....
.....

**“ PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES GLUTAMATERGICOS
Y COLINERGICOS EN LA REGION DE LA CORTEZA INSULAR EN
EL APRENDIZAJE ESPACIAL ”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLOGICAS**

P R E S E N T A:

SANDRA FABIOLA RAMÍREZ ESPARRAGOZA.

ASESOR DE TESIS: DR. FEDERICO BERMÚDEZ RATTONI

MEXICO DF

ABRIL 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

ÍNDICE

RESUMEN

<u>INTRODUCCIÓN</u>	2
<u>La función del hipocampo en la memoria declarativa</u>	6
<u>El glutamato como neurotransmisor en la memoria</u>	8
<u>Los receptores tipo NMDA en el hipocampo</u>	10
<u>La plasticidad del hipocampo en la tarea del laberinto acuático</u>	11
<u>La memoria espacial en el hipocampo y en la corteza insular</u>	12
<u>La organización estructural de la corteza insular</u>	14
<u>Los receptores colinérgicos y su función en la memoria</u>	16
<u>La actividad de los receptores a ACh en el aprendizaje espacial</u>	19
<u>La función del sistema glutamatérgico y colinérgico en la memoria en la corteza insular</u>	20
<u>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</u>	22
<u>HIPÓTESIS</u>	22
<u>OBJETIVO</u>	22
<u>MATERIAL Y MÉTODOS</u>	23
<u>Sujetos experimentales</u>	23
<u>Procedimiento quirúrgico para la implantación de cánulas en la corteza insular</u>	23
<u>Procedimiento de microinyección</u>	23
<u>Procedimientos conductuales</u>	24
<u>Laberinto acuático de Morris</u>	24
<u>Condicionamiento aversivo a los sabores (CAS)</u>	26
<u>Histología</u>	28
<u>RESULTADOS</u>	29
<u>Cortes histológicas de corteza insular</u>	29
<u>Efecto del bloqueo al receptor tipo NMDA en la adquisición del CAS</u>	29
<u>Efecto del antagonista AP5 en la adquisición de la tarea del laberinto acuático</u>	30
<u>Papel de un antagonista al receptor AMPA/kainato en el laberinto acuático</u>	32
<u>Efecto del antagonista escopolamina en la adquisición del CAS</u>	34
<u>Efecto de escopolamina sobre la adquisición de la tarea del laberinto acuático</u>	35
<u>Participación de los receptores colinérgicos en la consolidación de la memoria espacial</u>	39
<u>DISCUSIÓN</u>	42
<u>Los receptores glutamatérgicos en el aprendizaje espacial en la CI</u>	43
<u>Participación de los receptores muscarínicos a ACh en la memoria espacial en la CI</u>	46
<u>CONCLUSIONES</u>	51
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	52

INTRODUCCIÓN

La capacidad de un organismo de interaccionar con su medio para sobrevivir depende en gran medida del conocimiento que tenga de éste. La forma en que adquiere el conocimiento de su entorno se produce a través de la integración y almacenamiento de estímulos que recibe constantemente de lo que le rodea; el mecanismo por medio del cual se adquiere y procesa esta información es conocido como aprendizaje. La posibilidad de recordar eventos importantes después de adquirido un aprendizaje se le denomina memoria.

A la memoria se le ha clasificado de diversas maneras, por ejemplo con respecto a su contenido se divide en: memoria declarativa y memoria no declarativa. La memoria declarativa se ha propuesto como aquella que recupera la información de manera consciente (también ha sido denominada memoria explícita), mientras que la memoria no declarativa (conocida a su vez como memoria implícita), se considera que no tiene acceso a ningún contenido mnemónico, es decir, no se recupera conscientemente (Squire et al., 1992; Bermúdez-Rattoni y Prado-Alcalá, 2001).

La memoria no declarativa involucra cambios en la habilidad de responder apropiadamente a estímulos a través de la práctica, como el resultado de un condicionamiento o costumbre aprendida. Algunas formas contenidas en este tipo de memoria son filogenéticamente antiguas y se han conservado a través del tiempo, como la habituación, la sensibilización y el condicionamiento clásico, ya que han sido observadas en experimentos con animales invertebrados (Milner et al., 1998). A esta memoria se le refiere también como la memoria basada en datos y se clasifica en: habilidades y hábitos, priming (cambios en el desempeño en una tarea como consecuencia de la información a la que se ha expuesto recientemente), aprendizajes asociativos básicos y aprendizajes no asociativos (Squire, 1998).

La memoria declarativa tiene la capacidad de evocación consciente y cuando ya no ocupa nuestra atención dejamos de tener conciencia de ella. Esta memoria se sustenta en expectativas o referencias y almacena representaciones de hechos (denominada también semántica) y de eventos (conocida a su vez como episódica).

A pesar de que no se consideraba que los animales tuvieran una memoria episódica ya que ésta se había definido únicamente para humanos (Tulving, 1983), es a través de estudios experimentales con mamíferos y aves, como se ha descrito una memoria parecida a la episódica, al identificarse a través de criterios conductuales algunos parámetros específicos que acumulan un valor asociativo y de familiaridad del medio, en estas especies. Estos valores de “qué”, “cuándo” y “cómo” (característicos de la memoria episódica en los humanos), se considera que son adquiridos de forma independiente por los animales, por lo que se pueden incluir dentro de esta definición de memoria (Morris, 2001).

Cada uno de estos sistemas de memoria se han relacionado preferencialmente con ciertos substratos neuronales y se han descrito algunas de las estructuras cerebrales involucradas con cada tipo de memoria.

Dentro de las memorias no declarativas se ubicaron estructuras como el estriado, la corteza motora y el cerebelo, el priming se ha relacionado con la neocorteza, las respuestas emocionales con la amígdala, el aprendizaje de asociaciones básicas incluye a la musculatura esquelética y al cerebelo. Finalmente, el aprendizaje no asociativo se correlaciona con las vías reflejas (Squire et al., 1993).

Para las memorias declarativas se tienen definidas áreas cerebrales como el hipocampo; el lóbulo temporal medial; el diencéfalo; las cortezas neocorticales adyacentes alojadas en el surco rinal que son: la corteza entorinal y la corteza peririnal, además de la región parahipocampal (Squire et al., 1993). Ver figura 1.

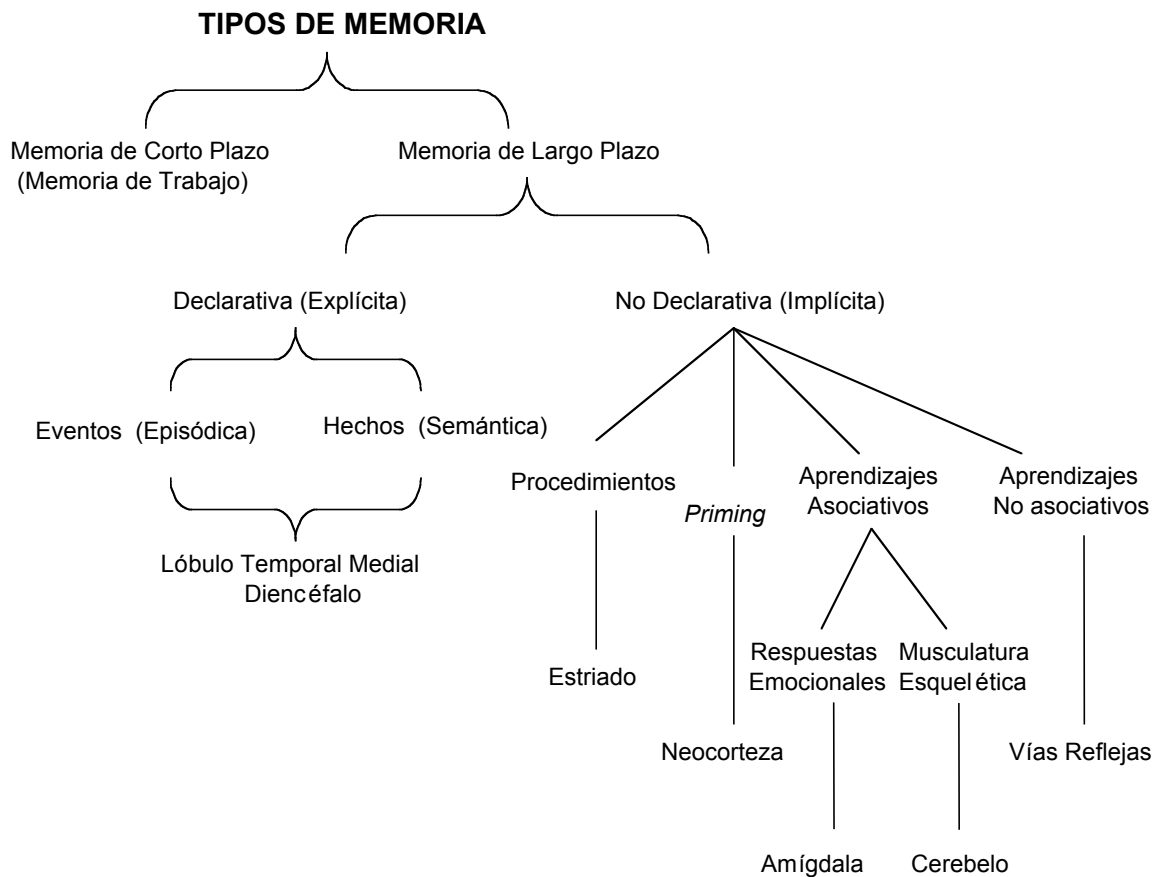


Figura 1. Esquema de los Sistemas de Memoria de los Mamíferos. Esta taxonomía describe las principales estructuras cerebrales que son importantes para cada tipo de memoria. Modificado de Squire et al., 1993.

La memoria declarativa puede ser recuperada o evocada después de que se consolidó algún aprendizaje, tanto en los humanos como en los animales (Squire et al., 1993, 1998; Schacter y Tulving, 1994; Bermúdez-Rattoni y Prado-Alcalá, 2001).

Para el proceso de consolidación de la memoria, se han propuesto 2 mecanismos de integración de la información: 1) una vía de transferencia entre estructuras, que enfatiza el paso del trazo de la memoria a través del tiempo por ejemplo; del hipocampo a la neocorteza. Esta vía de transferencia es denominada como “sistemas de consolidación” (Squire, 1992; McClelland et al., 1995; Squire y Álvarez, 1995; Nadel y Moscovitch, 1997; Bontempi et al., 1999; Nader, 2003) y 2), la

consolidación celular, que se enfoca sobre los elementos moleculares en las células en una región particular del cerebro. Esta consolidación celular sugiere que el trazo de memoria inicial (la memoria recientemente adquirida se considera lábil dentro de un periodo de tiempo corto), llamada también memoria de corto plazo o memoria de trabajo; posteriormente, se establece como memoria de largo plazo a través de cambios bioquímicos y morfológicos en las sinapsis (procesos de plasticidad) y, de cambios celulares, que requieren de síntesis de proteínas (Davis y Squire, 1984; DeZazzo y Tully, 1995; Bailey et al., 1996; Nader et al., 2000; Nakazawa et al., 2004).

Los primeros experimentos relacionados a los procesos de memoria de corto y largo plazo, fueron los estudios de Scoville y Milner (1957), quienes practicaron una resección bilateral del hipocampo y áreas corticales asociadas a un paciente con epilepsia severa llamado H. M. Los resultados de este experimento indicaron que regiones específicas del cerebro, denominadas colectivamente lóbulo temporal medial, son cruciales en la formación de memorias declarativas. Esto fue evidente, porque después de la operación, H. M. mostró una pérdida de la capacidad de atención a aprender nuevos eventos y datos (amnesia anterograda), no obstante, podía recordar de forma clara hechos de su vida ocurridos antes de la operación.

El caso H. M. en relación con dos pacientes más descritos por Penfield y Milner (1958), marcaron un precedente para investigaciones posteriores ya que se concluyó que estos pacientes pueden registrar información perceptual normalmente, pero esta información deja de ser disponible después de segundos, lo que marcó una distinción entre un proceso de memoria primaria (corto plazo) con una rápida pérdida y un proceso secundario en el cual, la información se almacena por un largo plazo (Milner et al., 1998).

Otros estudios realizados en modelos animales, dejaron en claro el importante papel del hipocampo en la formación de la memoria declarativa (Eichenbaum, 1997), ya que la organización funcional y anatómica del sistema del lóbulo temporal medial es similar en humanos, primates no humanos y roedores (Squire, 1992; Mayford et al., 1996).

La función del hipocampo en la memoria declarativa

El sistema estructural de la memoria declarativa hipocampal se considera constituido de tres componentes principales, áreas córtico-cerebrales, la región parahipocampal y el hipocampo en si mismo (Eichenbaum et al., 1996).

El hipocampo es una estructura que en los humanos se localiza dentro de la pared media de la corteza temporal; en las ratas, se ubica cercano a la superficie dorsal de la corteza (Bliss, 1998). Recibe información por medio de dos vías, las subcorticales que se proyectan desde el septum medial a través del fórnix, y entradas neocorticales que convergen en la corteza entorinal (CE), y que llegan a éste por la vía perforante. El hipocampo está dividido anatómicamente en dos regiones: el giro dentado (GD), que se encuentra formado por células granulares y los Cuernos de Ammon (CA 1-3), que contienen a las células piramidales. El GD descansa inmediatamente por debajo de las células piramidales en la parte baja de CA1, a esta región se le denomina hilus (Burges et al., 1999).

La información sensorial fluye de las células estrelladas de la capa II y la capa III de las células piramidales de la CE (Nakazawa et al., 2004), y entra por las fibras de la vía perforante que se proyectan a las células granulares que en conjunto se denominan fibras musgosas cuya proyección compacta hace sinapsis con las células piramidales de CA3; a su vez, los axones de estas células hacen contacto con las células piramidales de CA1 por el haz denominado colaterales de Schaffer y, finalmente, se llega de las células piramidales de CA1 a las células en las capas profundas de la CE, completando un circuito trisináptico (Amaral y Witter, 1989). Ver figura 2

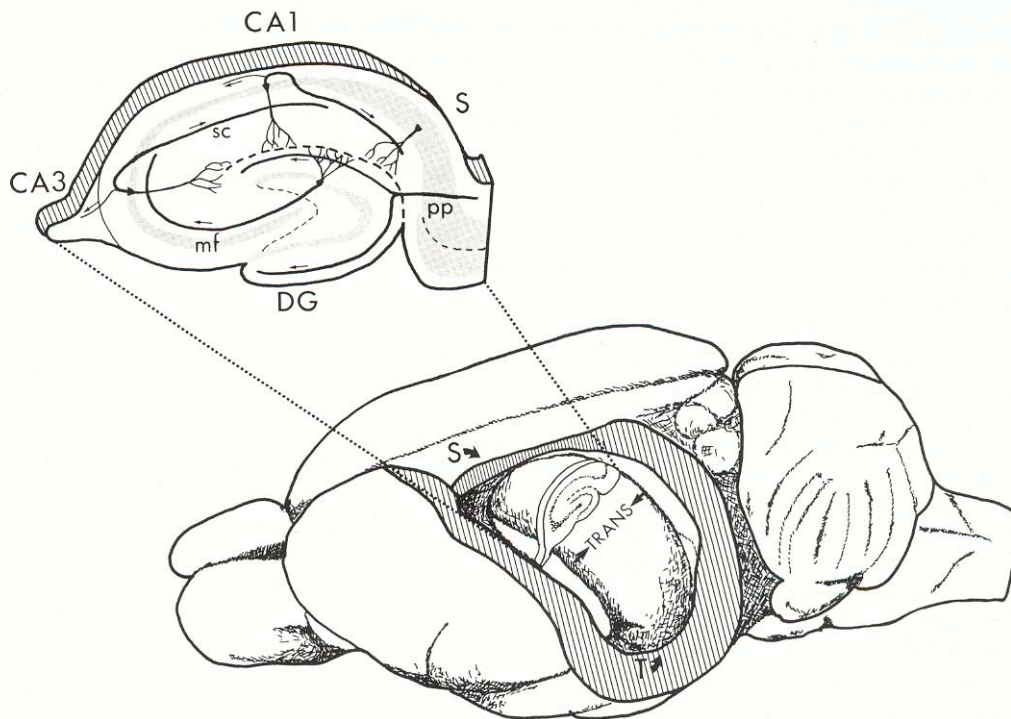


Figura 2. Representación esquemática del hipocampo en ratas. En esta figura se muestra la posición de la formación hipocámpica en el cerebro de rata en la cual la superficie cortical que cubre al hipocampo se encuentra descubierta. El hipocampo es una estructura con forma de C que está orientado longitudinalmente por el eje septotemporal, desde el núcleo septal rostral (S) a la corteza temporal (T) ventrocaudal. El eje transversal (TRANS) está orientado perpendicular al eje septotemporal. La figura superior izquierda muestra los principales elementos neuronales y las conexiones de la formación hipocámpica. Abreviaciones: DG, giro dentado; mf, fibras musgosas; pp, vía perforante; sc, Colaterales de Schaffer. Tomado de Amaral v Whitter. 1989.

Una línea de investigación importante sobre la memoria declarativa hipocámpica fue el experimento realizado por Bliss y Lomo (1973), quienes demostraron que estimulaciones eléctricas de alta frecuencia en las aferentes excitatorias del hipocampo causaban un incremento en la eficiencia de la transmisión sináptica que podía durar horas o días y a la cual denominaron potenciación a largo plazo (PLP). El descubrimiento de la PLP marcó el primer paso experimental que sustentó la teoría de que se requiere la coincidencia de actividad pre y post-sináptica en la representación

neuronal de la memoria, que implicaría un cambio estructural permanente en el sistema nervioso denominado plasticidad sináptica (Hebb, 1949).

La caracterización electrofisiológica de las células piramidales del hipocampo llamadas células de lugar (Shapiro et al, 1997), confirmó la idea de que éste, tiene un papel importante en la adecuada ejecución de pruebas de aprendizaje espacial (Bures et al., 1997). Las células de lugar, responden a características espaciales del medio ambiente (O'Keefe y Dostrovsky, 1971). Se propone que la actividad en conjunto de las células de lugar representan un mapa del ambiente que el animal utiliza para resolver problemas espaciales (O'Keefe y Speakman, 1987).

Estos estudios fisiológicos fueron complementados recientemente, demostrándose que los animales utilizan además, otros factores que influyen la actividad neuronal hipocampal, como la posición espacial absoluta que incluye dirección de movimiento y velocidad y, la retención de pistas de tipo no espacial a través de los sistemas olfativo y auditivo (Eichenbaum et al., 1988; Wiener et al., 1989).

El glutamato como neurotransmisor en la memoria

Como antes se mencionó, entre los diversos mecanismos moleculares que están involucrados en la formación y consolidación de la memoria se encuentra el neurotransmisor excitatorio glutamato. El proceso se inicia cuando el glutamato es liberado de la terminal pre-sináptica y activa a los receptores post-sinápticos tipo NMDA (N-metil-D-aspartato), a los receptores tipo no-NMDA que incluyen a AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propiónico)/kainato, y a los receptores a glutamato metabotrópicos (Squire, 1998; Barros et al., 2000).

Los receptores tipo no-NMDA generan una despolarización de la membrana por la entrada de corrientes sinápticas que es insuficiente para la generación de un potencial de acción, pero puede remover el bloqueo voltaje-dependiente del Mg^{2+} asociado al canal NMDA (Nowak et al., 1984). Inmediatamente, se producen cambios en los niveles de segundos mensajeros como Ca^{2+} y AMPc (adenosín monofosfato), seguido por un aumento en la actividad de proteínas cinasas. Estos eventos posteriormente conducen a modificaciones en la transcripción génica a través de la activación de factores de transcripción (Izquierdo y Medina, 1997; Abel y Kandel, 1998;

Abel y Lattal, 2001; Kang et al., 2001; Schafe et al., 2001; Taubenfeld et al., 2001; Adams y Sweatt, 2002; Dudai, 2002; Kida et al., 2002; Bozon et al., 2003). Adicionalmente, los cambios en la síntesis proteica también pueden ocurrir a nivel post-transcripcional, en el transporte y traducción del RNAm ya existente (Wu et al., 1998; Steward y Schuman, 2001; Kelleher et al., 2004).

Todos estos mecanismos moleculares ocurren una vez que los receptores tipo NMDA son activados generando algunas formas de plasticidad sináptica como la PLP, mientras que los receptores tipo no-NMDA modulan la transmisión sináptica excitatoria de los receptores tipo NMDA (Song y Huganir, 2002). Ver figura 3.

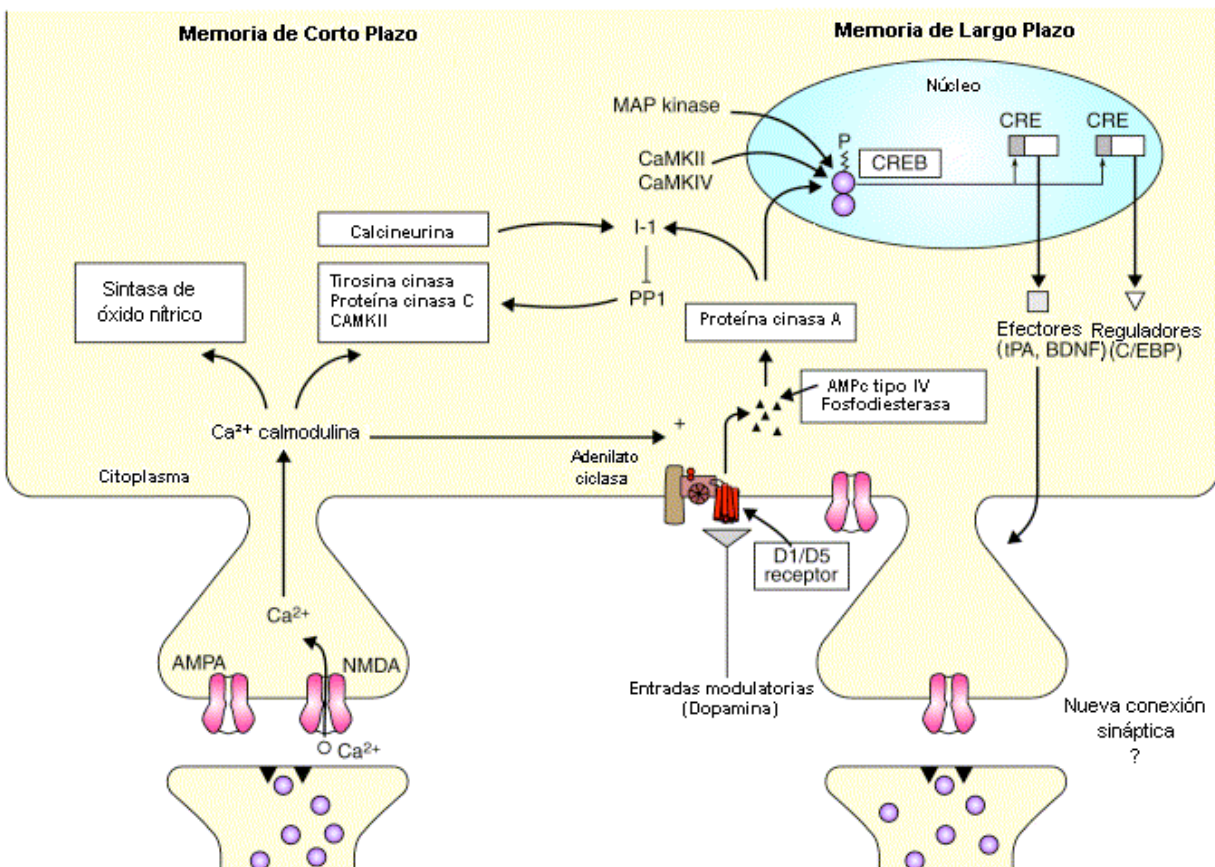


Figura 3. Los eventos moleculares que describen las fases tempranas y tardías de la potenciación a largo plazo (2). La estimulación de los receptores a glutamato tipo NMDA como resultado de la despolarización postsináptica a través de los receptores AMPA y de la unión del glutamato, permite la entrada del Ca^{2+} a la neurona postsináptica. Entre los efectos inmediatos producidos por la entrada del Ca^{2+} están la activación de CaMKII (cinasa dependiente de Ca-calmodulina II), PKC (proteína cinasa C) y calcineurina. La PLP ocurre cuando la adenilato ciclasa (AC), es activada por Ca^{2+} o por entradas modulatorias las que a su vez estimulan a AC a través de los receptores acoplados a las proteínas G. Esto produce un incremento en los niveles de AMPc (adenosín monofostato), el cual a su vez activa a PKA (proteína cinasa A), que se trasloca dentro del núcleo donde es fosforilado CREB. Otras proteínas cinasas, como CaMKII, CaMKIV (cinasa dependiente de Ca-calmodulina IV) y MAP (proteína de adhesión a microtúbulos), regulan la expresión génica. El BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro); C/EBP, CCAAT proteína de unión; CRE, AMPc elemento de respuesta; I-1, proteína fosfatasa inhibidora-1; PP1, proteína fosfatasa-1; tPA, activador plasminogénico de tejido (Abel y Lattal, 2001).

Los receptores tipo NMDA en el hipocampo

En el hipocampo, la inducción de PLP desde la entrada cortical de la CE a las fibras musgosas del GD, requiere la activación de los receptores tipo NMDA mientras que la PLP de las células granulares del GD a la región de CA3 puede ser inducida independientemente de la actividad mediada por estos receptores (Harris y Cotman, 1986; Wigstrom et. al., 1986).

A partir de esto, algunas Investigaciones fueron desarrolladas con la actividad de antagonistas farmacológicos a los receptores tipo NMDA tales como AP5 (ácido D,L-2-amino-5 fosfopentanoico), AP7 (ácido D,L-2-amino-7-fosfopentanoico), y CPP (ácido (3(+/-)-2-carboxipiperazina-4-yl)-propil-1-fosfónico), Watkins y Olverman en 1987, que permitieron demostrar que se puede bloquear la despolarización inducida por el agonista NMDA, sin afectar la despolarización que produce el receptor AMPA/kainato (Harris et al., 1984).

Otros estudios muestran que el antagonista AP5, produjo un bloqueo dosis dependiente en la inducción de PLP (Bliss y Lomo, 1973), en rebanadas de hipocampo in vitro (Collingridge et al., 1983; Harris et al., 1984). Aunque los trabajos mas importantes que sustentaron la unión entre la actividad de los receptores tipo NMDA, la PLP hipocampal, el aprendizaje y la memoria declarativa fueron descritos por Morris y su grupo (1981), quienes desarrollaron una prueba conductual dependiente del hipocampo en roedores, utilizando un tanque circular con agua, en el cual, una plataforma de escape fue oculta en un sitio fijo bajo la superficie, que fue denominada laberinto acuático de Morris. El entrenamiento de los animales consistió en colocarlos en el agua en varios ensayos durante los cuales tuvieron que aprender a llegar a la plataforma con la ayuda de claves espaciales localizadas afuera del tanque (Nerad et al., 1996).

Posteriormente se utilizó la infusión crónica intracerebroventricular (i.c.v.) del AP5, que mostró un bloqueo del aprendizaje espacial sobre la prueba del laberinto acuático con la plataforma oculta, sin observarse el mismo resultado, si la plataforma es visible (Morris et al., 1986).

Las concentraciones extracelulares estimadas del antagonista AP5 que causaron el bloqueo del aprendizaje espacial en el laberinto acuático, son comparables a las

utilizadas para bloquear la PLP in vivo, en la sinapsis entre la vía perforante y el GD (Davis et al., 1992), ya que la microinfusión de AP5 colocado directamente sobre el hipocampo fue suficiente para bloquear este aprendizaje en la misma tarea (Morris et al., 1989b).

También se ha reportado que los receptores AMPA/kainato o tipo no-NMDA, en el hipocampo, son necesarios para el proceso de consolidación de la memoria en tareas conductuales como la tarea de prevención pasiva además de las pruebas realizadas en el laberinto acuático (Riedel et al., 1999). Posteriormente se demostró que, la aplicación de antagonistas a estos receptores colocados antes de la adquisición de la tarea bloquean el aprendizaje del laberinto acuático (Barros et al., 2000).

No sólo los receptores tipo NMDA y no-NMDA participan en el aprendizaje espacial. Riedel y su grupo demostraron además que los antagonistas a los receptores metabotrópicos a glutamato impiden el aprendizaje espacial en ratas y la PLP en el GD en experimentos in vivo (Riedel et al., 1996).

La plasticidad del hipocampo en la tarea del laberinto acuático

El hipocampo es considerado una estructura particularmente plástica ya que una estimulación de alta frecuencia induciendo PLP produce sinaptogénesis (la generación de nuevos contactos sinápticos), en las fibras musgosas del hipocampo (Adams et al., 1997; Escobar et al., 1997). Posteriormente se demostró que la polisialización, esto es, la adición de ácido siálico a NCAM (molécula de adhesión celular neural), está relacionada con esta generación de nuevos contactos sinápticos y ocurre en el hipocampo después de un entrenamiento repetido en una tarea espacial (Fox et al., 1995; O'Connell et al., 1997). La polisialización de NCAM es por tanto, necesaria para el desempeño adecuado en tareas espaciales y para la PLP (Becker et al., 1996).

Moser y su grupo (1994), observaron también un aumento en la ramificación dendrítica en CA1 después de exponer a los animales a un ambiente enriquecido que además, facilitó la adquisición de la tarea de aprendizaje espacial del laberinto acuático. Recientemente se reportó que un sobrentrenamiento en el laberinto acuático induce sinaptogénesis en la región de CA3 (Ramírez-Amaya et al., 1999). Este experimento se realizó con un grupo de animales que fueron sometidos a entrenamientos de distinta

duración (1, 2 y 3 días), con diez ensayos en cada día de entrenamiento y pruebas de aprendizaje de la tarea a los 7 y 30 días después de finalizado el último ensayo del tercer día de entrenamiento. Los resultados mostraron que los animales que recibieron más días de entrenamiento disminuían el tiempo de latencia del aprendizaje con respecto a los grupos que sólo recibieron uno o dos días de entrenamiento.

En este trabajo se hizo también un análisis histológico del hipocampo que indicó una relación de aumento sináptico en la región de CA3 probablemente inducida por el tiempo de entrenamiento. La presencia de estos nuevos contactos sinápticos en esta estructura permitió suponer una relación de mayor funcionalidad en la sinapsis y la capacidad observada en los animales de recordar mejor esta tarea espacial (Ramírez-Amaya et al., 1999).

Posteriormente, se probó con la administración de un antagonista inespecífico a los receptores tipo NMDA, el MK801 ((+) -5- metil-10,11- dihidro -5H- dibenzo (a-d) cicloheptano -5-10- imino maleato), un bloqueo del aprendizaje espacial en el laberinto acuático con un sobrentrenamiento, en ratas, antes pero no después de la adquisición de la tarea. Este resultado se correlacionó con el análisis histológico de densidad sináptica que mostró que el antagonista MK801 bloqueó la sinaptogénesis de las fibras musgosas hacia el stratum oriens de CA3 antes y no después de los entrenamientos (Ramírez-Amaya et al., 1999; 2001).

La memoria espacial en el hipocampo y en la corteza insular

En investigaciones que implicaron lesiones en el hipocampo se observaron bloqueos selectivos en varias pruebas de memoria declarativa (O'Keefe y Nadel, 1978; Mishkin, 1982). No obstante, ya se había descrito que el hipocampo no es la única estructura que se encuentra involucrada en el aprendizaje espacial. Sutherland y su grupo (1988), mostraron que lesiones en la corteza retrosplenial posterior causaban un bloqueo del aprendizaje espacial (citado de Squire, 1987).

Lashey y Shepard experimentaron también con lesiones en la corteza frontal de ratas, estudiaron su comportamiento en un laberinto radial, mostrando que aún con las lesiones provocadas, hubo aprendizaje de la tarea. Sin embargo, cuando las lesiones abarcaron áreas más grandes de la corteza, observaron alteraciones del aprendizaje,

por lo que concluyeron, que la memoria declarativa se almacenaba en la corteza cerebral representada de forma difusa y no podía ser localizada en una región específica del cerebro (Lashley, 1950).

En este sentido, recientemente, Pouzet y su grupo (2002) reportaron los efectos de una ablación en el hipocampo dorsal de ratas en la ejecución de la tarea del laberinto acuático, utilizando un entrenamiento corto (4 días) y uno largo (16 días). A través de este experimento demostraron que los animales con lesión en el hipocampo no pueden aprender la tarea de la misma forma que los animales control que normalmente utilizan estrategias espaciales de tipo aloentróico (refiriéndose a que los sujetos basan su aprendizaje en pistas espaciales) en el entrenamiento corto. Sin embargo, después del entrenamiento largo, los animales aprendieron la localización de la plataforma sugiriendo que éstos, utilizaron estrategias de tipo no-espacial (idocéntricas), basadas en la posición del sujeto en el espacio, para compensar el bloqueo de la memoria espacial.

Existe también, evidencia de que otras áreas corticales participan de forma importante en memorias espaciales (Petrides et al., 1993; Goldman-Rakic, 1994). Estudios en primates no humanos, indicaron que lesiones en la corteza prefrontal bloquean la memoria de una prueba de retardo de respuesta para espacio u objeto (Goldman et al., 1971; Mishkin y Manning, 1978). La pérdida de la misma área, en ratas, produce alteraciones en esta tarea (Kolb et al., 1974; Eichenbaum, et al., 1983; Delatour y Gisquet-Verrier 1996; Kesner et al., 1996). En la misma línea de investigación se mostró que lesiones en áreas específicas de la corteza prefrontal como la prelímbica/infralímbica pero no en la corteza cingulada anterior bloquean la memoria de trabajo espacial (Brito et al., 1982; Brito y Brito. 1990; Ragozzino et al., 1998; Sanchez-Santed et al., 1997).

Experimentos de nuestro laboratorio en los cuales hicieron lesiones reversibles con tetrodotoxina (TTX, un bloqueador de los canales de Na^+ dependientes de voltaje), e irreversibles por la microinyección de NMDA, demostraron la participación de la CI en la tarea del laberinto acuático y de prevención pasiva (Brown et al., 1982; Bermúdez-Rattoni et al., 1991; Bermúdez-Rattoni y McGaugh, 1991; Bermúdez-Rattoni et al., 1995).

Se han observado también efectos diferenciales en el aprendizaje del laberinto acuático, por la inducción de lesiones en diferentes sitios de la CI de las ratas. Demostrando que la región central y la posterior pero no la región anterior de la CI está más involucrada en este tipo de aprendizaje (Nerad et al., 1996).

En estos mismos animales se probó que lesiones en la corteza insular agranular producen bloqueos en la memoria de trabajo a la preferencia a un sabor, pero no la memoria de trabajo espacial (Eichenbaum et al., 1983; DeCoteau et al., 1997; Ragozzino y Kesner, 1999).

Recientemente, se describió el bloqueo en la adquisición de la memoria espacial provocado por la aplicación de AP5, en la CI, antes del entrenamiento en el laberinto acuático, cuando se hizo la prueba de memoria después de 24 hrs (Gutiérrez et al., 1999a). Estos resultados demostraron la participación de la CI en el aprendizaje espacial.

En humanos a través de un estudio realizado por tomografía por emisión de positrones (PET, iniciales en inglés), se describió que la corteza insular (CI), es activada por la evocación de memorias espaciales (Ghaem et al., 1997). La activación de la ínsula junto con el hipocampo se observó, cuando se les pedía a los sujetos experimentales que recordaran un recorrido para llegar de un sitio a otro.

En otro estudio realizado también en humanos, se observó este fenómeno de activación de la ínsula con estimulación vestibular unilateral con PET. En este trabajo se mostró una desorientación espacial causada por esta estimulación vestibular que se encontraba asociada a la activación de regiones cerebrales como la ínsula, la corteza temporo-parietal, el putamen y la corteza cingulada anterior (Bottini et al., 1994).

La organización estructural de la corteza insular

Estructuralmente la CI en los humanos se ubica cercana a la profundidad del sulcus lateral, con una apertura dentro de esta región que es frecuentemente referida como el lumen de la ínsula (Carpenter, 1985). La ínsula está rodeada por el sulcus circular y las regiones anterior y posterior están separadas por el sulcus insular central sobre el cual se inclina la principal arteria media cerebral. Por debajo del giro insular está el núcleo basal cerebral (Carpenter, 1985).

La organización celular de la ínsula en humanos se ha mantenido en las diferentes especies con pocas diferencias evolutivas. Se compone de 3 regiones continuas de corteza divididas. La porción ventral contiene a la corteza agranular mientras que la ínsula caudal es granular. Entre estas dos regiones se encuentra una zona de transición disgranular (Mesulam y Mufson, 1982).

La corteza de la ínsula ventral consiste de tres estratos celulares los cuales contienen agregados de células no granulares. El estrato externo contiene células piramidales, el estrato intermedio está ocupado también por grandes células de este tipo y el estrato interno contiene células polimórficas.

El sector disgranular se localiza en posición dorso-caudal al sector agranular y es continuo con él. Está constituido por distintos estratos celulares. Las capas II y III son difíciles de demarcar pero contiene células granulares. La parte granular contiene a las capas II y IV que son claramente granulares y bien definidas mientras que las células que componen la capa III no están definidas. Hay una clara demarcación entre las capas V y VI así como entre la capa VI y la materia blanca que se halla debajo (Mesulam y Mufson; 1982). Ver figura 4.

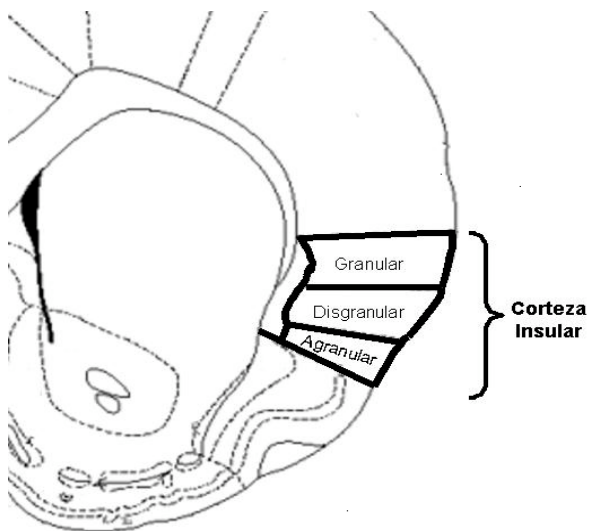


Figura 4. Esquema de un corte coronal de un cerebro de rata donde se muestra la CI. Se resaltan las principales capas que la constituyen. Modificado de Paxinos y Watson, 1986.

Muchas conexiones corticales de la ínsula son recíprocas (Aggleton et al., 1980). El área anterior ventral tiene proyecciones con la corteza orbitofrontal y opercular frontal

así como con la corteza prepiriforme olfatoria y la CE. La ínsula posterior dorsal tiene prominentes conexiones con el área suplementaria motora, la corteza somatosensorial primaria y secundaria, la corteza auditiva primaria y secundaria, el lóbulo parietal inferior y el área retroinsular. Todas las áreas de la ínsula tienen conexiones con el lóbulo medial temporal y las regiones cinguladas (Flynn et al., 1999).

La ínsula envía proyecciones hacia el hipocampo anterior (Pribam y MacLean, 1953) y el núcleo bed de la estria terminal (Saper, 1982), el estriado límbico ventral (Wright y Groenewegen, 1996; Chikama et al., 1997), y el núcleo acumbens lateral (Wright y Groenewegen, 1996). Esta estructura recibe aferentes desde la corteza periamigdalóide (Pribam et al., 1950; Pribam y MacLean, 1953), el tubérculo olfatorio (Pribam et al., 1950), y el bulbo olfatorio (Kaada, 1951), y tiene proyecciones recíprocas con el hipotálamo posterior y el núcleo tuberomamilar (Saper, 1982).

En los roedores, la CI (áreas 13 y 14 de Krieg), se ubica en el lóbulo temporal y está definida por una área que abarca la corteza frontal lateral y la corteza peririnal en dirección dorso-caudal y en la porción más ventral de la corteza piriforme en dirección dorso-ventral, esta estructura se comunica con otros centros de información visceral y gustativa como el sistema límbico a través de la amígdala, el tálamo y los núcleos del tracto solitario (NTS), y parabranchial (PbN).

Las proyecciones corticales de la CI a la amígdala, se ha sugerido, llevan la información cognitiva procesada y son integrados los procesos emocionales (Pascoe y Kapp, 1987).

Los receptores colinérgicos y su función en la memoria

Estructuralmente, los receptores muscarínicos a ACh, se han clasificado como m1 a m5, encontrándose en diversas regiones cerebrales (Bonner, 1989). Los receptores m1 son principalmente hallados en terminales postsinápticas y una gran densidad se ha observado en corteza cerebral, el hipocampo, el giro dentado, la amígdala medial y basolateral, el núcleo acumbens y el putamen caudado. En una proporción relativamente más baja se localizan en el tálamo y en el cerebelo (Flynn y Mash, 1993; Piggott et al., 2002).

Los receptores m2 son localizados en la pre-sinapsis, funcionando como autoreceptores, regulando la liberación de ACh y se han observado en regiones corticales como; el núcleo colinérgico del tallo y áreas córtico-espinales (Flynn y Mash, 1993; Piggott et al., 2002). Además, se han encontrado en el cerebelo y en el tálamo, al igual que los receptores m4, que son expresados en el estriado (Piggott et al., 2002).

Los receptores m3 fueron colocalizados en regiones donde se encuentran los m1 (Flynn y Mash, 1993). Los receptores m5 han sido localizados en el hipocampo, en mayor cantidad en el subiculum y en las células piramidales de CA1, también se han observado en el núcleo hipotalámico y en el área tegmental ventral.

Los procesos fisiológicos que son afectados por alterar la transmisión colinérgica y sus mecanismos han sido estudiados en áreas corticales o subcorticales del cerebro (Bear y Singer, 1986; Delacour et al., 1990; Weinberger, 1998; Kirkwood et al., 1999; Massey et al., 2001).

Actualmente es aceptado que existen dos grupos principales de neuronas colinérgicas. La primera está en el cerebro anterior basal dentro del núcleo septal medial (que tiene proyecciones al hipocampo, amígdala, neocorteza que incluye a la corteza insular y piriforme), vertical y horizontal, el núcleo límbico de la banda diagonal de Broca y el núcleo basal magnocelular (NBM), también llamado núcleo basal de Meynert en humanos. A este grupo de neuronas se le refiere como un continuo; el sistema colinérgico del cerebro anterior basal magnocelular (Mesulam et al., 1983a, b). Este grupo, envía proyecciones al hipocampo, amígdala, neocorteza que incluye a la corteza insular y piriforme (Saper, 1982).

El segundo grupo de neuronas colinérgicas se encuentran en el tallo cerebral en la región del núcleo pedunculopontino tegmental y tegmental pontino lateral-dorsal (Mesulam et al., 1983a). Las funciones de las neuronas colinérgicas del tallo cerebral han sido relacionadas con procesos conductuales particulares como aprendizajes espaciales o de contexto, memoria de corto plazo y atención visual, además los substratos corticales de estos procesos pueden estar modulados por aferentes colinérgicas de estas áreas corticales (Everitt y Robbins, 1997). Figura 5.

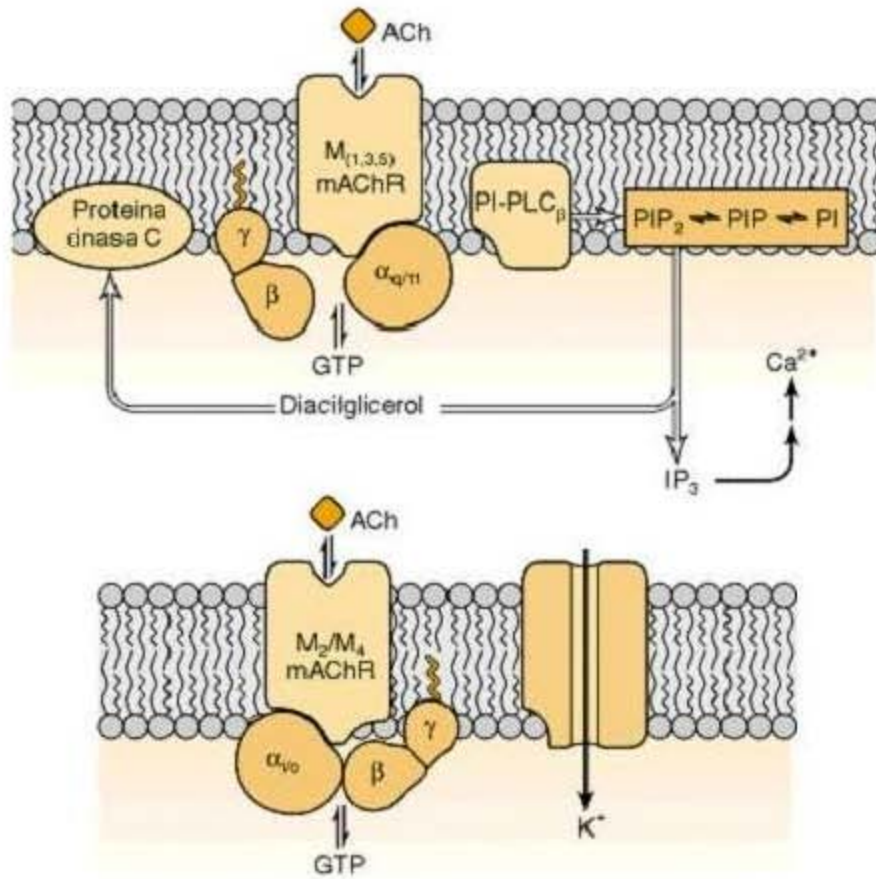


Figura 5. La acetilcolina (ACh) actúa sobre el receptor muscarínico de los subtipos indicados en el esquema, para inducir varias respuestas. Los receptores muscarínicos a ACh m_2 y m_4 interactúan con la subunidad α de la proteína de unión GTP, G_i . Cuando la ACh se une, G_{oi} se disocia desde las subunidades $\beta\gamma$ e inhibe a la adenilato ciclasa (AC). Los receptores m_1 , m_3 y m_5 interactúan con la proteínas de unión GTP, de la familia G_q y G_{11} . Las subunidades $G\alpha_q$ y α_{11} activan a la fosfolipasa C específica de fosfoinosítidos (PI-PLC). Los receptores m_2 y m_4 regulan a los canales de K^+ rectificantes de entrada a través de la subunidad $\beta\gamma$ de G_i o G_o . Una cascada de segundos mensajeros se difunden dentro de la célula incluyendo cAMP, inositol trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG). IP_3 es generado desde fosfoinositol bifosfato (PIP_2). Norepinefrina (NE); receptor β adrenérgico (β -AdrR); fosfoinositol (PI); fosfoinositol 4-fosfato (PIP); fosfoinositol-4,5-bisfosfato (PIP_2). Tomado de Siegal et al., 1999.

La actividad de los receptores a ACh en el aprendizaje espacial

De manera importante se ha reportado la actividad de los receptores colinérgicos en aprendizajes asociativos (Naor y Dudai, 1996; Rosenblum et al., 1996a; Gutiérrez et al., 1999a, b; Miranda et al., 2000; Ramírez-Lugo et al., 2003).

El desarrollo de fármacos específicos (agonistas y antagonistas), para los dos tipos de receptores a acetilcolina (ACh), nicotínicos y muscarínicos, ha permitido explorar su actividad en el aprendizaje y la memoria.

Tani y su grupo (1998), observaron que la nicotina estimula la liberación de ACh y que tuvo efectos moduladores sobre los receptores muscarínicos. Otros reportes mostraron que la desensibilización de los receptores nicotínicos facilita la función de los receptores muscarínicos, sugiriendo que esta desensibilización de los receptores no produce un estado inactivo.

Con estos trabajos se propuso que la actividad de los receptores nicotínicos y muscarínicos se encuentra estrechamente relacionada, por ejemplo; se ha demostrado que la nicotina induce un mejoramiento en la memoria de trabajo, cuyo efecto puede ser revertido por la administración aguda del antagonista escopolamina a los receptores muscarínicos (Levin y Rose, 1991), o bien, el mejoramiento en la ejecución de la tarea DMP (tarea de retardo correspondiente al lugar; iniciales en inglés), por la administración de nicotina, está regulado por los receptores muscarínicos a ACh ya que si éstos se encuentran bloqueados, la nicotina no facilita la memoria espacial (Liu et al., 2004).

Diversos experimentos se han realizado en el laberinto acuático que inducen lesiones en el NBM, de los cuales se obtuvieron resultados contradictorios. En algunos el bloqueo del aprendizaje (Carl et al., 1985; Whishaw et al., 1985; Dokla y Thal, 1988; Mandel et al., 1989a; Riekkinen et al., 1990), otros no encuentran efectos persistentes (Hagan et al., 1988; Mayo et al., 1988; Mundy et al., 1990), o no se encuentra efecto por dichas lesiones (Decker et al., 1992).

Un trabajo reciente con la inducción de lesiones al NBM, por la aplicación de NMDA, impidió la adquisición de la tarea del laberinto acuático en dos días de entrenamiento, sugiriendo que el sistema colinérgico tiene una importante función en esta fase del aprendizaje y no en la evocación de la tarea (González et al., 2000).

Otros estudios farmacológicos que involucran a la ACh en aprendizajes de laberinto acuático reportaron los efectos de los inhibidores a la acetilcolinesterasa (AChE), la enzima responsable de degradar a la ACh (Mandel et al., 1989b; McGaugh e Izquierdo, 2000). Con estos resultados se probó que la ejecución del aprendizaje varía en el cerebro en relación con los niveles de ACh aumentando durante el tiempo de entrenamiento.

De forma específica se describió que la escopolamina (antagonista general para los receptores muscarínicos a ACh), inyectada de forma local y sistémica bloquea la memoria de trabajo espacial en ratas por actuar sobre los receptores post-sinápticos m1 conduciendo a un bloqueo del funcionamiento del hipocampo en esta memoria (Wenk et al., 1987; Olton et al., 1992; Ohno et al., 1993; Porter et al., 2002).

Estudios independientes demostraron que los fármacos colinérgicos colocados de forma selectiva en la corteza cingulada anterior (ACC iniciales en inglés), después del entrenamiento tienen un efecto sobre el almacenaje de la memoria. Farr y su grupo (2000a) administraron arecolina y oxotremorina, agonistas a los receptores muscarínicos, en esta región del cerebro, observando un aumento en la memoria espacial en ratón y rata respectivamente (Malin y McGaugh, 2003). Adicionalmente, la administración de escopolamina intra-ACC, después del entrenamiento se ha reportado que bloquea la retención de memoria a largo plazo en ratas en pruebas de laberinto acuático y de prevención pasiva (Riekkinen et al., 1995), También ha sido reportado que la memoria puede aumentar con un agonista al receptor nicotínico a ACh o bloquearse con un antagonista a este receptor colocándolo en la ACC después del entrenamiento en esta tarea (Farr et al., 2000b).

La función del sistema glutamatérgico y colinérgico en la memoria en la corteza insular

Los receptores muscarínicos a ACh y los receptores tipo NMDA participan de manera importante en aprendizajes de tipo espacial por bloquear la adquisición en la tarea del laberinto acuático (Sutherland et al., 1982; Morris et al., 1986; Morris, 1989a; Winkler et al., 1995).

El carbacol (agonista a los receptores muscarínicos a ACh), colocado en el hipocampo, puede potenciar las respuestas glutamatérgicas en algunas regiones corticales como la CI, por incrementar la fosforilación de la tirosina sobre una subunidad del receptor tipo NMDA (Rosenblum et al., 1996b, 1997). Con estos experimentos se resaltó el importante papel de los receptores tipo NMDA, cuya actividad está relacionada a los receptores a ACh en la región de la CI.

Recientes experimentos de nuestro laboratorio han mostrado la participación de los receptores muscarínicos a ACh y los receptores tipo NMDA en la CI para la adquisición y consolidación de estímulos gustativos familiares o novedosos (Gutiérrez et al., 2003a, b). En este trabajo se observó que el bloqueo de los receptores muscarínicos, pero no el de los receptores tipo NMDA en la CI, inmediatamente después de exponer a los animales a un nuevo sabor bloquea la atenuación de la neofobia a este sabor, lo que sugirió que la activación de los receptores muscarínicos en la CI está involucrada en la consolidación de un aprendizaje gustativo (Gutiérrez et al., 2003b).

Con base en estos antecedentes se planteó entonces la posibilidad de extender el conocimiento de la participación de los sistemas glutamatérgico y colinérgico en la formación de la memoria espacial en la CI, en la tarea del laberinto acuático con un sobrentrenamiento, a través de la acción de antagonistas a los receptores ionotrópicos glutamatérgicos y muscarínicos a ACh (Gutiérrez et al., 1999a; González et al., 2000) que han observado efectos en el aprendizaje en otras tareas de aversión gustativo (Naor et al., 1996; Gutiérrez et al., 1999a; Rosenblum et al., 1997; Berman et al., 2000; Gutiérrez et al., 2003a; Ramírez-Lugo et al., 2003) y tareas de aprendizaje espacial (Gutiérrez et al., 1999a; González et al., 2000)

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El hipocampo es una estructura que ha sido ampliamente involucrada con memorias espaciales. Recientemente se ha descrito la participación de la CI en esta memoria. Se sabe que tanto los receptores ionotrópicos a glutamato y muscarínicos a ACh, tienen una función importante en la formación de memorias gustativas, sin embargo, no se conoce mucho de los mecanismos por los cuales esta corteza participa en la formación de la memoria espacial con un sobentrenamiento, que permite un mejor almacenamiento de la información espacial.

HIPÓTESIS

Si la CI es una estructura importante en la formación de la memoria espacial a través del sistema glutamatérgico y colinérgico, entonces la aplicación de antagonistas a estos receptores colocados antes o después de los entrenamientos en el aprendizaje espacial, deberán afectar la formación de esta memoria observando su efecto en las curvas de aprendizaje cuando se microinyecta el fármaco antes o bien en los días de prueba cuando se microinyecta después de la adquisición de la tarea.

OBJETIVO

Investigar la participación de la CI en la formación de la memoria espacial utilizando el laberinto acuático, explorando la actividad de los receptores ionotrópicos glutamatérgicos y muscarínicos de ACh, haciendo una comparación con la formación del aprendizaje gustativo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Sujetos experimentales

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con un peso entre 250 - 300 gr, las cuales fueron colocadas en cajas individuales y mantenidas en un cuarto con un ciclo de 12 horas luz-obscuridad donde se les proporcionó agua y alimento ad libitum.

Procedimiento quirúrgico para la implantación de cánulas en la corteza insular

Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (50 mg/Kg) y se colocaron en un aparato estereotáxico donde fueron implantados bilateralmente con cánulas de 9 mm en la región de la corteza insular (CI) en las siguientes coordenadas con referencia a bregma; anteroposterior (AP), +1.2 mm, mediolateral (ML), +5.5 mm y dorsoventral (DV), -5.5 mm. A partir de esta posición la cánula se colocó a -3 mm dentro de esta región, para facilitar la microinyección (Paxinos y Watson, 1986). Las cánulas fueron soportadas por dos tornillos y se les colocó una protección removible para evitar que éstas se taparan o se obstruyeran después de la operación. Posteriormente se fijaron con acrílico dental.

Después de la operación, los animales se mantuvieron en sus cajas para su recuperación durante siete días y fueron manipulados aproximadamente por 5 min cuatro días anteriores al inicio de los experimentos conductuales de memoria espacial. Los sujetos en todos los experimentos fueron divididos como: 1) grupos control intacto; 2) control inyectado con la solución utilizada como vehículo denominado SHAM y 3) el grupo experimental al cual se le microinyectó el fármaco.

Procedimiento de microinyección

Este método consiste en remover las protecciones de las cánulas y en su lugar colocar un inyector (aguja dental) que llegó a las coordenadas de la región que abarca la CI en las ratas (descrita anteriormente). El inyector a través del cual se perfundió la solución utilizada en cada experimento, estuvo unido por medio de un tubo de polietileno a una microjeringa Hamilton de 10 µl que a su vez fue montada sobre una bomba de microinyección (Cole-Parmer).

Los fármacos empleados en los animales que fueron implantados para microinyección, fueron los siguientes: NBQX (2,3-dihidroxi-6-nitro-7-sulfamoil-benzo (F) quinoxalina), que es un antagonista selectivo competitivo del receptor AMPA/kainato utilizado en concentración de 5 mg/ml; AP5 (ácido D,L-2-amino-5-fosfopentanoico), el inhibidor de los receptores tipo NMDA, usado en concentración de 10 mg/ml. Se utilizó además escopolamina (SCOP), un antagonista para los receptores muscarínicos a ACh, en la concentración de 60 mg/ml, aplicada en los experimentos de la misma forma que los otros antagonistas.

Todas las sustancias fueron disueltas en solución ringer normal para mamífero (NaCl 118 mM, KCl 4.7 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM, MgSO₄ 1.2 mM, CaCl₂ 2.5 mM, NaHCO₃ 19 mM y Glucosa 3.3 mM) como vehículo. El inyector se mantuvo en el sitio de microinyección durante un minuto después de la perfusión del fármaco para permitir una óptima difusión de éste en el área de la CI.

Procedimientos conductuales

Laberinto acuático de Morris

En esta tarea de aprendizaje los animales fueron sometidos a una sesión de entrenamiento diaria de 10 ensayos durante cuatro días consecutivos para encontrar y recordar la ubicación de una plataforma (10 x 10 cm), situada aproximadamente 2 cm bajo del agua, en un tanque circular de 1.5 m de diámetro y 1 m de altura. La temperatura del agua se mantuvo aproximadamente a 24°C. Fueron colocadas alrededor del tanque algunas claves espaciales permanentes. El cuarto estuvo aislado del ruido, iluminado con poca luz.

Los animales fueron liberados en 10 distintos puntos del tanque y la trayectoria de nado fue observada a través de un sistema de contraste de circuito cerrado (Chromotrack 3.0; San Diego Instruments).

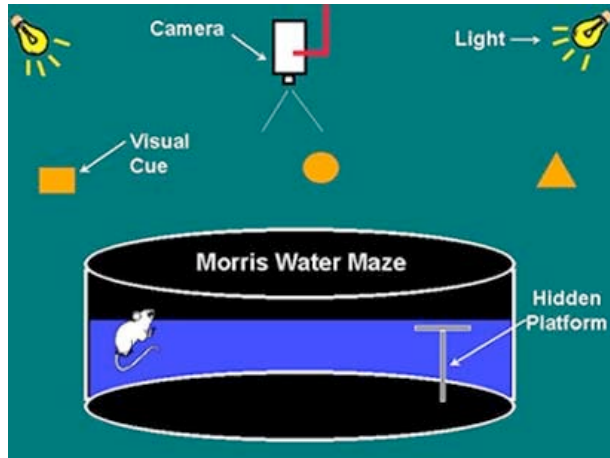
Cada vez que éstos fueron colocados en el tanque, tuvieron 60 s para encontrar la plataforma, si durante ese tiempo no llegaban a ella se les llevó de forma manual. Una vez que los animales aprendieron la ubicación de la plataforma se les mantuvo durante 30 s y después se colocaron en una caja fuera del tanque aproximadamente otros 30 s. En este procedimiento se comparó la latencia (el tiempo en que tardan en

llegar a la plataforma), entre los animales que fueron inyectados con el vehículo y los que se les aplicó el fármaco, graficando los datos posteriormente en una curva de aprendizaje (Ver figura 6).

Para la realización de estos experimentos, las ratas fueron implantadas en la región de la CI bajo los procedimientos de cirugía estereotáxica descritos anteriormente y fueron microinyectados con los fármacos 20 min antes de cada día de entrenamiento o en su caso, inmediatamente después de que se hizo la adquisición de la tarea. Se hicieron cuatro días consecutivos de entrenamiento en todos los experimentos con esta tarea de aprendizaje.

Los resultados que se obtuvieron en cada día de entrenamiento fueron analizados por el programa Statistics utilizando una prueba estadística de análisis de varianza (ANOVA) de vías múltiples. El análisis post hoc por la prueba de Newman-Keuls, fue usado para la comparación individual entre los diferentes grupos, donde las variables dependientes son los grupos y los ensayos, y la variable independiente comparada fue el tiempo de llegada a la plataforma (latencia).

Los días de prueba de aprendizaje se realizaron después de 7 y 30 días del último ensayo, para esto se retiró la plataforma y los animales se colocaron en el tanque durante 120 s. Posteriormente se midió la latencia para llegar al área donde estaba colocada la plataforma y el número de veces que cruzaron por esta área. Los resultados obtenidos de los días de prueba fueron comparados con el análisis estadístico de t-student.



1er ensayo

10 ensayos

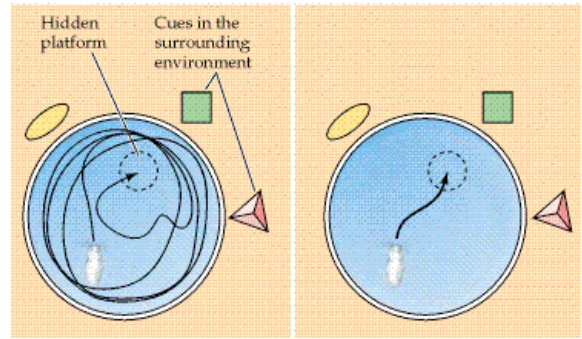


Figura 6. En ambas figuras se esquematiza el laberinto acuático de Morris durante la adquisición de la tarea de una rata. Su recorrido (indicado por los trazos en la figura derecha) para alcanzar la plataforma es monitoreado por un cámara y se observa en los primeros ensayos. Después de que aprende la ubicación de la plataforma, puede llegar directamente hacia ella.

Condicionamiento aversivo a los sabores (CAS)

Un método descrito para determinar un aprendizaje asociativo en algunos animales es el CAS, el cual consiste en dar a conocer a un sujeto, un estímulo novedoso o estímulo condicionado (EC), como una solución de sacarina, el cual después de un cierto tiempo se va a relacionar con otro estímulo que es llamado no condicionado (IC), en este caso, son utilizados estímulos de diversa índole, sin embargo, en nuestro trabajo se empleó cloruro de Li (LiCl). Este estímulo le provocará una reacción de rechazo al sujeto como cierto malestar gástrico.

La asociación por parte del sujeto de ambos estímulos (EC-IC), se hace evidente cuando se le presenta nuevamente el EC, lo que determina entonces un aprendizaje aversivo a un sabor (García et al., 1985). Figura 7.

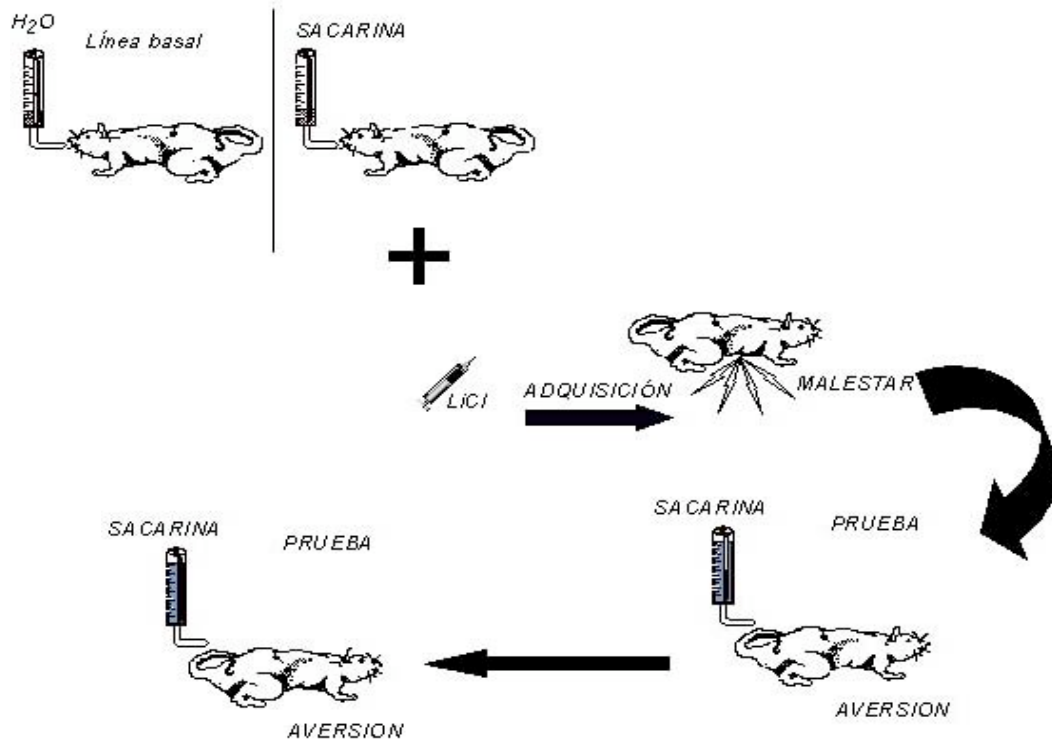


Figura 7. Esquema donde se observa, el momento de adquisición y la prueba en el método del CAS

En este trabajo se utilizó esta tarea de aprendizaje durante la cual a los animales se les privó de agua por 24 hrs y posteriormente, se les dio un consumo restringido de agua por 15 min durante 3 días consecutivos por la mañana con un bebedero (probeta plástica), con la finalidad de que, a través de este consumo, que fue registrado diariamente, se obtuviera una línea basal. El cuarto día se realizó la adquisición del CAS donde se sustituyó el agua por una solución de sacarina al 0.1%. Después de 15 min se les inyectó de forma intraperitoneal (i. p.) cloruro de litio en concentración de 0.4 M (7.5 ml/Kg).

15 minutos antes de que los animales probaran el sabor nuevo (sacarina), se les microinyectó bilateralmente el fármaco y el ringer respectivamente, en la CI. La

microinyección se hizo a una velocidad de 1 μ l/min y el volumen del fármaco inyectado fue de 1 μ l/min. Posterior a la adquisición del CAS se hizo la prueba (PBA), 72 hrs después, donde nuevamente se dio un consumo de sacarina a la misma concentración durante el tiempo establecido y este consumo se registró para su análisis.

Los resultados fueron analizados por el programa de Statview. Los grupos se compararon con el análisis estadístico de análisis de varianza (ANOVA) de una vía y una prueba post hoc de Fisher. Se graficaron como un porcentaje de cambio del consumo de sacarina obtenido el día de la PBA con respecto al consumo de sacarina obtenido durante la adquisición.

Histología

Los animales fueron matados con una sobredosis de pentobarbital sódico y se perfundieron con una solución salina (NaCl 0.15 M) a través de la aorta ascendente, enseguida se perfundió paraformaldehído al 4 % disuelto en buffer de fosfatos 0.1 M.

Posteriormente los cerebros fueron extraídos y se mantuvieron en paraformaldehído durante 24 hrs a 4 grados centígrados, al término de este periodo fueron cambiados a sacarosa al 30% en buffer de fosfatos 0.2 M y se mantuvieron a la temperatura de 4 °C durante tres días. Al término de este tiempo se obtuvieron cortes coronales de los cerebros con un grosor de 40 μ m con la ayuda de un criostato (-16 °C). Los cortes fueron teñidos a través de la técnica de Nissl para mostrar la correcta posición de las cánulas.

RESULTADOS

Cortes histológicos de corteza insular

La figura 8 muestra un corte histológico representativo de la colocación de las cánulas en los experimentos. El trayecto de la cánula mostró que las microinyecciones se localizaron en la región agranular de la CI. Todos aquellos animales que mostraron las cánulas fuera del área de CI se excluyeron del análisis estadístico. Un total de 26 animales se eliminaron de todos los experimentos.

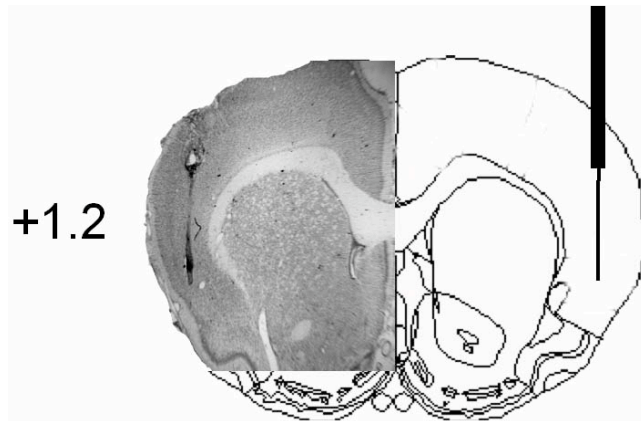


Figura 8. En esta figura se muestra del lado izquierdo un corte transversal de un cerebro de rata. Del lado derecho el dibujo complementa el corte. Se observa la posición de las cánulas llegando a la región de la CI además del inyector.

Efecto del bloqueo al receptor tipo NMDA en la adquisición del CAS

Aunque la participación de los receptores tipo NMDA ha sido mostrada en el CAS (Gutiérrez et al., 1999a) se utilizó el antagonista AP5 del receptor NMDA en esta tarea de aprendizaje, con el objeto de comprobar que la microinyección del fármaco era correcta y que su efecto era reproducible en nuestros experimentos. En este caso el fármaco fue microinyectado bilateralmente en la región de la CI, 15 min antes de la adquisición del CAS en concentración de 10 mg/ml a una velocidad de 1 μ l/min.

En la gráfica de barras de la figura 9, se muestra el bloqueo producido por el fármaco en el CAS después de 72 hrs durante la prueba con sacarina en concentración 0.1%. Se utilizó para este caso la prueba estadística de ANOVA de una sola vía, que demostró un efecto significativo del fármaco ($F_{2, 24} = 13.44$, $P = 0.001$). La prueba post hoc de Fisher mostró diferencias significativas entre los grupos AP5 y SHAM ($P = 0.001$) y entre los grupos AP5 y Ctrol ($P = 0.001$).

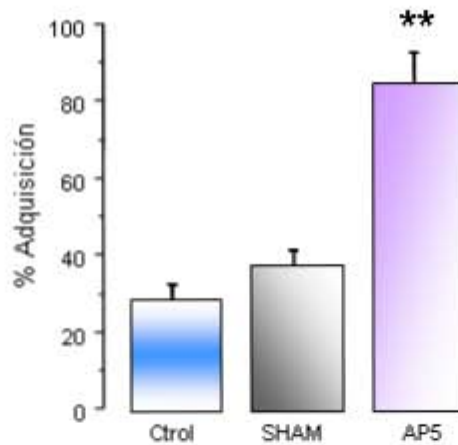


Figura 9. Efecto de AP5 sobre la adquisición del CAS. Los datos se muestran normalizados como un promedio del consumo de sacarina el día de prueba con respecto al día de adquisición. La primera barra corresponde al grupo Ctrl ($n = 7$), la segunda al grupo SHAM ($n = 13$) y la última el grupo AP5 ($n = 7$). Las barras se observan con la media \pm ES $**P < 0.01$

Efecto del antagonista AP5 en la adquisición de la tarea del laberinto acuático

En este experimento se probó el antagonista AP5 al receptor tipo NMDA, con el fin de conocer la participación de estos receptores en la tarea del laberinto acuático en la región de la CI. La concentración usada fue de 10 mg/ml con microinyección bilateral en esta región cortical, a una velocidad de 1 μ l/min. Los animales fueron entrenados durante cuatro días consecutivos con diez ensayos por día y la microinyección se realizó 20 min antes de iniciar los entrenamientos de cada día.

Se realizaron dos pruebas de memoria después de 7 y 30 días de concluido el último entrenamiento. La prueba estadística de ANOVA de vías múltiples fue utilizada para comparar los resultados durante los días de entrenamiento y no mostró diferencias significativas al compararse el grupo AP5 con el grupo SHAM ($P > 0.05$). El análisis post hoc de la prueba de Newman-Keuls, no observó efectos significativos entre el grupo AP5 y SHAM, durante la fase de adquisición (Figura 10).

En lo que respecta a los dos días de prueba no se observaron diferencias significativas ni en el número de cruces, ni en las latencias cuando se analizaron los resultados bajo la prueba estadística de t-student $P > 0.05$ (Figura 11).

Con estos resultados se observó que los receptores tipo NMDA no se encuentran participando en la adquisición de la memoria espacial en la corteza insular

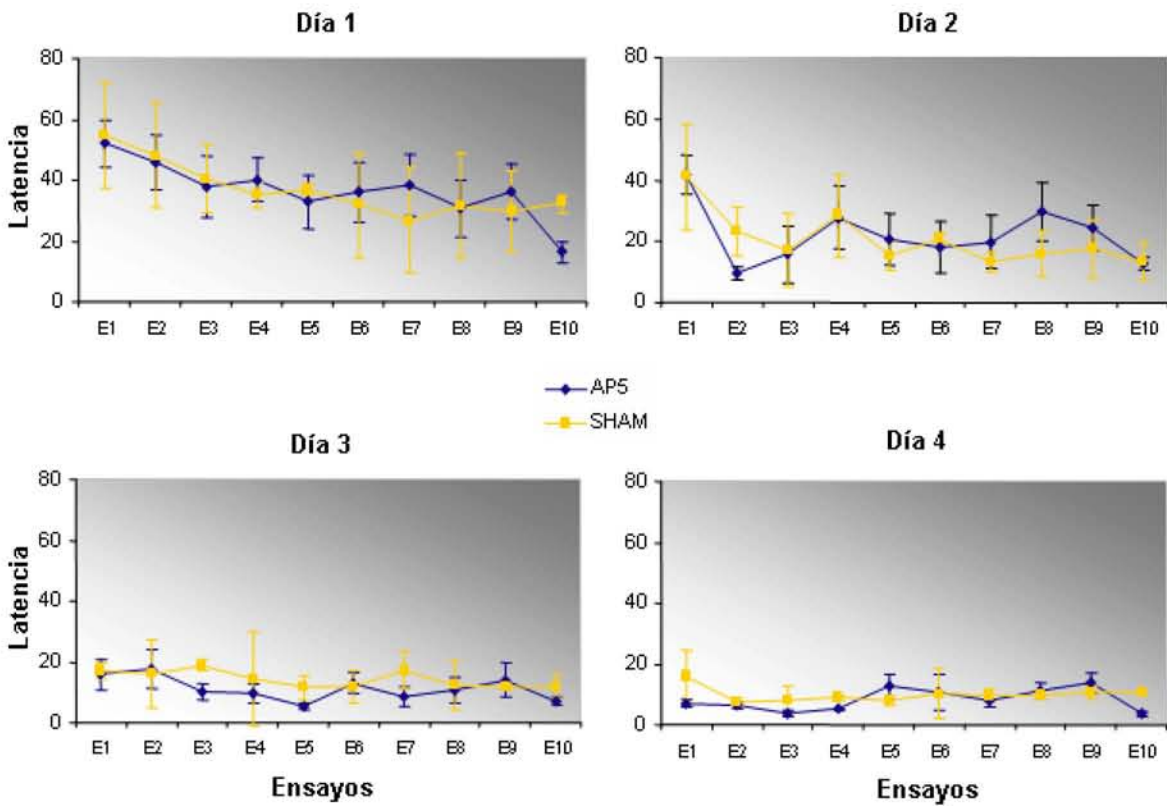


Figura 10. Curvas de aprendizaje en el laberinto acuático con la aplicación de AP5. Cada gráfica corresponde a las latencias de cada día de entrenamiento (4 días con 10 ensayos por día) en el laberinto acuático. La prueba estadística no mostró diferencias significativas entre las latencias del grupo AP5 (n = 6) y SHAM (n = 12), en los cuatro días de entrenamiento. Los datos fueron agrupados por ensayo \pm ES.

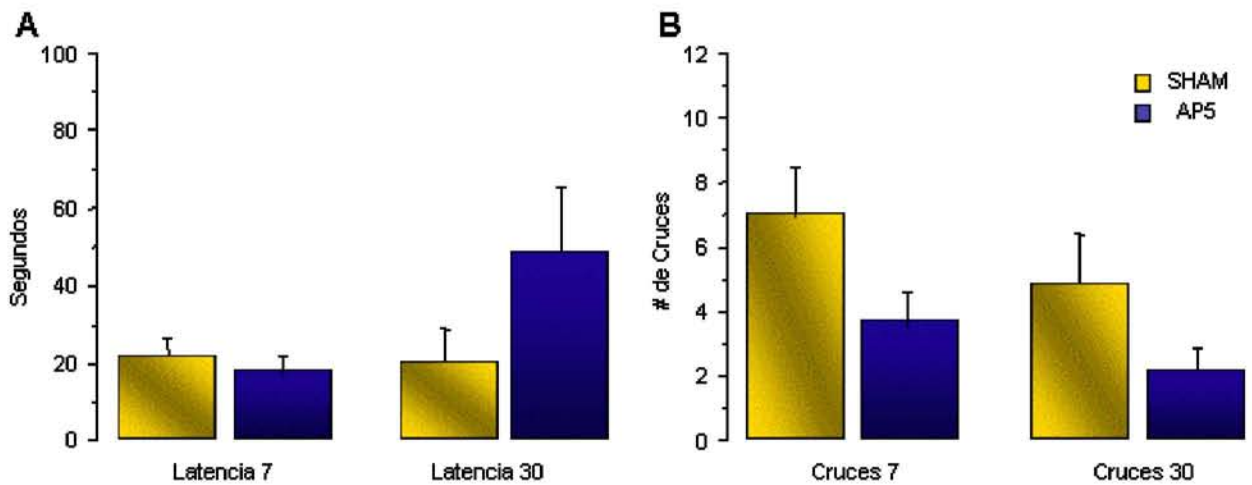


Figura 11. Gráficas de latencia y cruces en los días de PBA. En A se muestran las dos primeras barras que corresponden a las latencias (segundos) del primer día de prueba (7 días), que no tuvieron diferencias entre los grupos. Los resultados de la prueba de latencia después de 30 días tampoco observan diferencias entre los grupos AP5 y SHAM. En B, se muestra el número de cruces que corresponde a cada día de prueba (7 y 30 días). Los resultados comprenden a los animales del grupo AP5 (n = 6) y SHAM (n = 12) agrupados \pm ES.

Papel de un antagonista al receptor AMPA/kainato en el laberinto acuático

En este experimento, se utilizó NBQX, un antagonista del receptor AMPA/kainato con el objeto de observar si estos receptores se encontraban participando en la formación de la memoria espacial. Con base en el protocolo experimental planteado del experimento anterior en el laberinto acuático; NBQX fue microinyectado bilateralmente en la CI en concentración de 5 mg/ml. Posteriormente se hicieron dos pruebas de aprendizaje una después de 7 días y otra después de 30 días del último ensayo.

Al compararse los grupos SHAM y NBQX en las curvas de aprendizaje, no se observaron cambios significativos entre los grupos, después del análisis post hoc de Newman-Keuls ($P > 0.05$). Figura 12. De la misma forma no se obtuvieron diferencias significativas en las pruebas sobre la latencia y los cruces de 7 y 30 días con el análisis de t-student $P > 0.05$ (Figura 13).

Los resultados obtenidos de las curvas de aprendizaje y de los días de prueba, mostraron que no hubo efecto del antagonista sobre la adquisición de la tarea espacial en la corteza insular.

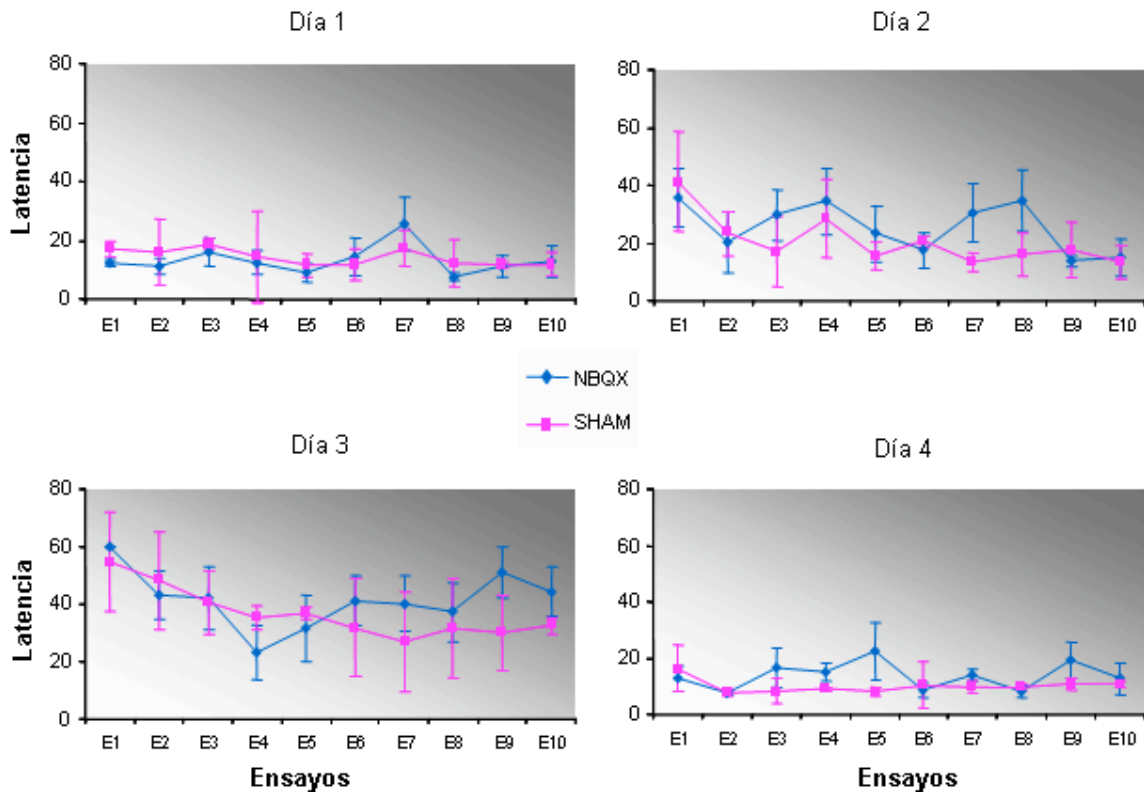


Figura 12. Curvas de aprendizaje obtenidas después de la aplicación de NBQX. En estas curvas de aprendizaje se observan las latencias (segundos) de diez ensayos durante cuatro días de entrenamiento. Cada gráfica corresponde a un día de entrenamiento. Como se muestra no hay diferencias entre las latencias de los grupos estudiados NBQX (n = 5) y SHAM (n = 12). Los datos se agruparon como promedio \pm ES.

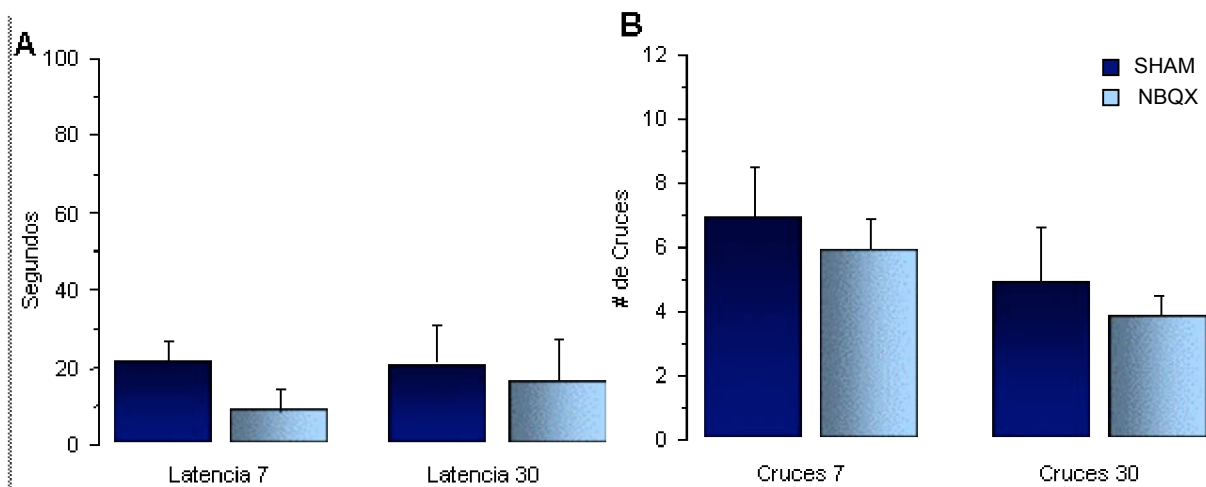


Figura 13. Gráficas de latencias y cruces en los días de prueba con la aplicación de NBQX. La primera barra corresponde al grupo SHAM (n = 5) y la siguiente al grupo inyectado con NBQX (n = 12). No se observa efecto de bloqueo por la microinyección de NBQX ni en la gráfica que corresponde a las latencias (A) de los 7 y 30 días, ni en la gráfica de cruces (B) en los dos días de prueba. Los datos fueron agrupados \pm ES.

Efecto del antagonista escopolamina en la adquisición del CAS

Aunque se ha demostrado la participación de los receptores muscarínicos a ACh en la formación del CAS (Naor y Dudai, 1996; Ramírez-Lugo, 2003), se probó escopolamina en concentración 60 mg/ml microinyectado bilateralmente en CI a una velocidad de 1 μ l/min, bajo el protocolo experimental del CAS, con el fin de observar la actividad del fármaco que se utilizaría en los experimentos posteriores. Los resultados se obtuvieron después de una prueba de aprendizaje realizada a las 72 hrs (Figura 14), a través de una ANOVA de una vía que mostró el efecto del bloqueo del CAS producido por la inyección de escopolamina ($F_{2,25} = 7.15$, $P = 0.001$). El análisis post hoc de Fisher mostró diferencias significativas entre los grupos SHAM y escopolamina ($P = 0.001$) y entre los grupos control intacto y escopolamina ($P = 0.001$).

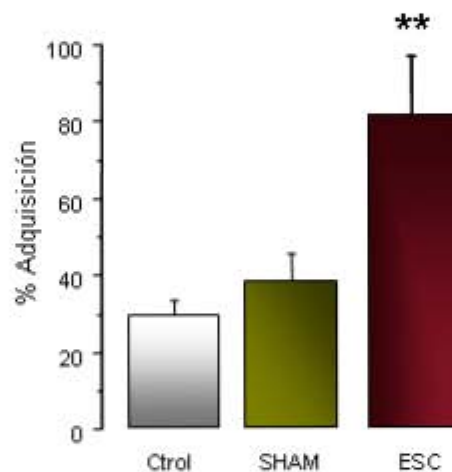


Figura 14. Gráfica del efecto de escopolamina en el CAS. En esta gráfica se observa el porcentaje de consumo durante la adquisición del CAS, la aplicación de escopolamina ($n = 8$) muestra un bloqueo en el aprendizaje aversivo de forma significativa con respecto a los grupos Ctrl ($n = 7$) y SHAM ($n = 13$). Los datos mostraron un nivel de significancia de $**P < 0.01$ y se graficaron como promedio \pm ES.

Efecto de escopolamina sobre la adquisición de la tarea del laberinto acuático

En relación a los experimentos donde se observó la participación de los receptores muscarínicos en la región de la CI en aprendizajes del tipo no declarativos, se planteó entonces la posibilidad de que también se encontraran participando estos receptores en aprendizajes espaciales como en el caso del laberinto acuático en la CI, por lo que en este experimento se utilizó escopolamina en concentración de 60 mg/ml, por microinyección bilateral en la CI, a una velocidad de 1 μ l/min.

Los animales fueron entrenados durante cuatro días consecutivos, la microinyección bilateral en CI del fármaco, se hizo 20 min antes de cada día de entrenamiento. Se hicieron dos pruebas de aprendizaje después de 7 y 30 días de concluido el último ensayo, como en los experimentos anteriores.

Los grupos escopolamina y SHAM fueron comparados bajo el análisis estadístico de una ANOVA de vías múltiples y la prueba post hoc de Newman-Keuls, que mostró diferencias significativas por la aplicación de escopolamina durante los cuatro días de entrenamiento con respecto al grupo SHAM ($P = 0.001$). Estos resultados se muestran como dos grupos; 1) grupo escopolamina con microinyección comparado con SHAM con microinyección y 2) grupo escopolamina sin microinyección con el grupo SHAM sin microinyección, para explicar posteriormente los resultados que se obtuvieron en los días de prueba (Figuras 15 y 17). Sin embargo, estos grupos no se dividieron durante los entrenamientos en la adquisición de la tarea y se compararon como grupo escopolamina y SHAM únicamente.

Como se observó en estas curvas de aprendizaje, los animales a los cuales se les microinyectó escopolamina no aprenden la tarea del laberinto acuático y el grupo SHAM tiene un aprendizaje de la tarea normal. Lo que demostró que los receptores muscarínicos a ACh se encuentran participando en la formación de la memoria espacial, en la CI.

En este experimento se quiso mostrar además que el efecto de bloqueo en la adquisición de la tarea provocado por la microinyección de escopolamina, no se debió a una dependencia al fármaco durante el aprendizaje (dependencia de estado), por lo que se dividieron los grupos SHAM y el grupo escopolamina como ya se describió anteriormente. Los animales de cada grupo fueron escogidos al azar y a la mitad de

cada grupo se le hizo microinyección de escopolamina y ringer antes de realizarse las pruebas de los días 7 y 30. El resto de los animales de cada grupo, realizaron la prueba sin la microinyección.

En este caso, los resultados que se obtuvieron de la prueba después de 7 días (Figura 18), fueron analizados con una t-student que mostró que los grupos de escopolamina y SHAM con microinyección antes de la prueba en latencias, son significativamente diferentes $t_{10} = 2.4$ ($P = 0.05$). En el número de cruces los grupos escopolamina y SHAM con microinyección este día, también muestran diferencias significativas $t_{10} = -2.1$ ($P = 0.05$).

Los resultados obtenidos de la prueba de latencias después de 7 días, en el grupo sin microinyección de escopolamina y el grupo SHAM sin microinyección antes de la prueba, mostraron una diferencia estadística significativa $t_9 = 2.4$ ($P = 0.05$). El grupo SHAM sin microinyección el primer día de prueba tiene también un menor número de cruces con respecto al grupo escopolamina $t_9 = -3.09$ ($P = 0.05$). Ver figura 16.

En la prueba realizada a los 30 días no se mostraron cambios significativos entre los grupos, ni en periodo de la prueba de latencia, ni en la gráfica del número de cruces, en ambos grupos, con y sin microinyección, cuando se analizaron los datos bajo una t-student $P > 0.05$ (Figura 16 y 18). Con estos resultados se observó que no hubo dependencia de estado cuando se tuvo la misma condición farmacológica de bloqueo a los receptores muscarínicos a ACh.

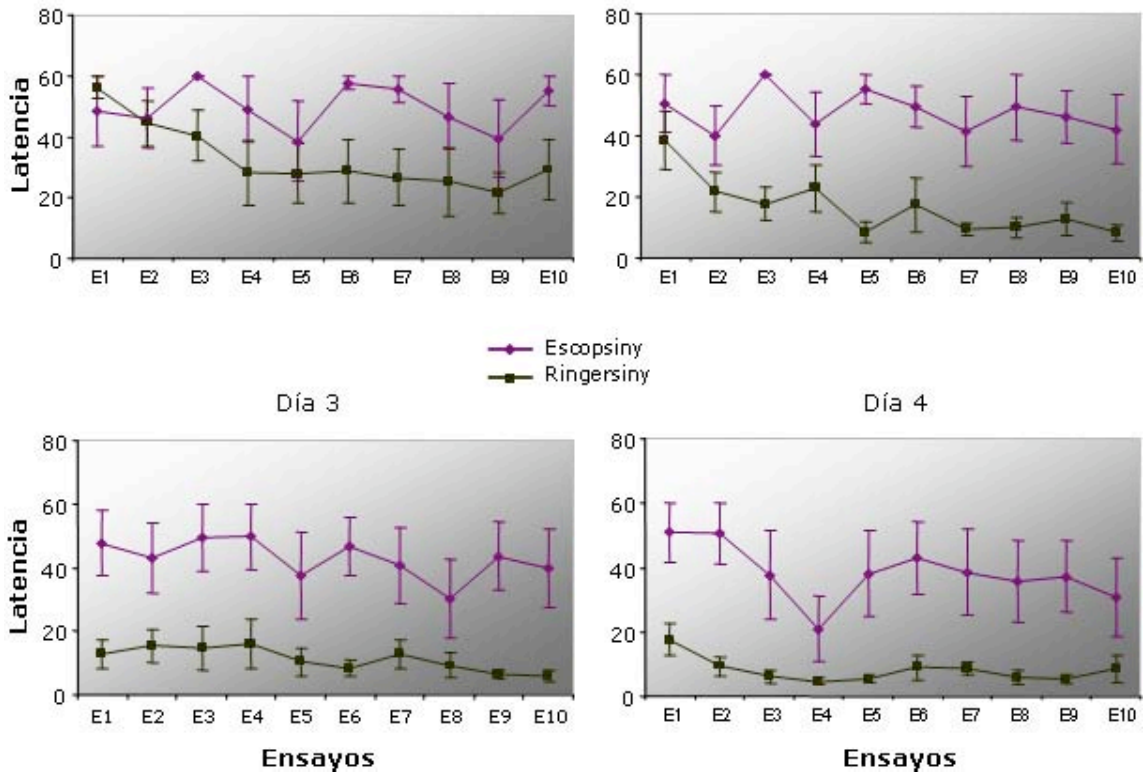


Figura 15. Efecto de escopolamina en la adquisición de la tarea del laberinto acuático. El grupo de escopolamina ($n = 5$) muestra un efecto de bloqueo a los receptores muscarínicos a ACh, cuando se microinyectó antes de la adquisición de la tarea espacial, con respecto al grupo SHAM ($n = 6$), en la CI. Este grupo únicamente fue separado gráficamente del anterior, aún cuando se trató del mismo experimento para hacer evidente que no fue microinyectado el día de la prueba. El análisis estadístico mostró diferencias significativas entre los grupos en cada día de entrenamiento ($**P < 0.01$) Los datos fueron agrupados como promedio \pm ES.

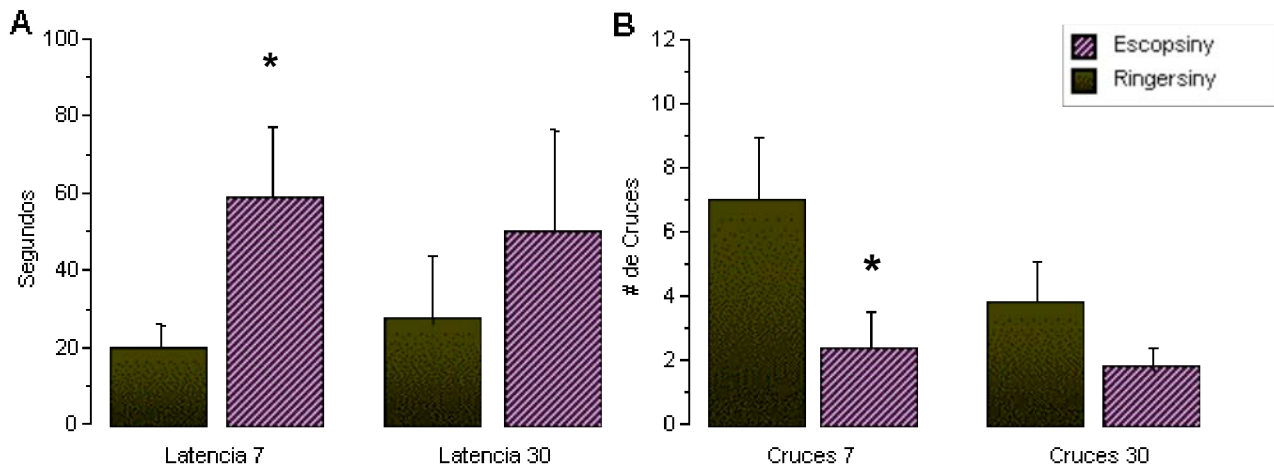


Figura 16. Gráficas de latencias y cruces en los días de prueba de los grupos sin microinyección. A) Gráfica de latencias obtenidas los días de prueba después de 7 y 30 días del último ensayo, donde se muestra un efecto de bloqueo en la formación de la memoria espacial en CI, en el primer día de prueba ($*P < 0.05$). B) Muestra los cruces en estos días de prueba, donde se alcanzó una diferencia estadística significativa entre los grupos a través de t-student en el día 7 de prueba ($*P < 0.05$). El día 30 no se encontraron diferencias significativas entre los grupos ni en latencias, ni en cruces. Estos son los resultados de los grupos que no recibieron microinyección. Los datos se encuentran agrupados \pm ES.

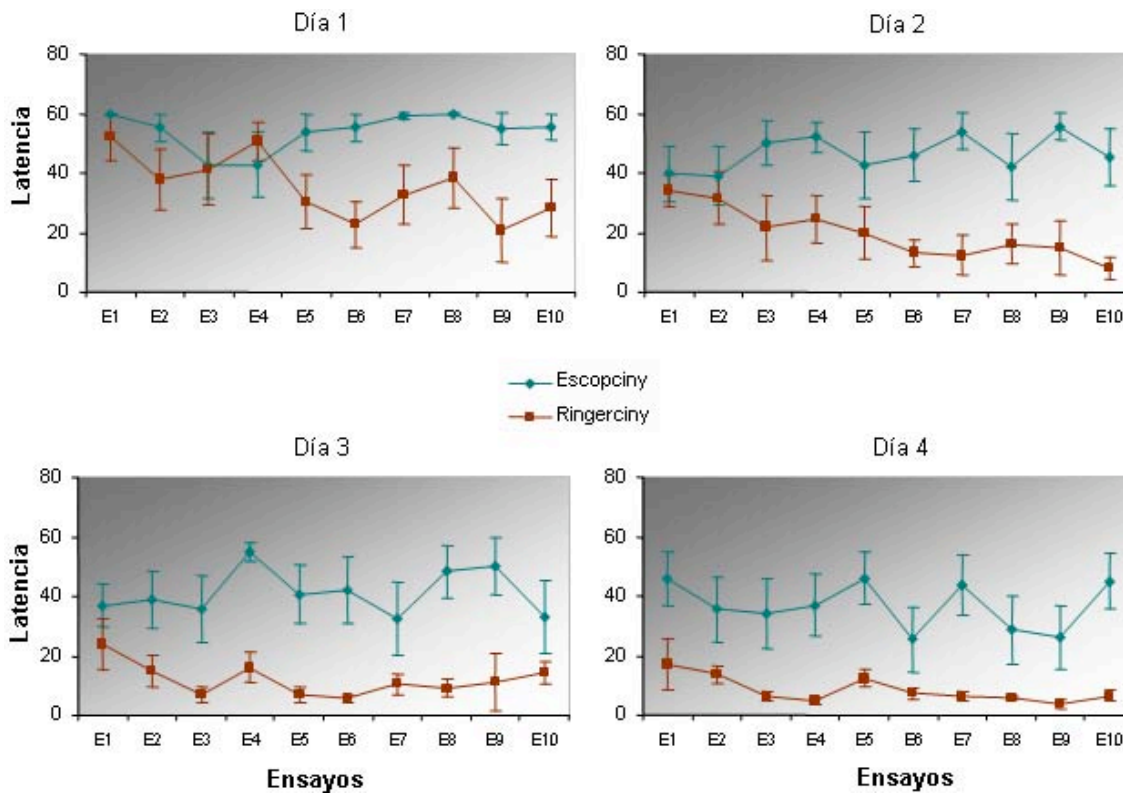


Figura 17. Curvas de aprendizaje del efecto de escopolamina en los días de adquisición. En estas curvas de aprendizaje se observa una falta de adquisición de la tarea espacial por parte del grupo de escopolamina en comparación con el grupo SHAM durante los cuatro días que duró el entrenamiento. Las diferencias fueron consideradas como la media \pm ES de una $n = 6$ en cada grupo. Los datos fueron analizados bajo una ANOVA de vías múltiples, con un análisis post hoc de Newman-Keuls significativo considerado de $**P < 0.01$.

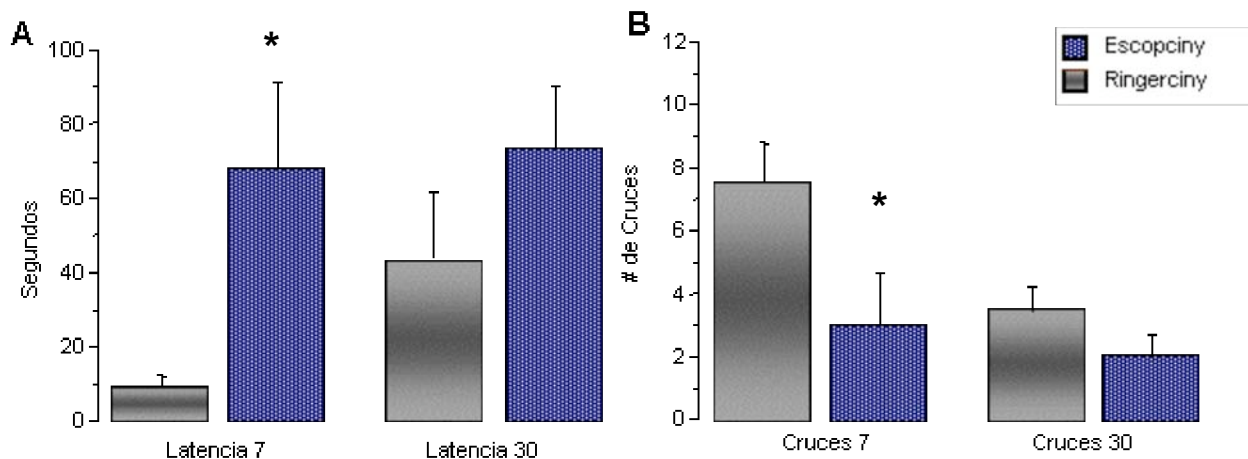


Figura 18. Gráficas de barras de los días de prueba de los grupos con microinyección de escopolamina. La prueba de latencia y cruces después de 7 días del último ensayo, muestra el efecto de bloqueo provocado por la microinyección de escopolamina. En A el grupo escopolamina mostró una mayor latencia en comparación al grupo SHAM ($*P < 0.05$). El segundo día de prueba (30 días), no muestra diferencias significativas entre los grupos. Con respecto al número de cruces B), se observan diferencias significativas entre el grupo SHAM y escopolamina ($*P < 0.05$). Los grupos tuvieron microinyección en ambos días. En este experimento se tuvieron en ambos grupos $n = 6$ y los resultados se agruparon como promedio \pm ES.

Participación de los receptores colinérgicos en la consolidación de la memoria espacial

En relación a los resultados del experimento anterior en donde se observó la participación de los receptores a ACh en la adquisición de la memoria espacial por la microinyección de escopolamina. En este experimento se microinyectó este antagonista después de cada día de entrenamiento, con la finalidad de observar si estos receptores se encontraban participando en el proceso de consolidación de esta memoria, por lo que se entrenó a los animales por cuatro días consecutivos, al término de cada día de entrenamiento, se microinyectó bilateralmente en CI, el fármaco en concentración de 60 mg/ml en la CI a una velocidad de 1 μ l/min.

Los resultados que se obtuvieron de este experimento fueron comparados a través de la ANOVA de vías múltiples en las curvas de aprendizaje con el análisis post hoc de Newman-Keuls. En este caso no se muestran diferencias significativas en las curvas de aprendizaje entre los grupos escopolamina y SHAM ($P > 0.05$) Figura 19.

Durante la prueba realizada a los 7 días no se observaron cambios significativos al compararse los grupos con la prueba estadística de t–student $P > 0.05$, ni en latencias (Ver figura 20), ni en el número de cruces (Ver figura 21). A través de estos resultados se demostró que los receptores muscarínicos a ACh no se encuentran participando en la consolidación de la memoria espacial en la CI.

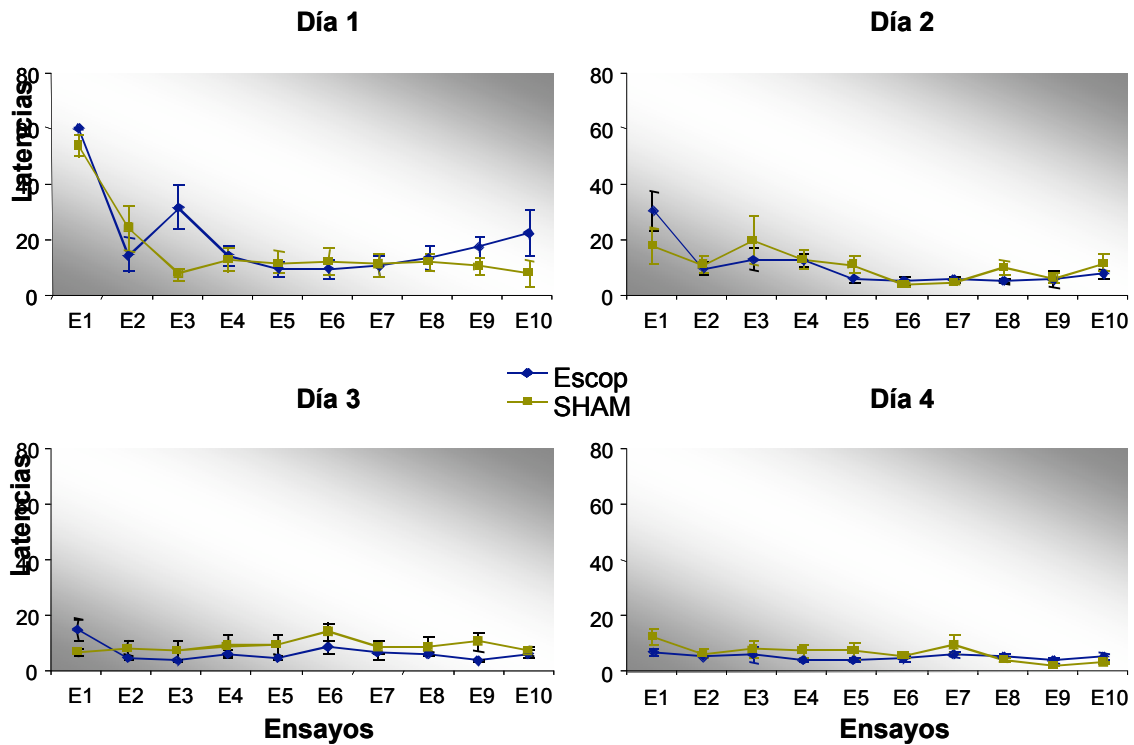


Figura 19. Curvas de aprendizaje de cuatro días de entrenamiento con microinyección de escopolamina después de cada día. En estas curvas se observa que el grupo escopolamina no tuvo diferencias significativas con respecto al grupo SHAM. El grupo escopolamina (n = 8) y SHAM (n = 6) se agruparon como promedio \pm ES

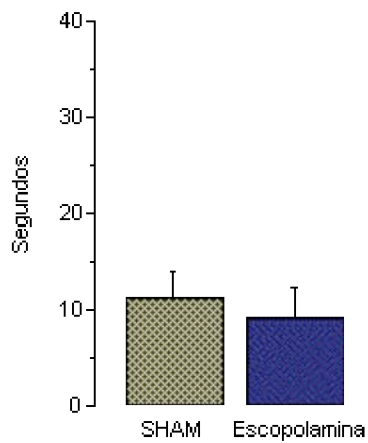


Figura 20. Gráfica de latencias en la prueba. En esta gráfica muestra que no existen diferencias significativas entre los grupos cuando se realizó la prueba después de 7 días de terminado el último entrenamiento. Los datos fueron considerados como promedio \pm ES.

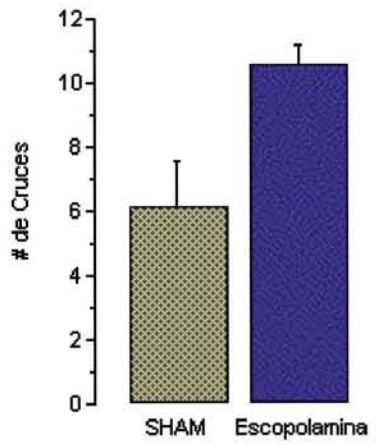


Figura 21. Gráfica del número de cruces en la prueba. Se muestran el resultado en el número de cruces el día de la prueba. En este caso no se observan diferencias entre los grupos SHAM y escopolamina. Los datos fueron agrupados como promedio \pm ES.

DISCUSIÓN

El laberinto acuático es una tarea conductual dependiente de hipocampo, que nos permite estudiar el aprendizaje espacial (Morris et al., 1990). En este trabajo se utilizó esta tarea para observar cambios en la formación de la memoria espacial a través de manipulaciones farmacológicas realizadas antes o después de cada día de entrenamiento, en corteza insular (CI), una región cortical cuya actividad se encuentra relacionada preferentemente a la memoria gustativa.

Los resultados obtenidos de los experimentos en los que se utilizó un antagonista para los receptores tipo NMDA (AP5) y un antagonista para los receptores tipo no-NMDA (NBQX), microinyectados antes de cada día de entrenamiento en el laberinto acuático, no tuvieron efecto en la formación de la memoria espacial, ya que no se observaron diferencias entre los grupos, ni en las curvas de aprendizaje mostradas (Ver figuras 10 y 12), ni en las gráficas obtenidas en la prueba de 7 y 30 días (Ver figuras 11 y 13). Estos resultados sugieren que en CI, los receptores ionotrópicos de glutamato no participan en la formación de la memoria espacial

Por otra parte, se observó un efecto de bloqueo sobre la memoria espacial cuando se microinyectó un antagonista a los receptores muscarínicos a ACh (escopolamina), antes de cada día de entrenamiento, en las curvas de aprendizaje (Figuras 15 y 17) y en los días de prueba (Figuras 16 y 18).

Dado estos resultados se descartó la posibilidad de que existiera una dependencia de estado por la microinyección de escopolamina, es decir; se quiso mostrar que no había diferencias en los días de prueba si se encontraban los animales bajo la misma condición farmacológica, por lo que se microinyectó el antagonista durante los días de prueba antes de que se realizaran. En los resultados mostrados se observó efecto sobre la evocación de la tarea del laberinto acuático entre los grupos comparados de microinyección y sin microinyección. Este efecto mostró en los resultados que no hubo diferencias entre los grupos cuando se encontraron bajo la misma condición farmacológica y no fueron consecuencia de una dependencia de estado por la microinyección de escopolamina (Figuras 16 y 18).

Estos resultados sugieren que los receptores metabotrópicos de ACh son necesarios para la formación de la memoria espacial en el laberinto acuático. Sin

embargo, cuando se probó escopolamina después de cada día de entrenamiento para observar si tenía efecto sobre la consolidación de la memoria espacial, se demostró que no hubo cambios en la formación de ésta, por no mostrarse un efecto en los grupos ni durante las curvas de aprendizaje (Figura 19), o en el día de prueba (Figuras 20 y 21).

Los receptores glutamatérgicos en el aprendizaje espacial en la CI

La actividad de la CI se ha reportado preferentemente asociada con el aprendizaje gustativo (Gutiérrez et al., 1999a; Gutiérrez et al., 2003a, b). Sin embargo, Gutiérrez y colaboradores (1999a), describieron la participación de los receptores tipo NMDA, en la tarea del laberinto acuático. Ellos mostraron a través de este experimento que la aplicación de AP5 microinyectado antes del entrenamiento en el laberinto, afectó la fase de adquisición de la memoria espacial en la CI.

Sin embargo, los resultados que se presentaron en este trabajo, mostraron que cuando se microinyectó el antagonista AP5 a los receptores tipo NMDA en el laberinto acuático en la CI, colocada antes del sobrentrenamiento (4 días de entrenamiento consecutivos), no produjo un bloqueo en la fase de adquisición (Ver figura 10), ni en la evocación de la memoria espacial, en los resultados obtenidos durante la prueba a los 7 y 30 días (Ver figura 11). Lo que demostró que los receptores tipo NMDA no se encuentran participando en la formación de la memoria espacial en estos experimentos, a diferencia de lo reportado por Gutiérrez y colaboradores (1999a), quienes obtuvieron efecto de AP5 con un solo día de entrenamiento.

Este resultado no esperado, sugirió la posibilidad de que existiera un problema en la actividad farmacológica del AP5 sobre los receptores tipo NMDA o que hubieran errores experimentales, por lo que se probó este antagonista en la tarea de condicionamiento aversivo a los sabores (CAS) en la CI, con la finalidad de asegurar que el AP5 mostrara el efecto de bloqueo a los receptores tipo NMDA como ya se había reportado previamente (Gutiérrez et al., 1999a; Gutiérrez et al., 2003a).

Los resultados de este experimento demostraron que la concentración utilizada era correcta para tener un efecto de bloqueo a los receptores glutamatérgicos y que se hizo la cirugía colocando las cánulas en las posición correcta de la región a estudiar

(CI), de forma que la microinyección de AP5 tuvo un efecto sobre la adquisición de la tarea del CAS (Ver figura 9).

Al descartarse alguna falla en la manipulación experimental, una explicación a la diferencia entre los resultados obtenidos en este trabajo y lo reportado previamente (Gutiérrez et al., 1999a), es que el sobrentrenamiento provocara la activación de procesos no dependientes a los receptores tipo NMDA.

Con la exposición a un sobrentrenamiento Ramírez-Amaya y colaboradores (1999; 2001), demostraron la activación de mecanismos que no se observan con un entrenamiento de un solo día, particularmente en el aumento en la cantidad de sinapsis en la región hipocampal de CA3. Sin embargo, no es posible determinar en este caso, si el sobrentrenamiento en la CI, tuviera una actividad semejante a la de hipocampo, ya que ésta última estructura es altamente plástica. No hay reportes en la literatura que propongan la generación de nuevos contactos sinápticos en la CI como consecuencia de un sobrentrenamiento.

Una diferencia importante además del sobrentrenamiento en este trabajo con respecto a lo reportado de Gutiérrez y colaboradores (1999a), no fue únicamente que ellos tuvieron un solo día de entrenamiento, sino también fue el momento de microinyección, ya que en su trabajo AP5 fue microinyectado bilateralmente en la CI, a partir del 5 ensayo, es decir tuvieron 4 ensayos de aprendizaje de la tarea, lo que sugiere que posiblemente el antagonista bloqueó el proceso de consolidación de la memoria y no la fase de adquisición como ellos reportaron. En este trabajo se hizo la microinyección antes de que se iniciaran los entrenamientos de cada día lo que demostró que posiblemente no se encuentren participando los receptores tipo NMDA en la adquisición de la tarea espacial.

No se descarta la posibilidad de que los receptores AP5 tengan un importante función en el proceso de consolidación de la memoria y es necesario hacer experimentos para demostrarlo.

En este sentido, Packard y Teather (1997), reportaron que la inyección de AP5 o el antagonista MK801 en el hipocampo, inmediatamente después de entrenamiento en el laberinto acuático bloquea la consolidación de la tarea después de una prueba a las 24 hrs. Ellos sugieren que los receptores tipo NMDA tiene una ventana de tiempo de

menos de 2 hrs para que se consolide la memoria, sin embargo su entrenamiento fue de un día con 8 ensayos únicamente, por lo que el efecto sobre la consolidación varía en la duración del entrenamiento y el periodo en que se realizó la prueba de evocación.

Actualmente se considera que el bloqueo de los receptores tipo NMDA tiene algún efecto en la transmisión sináptica mediada por los receptores tipo no-NMDA o AMPA/kainato (Collingridge et al., 1983).

Por lo que se hicieron experimentos donde se microinyectó NBQX el antagonista a los receptores AMPA/kainato bilateralmente en CI, antes de los entrenamientos (4 días consecutivos), con pruebas de memoria a los 7 y 30 días para observar si estos receptores se encontraban participando en la formación de la memoria espacial.

Los resultados que se obtuvieron, no mostraron efecto en la adquisición y evocación de la memoria espacial por la aplicación del antagonista NBQX en la CI (Ver figura 12).

Anteriormente, NBQX fue utilizado en la tarea del CAS en CI (Berman et al., 2000), mostrando un bloqueo en la adquisición del aprendizaje, lo que demostró que los receptores AMPA/kainato participaban en la adquisición del aprendizaje aversivo.

Sin embargo, Parada y su grupo (1992), mostraron que NBQX no tiene efecto en el laberinto Y, y no bloquea el aprendizaje en la tarea de prevención pasiva, que coincide con los resultados obtenidos de este experimento.

Existen algunos reportes de bloqueos en la adquisición y evocación de memorias espaciales por la acción de otros antagonistas a estos receptores, en otras regiones corticales (Filliat et al., 1998; Sargolini et al., 2003), y esta evidencia indica que, la actividad hipocampal mediada por los receptores tipo no-NMDA persiste después de 3 horas de concluido el entrenamiento espacial y para que la memoria sea consolidada se ha considerado que esta actividad es transmitida a otras áreas cerebrales como la corteza entorinal y la región posterior de la corteza parietal, con la ayuda de otras vías de neurotransmisión como neuronas dopaminérgicas, serotoninérgicas y noradrenérgicas.

La corteza entorinal y la región posterior de la corteza parietal participan en la consolidación de la memoria minutos después de que la actividad hipocampal

comienza, a través de los procesos de los receptores tipo-NMDA, y su intervención es necesaria para completar la consolidación de la memoria (Izquierdo y Medina, 1997).

Esto sugirió la posibilidad de que alguna de estas vías de neurotransmisión activadas por el sobentrenamiento a través de otras estructuras fueran responsables de la adquisición y posteriormente la evocación de la memoria espacial en la CI, como se mostró en los días de prueba al no mostrarse cambios significativos entre los grupos (Figura 13).

En resumen, estos experimentos confirman que tanto los receptores tipo NMDA y los receptores tipo no-NMDA no son importantes en la formación del aprendizaje en una tarea espacial en CI y si son importantes en otras tareas de aprendizaje como el CAS, donde se ha demostrado que esta estructura es muy importante (Gutiérrez et al., 1999a,c Gutiérrez et al., 2003a, b; Ramírez Lugo et al., 2003).

Participación de los receptores muscarínicos a ACh en la memoria espacial en la CI

En este trabajo se probó la participación de los receptores muscarínicos a ACh a través de la microinyección de escopolamina, en la tarea del laberinto acuático en la CI, con el fin de observar su participación en la formación de la memoria espacial. Para esto se hizo microinyección bilateral en esta región, antes del entrenamiento (4 días consecutivos), y se realizaron pruebas de evocación de la memoria a los 7 y 30 días después de concluidos los ensayos.

El efecto de antagonistas muscarínicos a ACh en memoria espacial, ya se había reportado con la administración del antagonista atropina, en el cerebro anterior basal, mostrando que su inyección, disminuye las respuestas a nuevas pistas visuales y la orientación visual en el laberinto acuático (Whishaw et al., 1987). Se reportó también, que en estructuras cerebrales de la corteza prefrontal, escopolamina bloquea la adquisición del aprendizaje espacial (Kesner et al., 1996; Ragozzino et al., 1998; Ragozzino y Kesner, 1999).

Particularmente no hay reportes que demuestren que la escopolamina tenga un efecto en la formación de la memoria espacial en la tarea del laberinto acuático en CI. Los resultados obtenidos en los experimentos de este trabajo, demostraron que la

actividad de estos receptores es necesaria en la adquisición de la memoria espacial en esta región cortical, donde el análisis estadístico mostró diferencias significativas en las curvas de aprendizajes en los 4 días de entrenamiento, entre el grupo al que se le microinyectó escopolamina y el grupo SHAM (Figuras 15 y 17). En este sentido, los resultados coinciden con lo reportado previamente con otros antagonistas en otras regiones corticales como se citó anteriormente (Whishaw et al., 1987; Kesner et al., 1996; Ragozzino et al., 1998; Ragozzino y Kesner, 1999).

Se hizo además un experimento para descartar la posibilidad de que se estuviera induciendo un aprendizaje dependiente de estado por la microinyección de escopolamina en los días de prueba, para esto se dividió el grupo al cual se le microinyectó el fármaco, al igual que el grupo SHAM, en dos grupos denominados con microinyección y sin microinyección (Ver figuras 16 y 18).

Los resultados observaron que los animales en ambos grupos, con microinyección (que se encontraron en la misma condición farmacológica que cuando fueron entrenados), y el grupo sin microinyección, mostraron diferencias significativas en la prueba de latencia y cruces en la prueba a los 7 días con respecto al grupo SHAM, sugiriendo que el efecto en la formación de la memoria provocado por la aplicación de escopolamina no fue un efecto dependiente de estado, (Figuras 16 y 18).

La prueba del día 30, no mostró diferencias significativas entre los grupos comparados con y sin microinyección, una posible explicación a este resultado, puede ser que los animales fueron expuestos al laberinto durante la prueba del día 7, es decir que existiera extinción de la memoria.

Hay que mencionar que el sobrentrenamiento no afectó la actividad de los receptores colinérgicos por lo que escopolamina tuvo el efecto esperado, lo que demuestra que la vía de neurotransmisión colinérgica tiene un importante papel en la formación de la memoria espacial en CI.

Existe además evidencia del efecto de bloqueo producido por la microinyección de escopolamina en la CI en el CAS (Naor y Dudai, 1996), y el efecto de los antagonistas escopolamina y pirenzepina bloqueando la adquisición del aprendizaje en esta mismo condicionamiento aversivo, a través de los receptores muscarínicos postsinápticos m1, m3 y m5 a ACh, en la CI (Ramírez- Lugo et al., 2003), donde los

receptores m1 fueron localizados también en estructuras como corteza, amígdala medial y basolateral e hipocampo (Spencer et al., 1986; Wall et al., 1991; Piggott et al., 2002), y la inyección ventricular de pirenzepina durante la adquisición de la memoria de trabajo en el laberinto radial bloqueó la adquisición de la tarea (Sala et al., 1991).

Estos trabajos sugieren que el sistema colinérgico a través de los receptores muscarínicos, participan en la adquisición de diferentes tareas de aprendizaje, por lo que se probó la escopolamina en CAS en CI, en donde se observó un bloqueo en la adquisición de esta tarea (Ver figura 14), tal como ya se había reportado (Ramírez Lugo et al., 2003).

Estos resultados demostraron que los receptores muscarínicos a ACh en CI, tanto en el aprendizaje gustativo como en el aprendizaje espacial son importantes en la adquisición de la memoria.

En ninguno de estos casos se han descrito deficiencias en la actividad motora por la aplicación de los antagonistas a estos receptores, lo que permitió descartar la posibilidad de que los efectos obtenidos sobre la adquisición del aprendizaje de la tarea del laberinto acuático en este experimento, fueran ocasionadas por una deficiencia motora debida a la microinyección bilateral en CI de escopolamina. Los resultados de la curva de aprendizaje del día 1 y 2 (Ver figura 17), mostraron que hay en los primeros dos ensayos un aprendizaje del laberinto acuático semejante entre los grupos, lo que indica una actividad motora normal en los animales.

La comprobación de los efectos en la actividad motora por escopolamina ya se había reportado en el experimento de Whishaw y colaboradores (1987), donde no hubo alteraciones de tipo motor que pudieran evitar la falta de aprendizaje en las ratas (Cain, 1997).

Actualmente, algunos reportes en la literatura han descrito resultados controversiales en relación a los efectos de escopolamina que no definen si ésta provoca efectos de bloqueos sobre los procesos de memoria de forma *per se*, es decir; vía un rompimiento en la adquisición, el mantenimiento del trazo, por actuar sobre mecanismos de evocación o si las deficiencias que se observaron fueron resultado de una inhibición en los procesos de consolidación en memorias espaciales (Cheal, 1981; Beatty et al., 1986; Dunne y Hartley, 1986; Flood y Cherkin, 1986).

Es por esto que se planteó la posibilidad de que los receptores muscarínicos a ACh se encontraran participando en el proceso de consolidación de la memoria espacial, por lo que se hizo un experimento en el cual se microinyectó bilateralmente en CI, escopolamina después de cada entrenamiento (4 días consecutivos).

La introducción de la administración de fármacos pos-entrenamiento, provee un método de investigación de los efectos de éstos sobre la consolidación de la memoria sin involucrar su efecto en la adquisición o evocación (McGaugh, 1966). En relación a los receptores colinérgicos se reportó por primera vez el trabajo de Stratton y Petrinovich (1963), que mostraron que la administración pos-entrenamiento de fisostigmina (un inhibidor de acetilcolinesterasa), incrementa la memoria en ratas. Otros estudios observaron que la inyección de antagonistas colinérgicos pos-entrenamiento afecta la formación del aprendizaje (Kopf et al., 1998; Schroeder y Packard, 2002).

También se ha reportado que la inyección del antagonista a los receptores muscarínicos, atropina, bloquea no solo la consolidación de la memoria sino también afecta otros sistemas de neurotransmisión en la amígdala (Dalmaz et al., 1993; Introini-Collison et al., 1996; Power et al., 2000).

Todos estos estudios sugieren la participación del sistema colinérgico en la consolidación de diferentes tareas.

Con la microinyección de escopolamina después de cada día de entrenamiento en este trabajo, no se observaron diferencias significativas entre los grupos comparados, como se mostró en las graficas de aprendizaje (Figura 19). Los resultados que se obtuvieron en la evocación de la tarea (prueba después de 7 días), tampoco mostraron cambios significativos entre los grupos comparados (Figuras 20 y 21), lo que sugiere que los receptores muscarínicos a ACh no se encuentran participando en la fase de consolidación de la memoria espacial, en la región de CI.

Anteriormente, Barros y su grupo (2002) compararon los efectos de la infusión de oxotremorina en la amígdala basolateral, en el pre-entrenamiento y en el pos-entrenamiento mostrando que, inyectada antes del entrenamiento facilitaba la memoria de largo plazo y no afectaba la memoria de corto y si se colocaba después del entrenamiento selectivamente facilitaba la memoria de largo plazo. Lo que indicó que los mecanismos de facilitación en los receptores muscarínicos a ACh en la

consolidación de la memoria son independientes de los que actúan durante la adquisición (Barros et al., 2002, Power y McGaugh, 2002), que coincide con el resultado obtenido por la microinyección de escopolamina que afecta la formación de la memoria espacial en CI antes de la adquisición del aprendizaje espacial y no cuando se microinyectó después de los entrenamientos donde no mostró efecto. A través de estos experimentos se demostró que los receptores muscarínicos a ACh son importantes en la adquisición y no en la consolidación de la memoria espacial en CI.

Ya se ha reportado que inicialmente la información perceptual y la información conductual, son procesadas en diversas áreas neocorticales. Sin embargo, la capacidad de estos componentes está limitada por el tiempo, en tanto que la región parahipocampal, la cual recibe entradas convergentes desde áreas de asociación neocortical envía proyecciones que retornan a estas mismas áreas, empleadas para mediar y extender la persistencia de las representaciones neocorticales. Las neuronas hipocampales están involucradas en mediar el restablecimiento de detalles en representaciones neocorticales, más que de almacenar los detalles en si mismos. Es por esta razón que se piensa que la memoria hipocampal puede tener un papel temporal en la consolidación de memorias corticales (Eichenbaum, 2000).

Hay que señalar que este trabajo se mostró de forma clara, la participación de los receptores muscarínicos a ACh, aunque no se determina si las señales actúan en forma aferente o eferente entre el hipocampo (involucrado directamente con el aprendizaje espacial) y la CI, pero se sugiere como un avance en el entendimiento de este sistema ya que es muy claro que esta corteza tiene una participación importante en la memoria espacial, como lo demuestran los resultados de este trabajo.

CONCLUSIONES

El sistema colinérgico en la CI, a través de los receptores muscarínicos a ACh, participa en la formación de la memoria espacial, este efecto no se debe a la inducción de un aprendizaje dependiente de estado.

Los receptores ionotrópicos de glutamato, no son necesarios en la adquisición, ni en la evocación de la tarea del laberinto acuático en CI, pero si son necesarios en la formación del aprendizaje gustativo.

Los receptores muscarínicos a ACh, no son necesarios en la consolidación de la memoria espacial, en la tarea del laberinto acuático en la CI.

BIBLIOGRAFÍA

Abel, T. y Kandel, E. (1998). Positive and negative regulatory mechanisms that mediate long-term memory storage. *Brain Res. Rev.* 26, 360-378.

Abel, T. y Lattal, K.M. (2001). Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11, 180-187.

Adams, B., Lee, M., Fahnestock, M. y Racine, R.J. (1997). Long-term potentiation trains induce mossy fiber sprouting. *Brain Res.* 775, 193-197.

Adams, J.P. y Sweatt, J.D. (2002). Molecular psychology: roles for the ERK MAP kinase cascade in memory. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 42, 135-163.

Aggleton, J.P., Burton, M.J. y Passingham, R.E. (1980). Cortical and subcortical afferents to the amygdala of the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Brain Res.* 190, 347-368.

Amaral, D.G. y Witter, M.P. (1989). The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* 31, 571-591..

Bailey, C.H., Bartsch, D. y Kandel, E.R. (1996). Toward a molecular definition of long-term memory storage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 13445-13452.

Barros, D.M., Izquierdo, L.A., Mello e Souza, Ardenghi, P.G., Pereira, P., Medina, J.H. e Izquierdo, I. (2000). Molecular signalling pathways in the cerebral cortex are required for retrieval of one-trial avoidance learning in rats. *Behav. Brain Res.* 114, 183-192.

Barros, D.M., Pereira, P., Medina, J.H. e Izquierdo, I. (2002). Modulation of working memory and of long- but not short-term memory by cholinergic mechanisms in the basolateral amygdala 94. *Behav. Pharmacol.* 13, 163-167.

Bear, M.F. y Singer, W. (1986). Modulation of visual cortical plasticity by acetylcholine and noradrenaline. *Nature* 320, 172-176.

Beatty, W.W., Butters, N. y Janowsky, D.S. (1986). Patterns of memory failure after scopolamine treatment: implications for cholinergic hypotheses of dementia. *Behav. Neural Biol.* 45, 196-211.

Becker, C.G., Artola, A., Gerardy-Schahn, R., Becker, T., Welzl, H. y Schachner, M. (1996). The polysialic acid modification of the neural cell adhesion molecule is involved in spatial learning and hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci Res.* 45, 143-152.

Berman, D.E., Hazvi, S., Neduva, V. y Dudai, Y. (2000). The role of identified neurotransmitter systems in the response of insular cortex to unfamiliar taste: activation of ERK1-2 and formation of a memory trace. *J Neurosci* 20, 7017-7023.

Bermudez-Rattoni, F. y McGaugh, J.L. (1991). Insular cortex and amygdala lesions differentially affect acquisition on inhibitory avoidance and conditioned taste aversion. *Brain Res.* 549, 165-170.

Bermudez-Rattoni, F., Introini-Collison, I.B. y McGaugh, J.L. (1991). Reversible inactivation of the insular cortex by tetrodotoxin produces retrograde and anterograde amnesia for inhibitory avoidance and spatial learning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 5379-5382.

Bermúdez-Rattoni F. y Prado.Alcalá.R.A. (1995). Plasticity in the Central Nervous System: Learning and Memory. Lawrence Erlbaum Associates ed. Hillside NJ: pp. 67-82.

Bermúdez-Rattoni.F. Ormsby C.E., Escobar M.L. y Hernández-Echegaray. (1995). The role of insular cortex in the acquisition and long lasting memory for aversively motivated behaviors. *Behavioral Neural Biology*.

Bermúdez-Rattoni F.y del Prado Alcalá J. (2001). Clasificación de la memoria. En *Memoria. Dónde reside y cómo se forma*, Trillas, ed. México D. F: pp. 11-25.

Bliss,T (1998). *The Physiological Basis of Memory From Brains to Consciousness? Essays on the New Sciences of the Mind*. Princeton UP: pp. 73-93.

Bliss,T.V. y Lomo,T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 232, 331-356.

Bonner,T.I. (1989). The molecular basis of muscarinic receptor diversity. *Trends Neurosci* 12, 148-151.

Bontempi,B., Laurent-Demir,C., Destrade,C. y Jaffard,R. (1999). Time-dependent reorganization of brain circuitry underlying long-term memory storage. *Nature* 400, 671-675.

Bottini,G., Sterzi,R., Paulesu,E., Vallar,G., Cappa,S.F., Erminio,F., Passingham,R.E., Frith,C.D. y Frackowiak,R.S. (1994). Identification of the central vestibular projections in man: a positron emission tomography activation study. *Exp.Brain Res.* 99, 164-169.

Bozon,B., Kelly,A., Josselyn,S.A., Silva,A.J., Davis,S. y Laroche,S. (2003). MAPK, CREB and zif268 are all required for the consolidation of recognition memory. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* 358, 805-814.

Brito,G.N.; Thomas,G.J.; Davis,B.J. y Gingold,S.I. (1982). Prelimbic cortex, mediodorsal thalamus, septum, and delayed alternation in rats. *Exp.Brain.Res.* 54, 56-58.

Brito,G.N. y Brito,L.S. (1990). Septohippocampal system and the prefrontal sector of frontal cortex: a neuropsychological battery analysis in the rat. *Behav.Brain Res.* 36, 127-146.

Brown J.J.,Lasiter P.S.y Kiefer S.W (1982). The gustatory neocortex of the rat. *Physiol.Psychol* 10, 13-45.

Bures,J., Fenton,A.A., Kaminsky,Y. y Zinyuk,L. (1997). Place cells and place navigation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94, 343-350.

Burges N.,J.K.J.y.O.K.J. (1999). *The Hippocampal and Parietal Foundations of Spatial Cognition*. England: pp. 345-356.

Cain,D.P. (1997). Prior non-spatial pretraining eliminates sensorimotor disturbances and impairments in water maze learning caused by diazepam. *Psychopharmacology (Berl)* 130, 313-319.

Carl P.J.,Dolka L.J.,Gardner E.L.,Hann D.,Passebet J.C.,Fitzgerarld L.y Leiman M. (1985). Ibotenic acid lesions of the nucleus basalis of meynert impair spatial-reference memory in the Morris water maze. *Soc.Neurosci.Abstr* 11, 332.

Carpenter M (1985). *Core Text of Neuroanatomy*. Williams and Wilkins ed. Baltimore.

Cheal,M.L. (1981). Scopolamine disrupts maintenance of attention rather than memory processes. *Behav.Neural Biol.* 33, 163-187.

Chikama,M., McFarland,N.R., Amaral,D.G. y Haber,S.N. (1997). Insular cortical projections to functional regions of the striatum correlate with cortical cytoarchitectonic organization in the primate. *J Neurosci* 17, 9686-9705.

- Collingridge, G.L., Kehl, S.J. y McLennan, H. (1983). Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus. *J Physiol* 334, 33-46.
- Dalmaz, C., Introini-Collison, I.B. y McGaugh, J.L. (1993). Noradrenergic and cholinergic interactions in the amygdala and the modulation of memory storage. *Behav. Brain Res.* 58, 167-174.
- Davis, H.P. y Squire, L.R. (1984). Protein synthesis and memory: a review. *Psychol. Bull.* 96, 518-559.
- Davis, S., Butcher, S.P. y Morris, R.G. (1992). The NMDA receptor antagonist D-2-amino-5-phosphonopentanoate (D-AP5) impairs spatial learning and LTP in vivo at intracerebral concentrations comparable to those that block LTP in vitro. *J Neurosci* 12, 21-34.
- Decker, M.W., Majchrzak, M.J. y Anderson, D.J. (1992). Effects of nicotine on spatial memory deficits in rats with septal lesions. *Brain Res.* 572, 281-285.
- DeCoteau, W.E., Kesner, R.P. y Williams, J.M. (1997). Short-term memory for food reward magnitude: the role of the prefrontal cortex. *Behav. Brain Res.* 88, 239-249.
- Delacour, J., Houcine, O. y Costa, J.C. (1990). Evidence for a cholinergic mechanism of "learned" changes in the responses of barrel field neurons of the awake and undrugged rat. *Neuroscience* 34, 1-8.
- Delatour, B. y Gisquet-Verrier, P. (1996). Prelimbic cortex specific lesions disrupt delayed-variable response tasks in the rat. *Behav. Neurosci* 110, 1282-1298.
- DeZazzo, J. y Tully, T. (1995). Dissection of memory formation: from behavioral pharmacology to molecular genetics. *Trends Neurosci* 18, 212-218.
- Dokla, C.P. y Thal, L.J. (1988). Effect of cholinesterase inhibitors on Morris water task behavior following lesions of the nucleus basalis magnocellularis. *Behav. Neurosci* 102, 861-871.
- Dudai, Y. (2002). Molecular bases of long-term memories: a question of persistence. *Curr. Opin. Neurobiol* 12, 211-216.
- Dunne, M.P. y Hartley, L.R. (1986). Scopolamine and the control of attention in humans. *Psychopharmacology (Berl)* 89, 94-97.
- Eichenbaum, H., Clegg, R.A. y Feeley, A. (1983). Reexamination of functional subdivisions of the rodent prefrontal cortex. *Exp. Neurol.* 79, 434-451.
- Eichenbaum, H., Fagan, A., Mathews, P. y Cohen, N.J. (1988). Hippocampal system dysfunction and odor discrimination learning in rats: impairment or facilitation depending on representational demands. *Behav. Neurosci* 102, 331-339.
- Eichenbaum, H., Schoenbaum, G., Young, B. y Bunsey, M. (1996). Functional organization of the hippocampal memory system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 93, 13500-13507.
- Eichenbaum, H. (1997). Declarative memory: insights from cognitive neurobiology. *Annu. Rev. Psychol.* 48, 547-572.
- Eichenbaum, H. (2000). Hippocampus: mapping or memory?. *Curr. Biol.* 10, R785-R787.
- Escobar, M.L., Barea-Rodriguez, E.J., Derrick, B.E., Reyes, J.A. y Martinez, J.L., Jr. (1997). Opioid receptor modulation of mossy fiber synaptogenesis: independence from long-term potentiation. *Brain Res.* 751, 330-335.

- Everitt,B.J. y Robbins,T.W. (1997). Central cholinergic systems and cognition. *Annu.Rev.Psychol.* 48, 649-684.
- Farr,S.A., Uezu,K., Creonte,T.A., Flood,J.F. y Morley,J.E. (2000). Modulation of memory processing in the cingulate cortex of mice. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 65, 363-368.
- Farr,S.A., Flood,J.F. y Morley,J.E. (2000). The effect of cholinergic, GABAergic, serotonergic, and glutamatergic receptor modulation on posttrial memory processing in the hippocampus. *Neurobiol Learn Mem* 73, 150-167.
- Filliat,P., Pernot-Marino,I., Baubichon,D. y Lallement,G. (1998). Behavioral effects of NBQX, a competitive antagonist of the AMPA receptors 2. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 59, 1087-1092.
- Flood,J.F. y Cherkin,A. (1986). Scopolamine effects on memory retention in mice: a model of dementia?. *Behav.Neural Biol.* 45, 169-184.
- Flynn F.G.,Benson D.F.y Ardilas A (1999). Anatomy of the insula-functional and clinical correlates. *Aphasiology* 13, 55-78.
- Flynn,D.D. y Mash,D.C. (1993). Distinct kinetic binding properties of N-[3H]-methylscopolamine afford differential labeling and localization of M1, M2, and M3 muscarinic receptor subtypes in primate brain. *Synapse* 14, 283-296.
- Fox,G.B., Kennedy,N. y Regan,C.M. (1995). Polysialylated neural cell adhesion molecule expression by neurons and astroglial processes in the rat dentate gyrus declines dramatically with increasing age. *Int.J Dev.Neurosci* 13, 663-672.
- Garcia,J., Lasiter,P.S., Bermudez-Rattoni,F. y Deems,D.A. (1985). A general theory of aversion learning. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 443, 8-21.
- Ghaem,O., Mellet,E., Crivello,F., Tzourio,N., Mazoyer,B., Berthoz,A. y Denis,M. (1997). Mental navigation along memorized routes activates the hippocampus, precuneus, and insula. *Neuroreport* 8, 739-744.
- Goldman-Rakic,P.S. (1994). Working memory dysfunction in schizophrenia. *J Neuropsychiatry Clin.Neurosci* 6, 348-357.
- Goldman,P.S., Rosvold,H.E., Vest,B. y Galkin,T.W. (1971). Analysis of the delayed-alternation deficit produced by dorsolateral prefrontal lesions in the rhesus monkey. *J Comp Physiol Psychol.* 77, 212-220.
- Gonzalez,C.L.; Miranda,M.I.; Gutierrez,H.; Ormsby,C. y Bermudez-Rattoni,F. (2000). Differential participation of the NBM in the acquisition and retrieval of conditioned taste aversion and Morris water maze. *Behav.Brain Res* 116, 89-98.
- Gutierrez,H., Gutierrez,R., Silva-Gandarias,R., Estrada,J., Miranda,M.I. y Bermudez-Rattoni,F. (1999). Differential effects of 192IgG-saporin and NMDA-induced lesions into the basal forebrain on cholinergic activity and taste aversion memory formation. *Brain Res.* 834, 136-141.
- Gutierrez,H., Hernandez-Echeagaray,E., Ramirez-Amaya,V. y Bermudez-Rattoni,F. (1999). Blockade of N-methyl-D-aspartate receptors in the insular cortex disrupts taste aversion and spatial memory formation. *Neuroscience* 89, 751-758.
- Gutierrez,H., Gutierrez,R., Ramirez-Trejo,L., Silva-Gandarias,R., Ormsby,C.E., Miranda,M.I. y Bermudez-Rattoni,F. (1999). Redundant basal forebrain modulation in taste aversion memory formation. *J Neurosci* 19, 7661-7669.

Gutierrez,R., Tellez,L.A. y Bermudez-Rattoni,F. (2003). Blockade of cortical muscarinic but not NMDA receptors prevents a novel taste from becoming familiar. *Eur.J Neurosci* 17, 1556-1562.

Hagan,J.J., Salamone,J.D., Simpson,J., Iversen,S.D. y Morris,R.G. (1988). Place navigation in rats is impaired by lesions of medial septum and diagonal band but not nucleus basalis magnocellularis. *Behav.Brain Res.* 27, 9-20..

Harris,E.W., Ganong,A.H. y Cotman,C.W. (1984). Long-term potentiation in the hippocampus involves activation of N-methyl-D-aspartate receptors. *Brain Res.* 323, 132-137.

Harris,E.W. y Cotman,C.W. (1986). Long-term potentiation of guinea pig mossy fiber responses is not blocked by N-methyl D-aspartate antagonists. *Neurosci Lett.* 70, 132-137.

Hebb D.O (1949). *The Organization of Behavior: A Neuropsychological Theory.* New York.

Introini-Collison,I.B., Dalmaz,C. y McGaugh,J.L. (1996). Amygdala beta-noradrenergic influences on memory storage involve cholinergic activation. *Neurobiol Learn Mem* 65, 57-64.

Izquierdo,I. y Medina,J.H. (1997). Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol Learn Mem* 68, 285-316.

Kaada (1951). Somato-motor autonomic and electrocorticographic responses to electrical function of rhinencephalic and other structures in primates, cat and dog. A study of from the limbic, subcallosal, orbito-insular, piriform and temporal cortex, hippocampus-fornix and amygdala. *Acta Physiological Scandinavica* 24, 1-285.

Kang,H., Sun,L.D., Atkins,C.M., Soderling,T.R., Wilson,M.A. y Tonegawa,S. (2001). An important role of neural activity-dependent CaMKIV signaling in the consolidation of long-term memory. *Cell* 106, 771-783.

Kelleher,R.J., III, Govindarajan,A., Jung,H.Y., Kang,H. y Tonegawa,S. (2004). Translational control by MAPK signaling in long-term synaptic plasticity and memory. *Cell* 116, 467-479.

Kesner,R.P., Hunt,M.E., Williams,J.M. y Long,J.M. (1996). Prefrontal cortex and working memory for spatial response, spatial location, and visual object information in the rat. *Cereb.Cortex* 6, 311-318.

Kida,S., Josselyn,S.A., de Ortiz,S.P., Kogan,J.H., Chevere,I., Masushige,S. y Silva,A.J. (2002). CREB required for the stability of new and reactivated fear memories. *Nat.Neurosci* 5, 348-355.

Kirkwood,A., Rozas,C., Kirkwood,J., Perez,F. y Bear,M.F. (1999). Modulation of long-term synaptic depression in visual cortex by acetylcholine and norepinephrine. *J Neurosci* 19, 1599-1609.

Kolb,B., Nonneman,A.J. y Singh,R.K. (1974). Double dissociation of spatial impairments and perseveration following selective prefrontal lesions in rats. *J Comp Physiol Psychol.* 87, 772-780.

Kopf,S.R., Boccia,M.M. y Baratti,C.M. (1998). AF-DX 116, a presynaptic muscarinic receptor antagonist, potentiates the effects of glucose and reverses the effects of insulin on memory. *Neurobiol Learn Mem* 70, 305-313.

Levin,E.D. y Rose,J.E. (1991). Interactive effects of D1 and D2 agonists with scopolamine on radial-arm maze performance. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 38, 243-246.

Liu,Y., Wang,Y., Sun,X. y Wang,H. (2004). Evidence that muscarinic receptors are involved in nicotine-facilitated spatial memory. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 78, 775-779.

Malin E.L. y McGaugh J.L. Basolateral amygdala lesions block the memory enhancing effect of oxotremorine infused into the rostral anterior cingulate cortex after inhibitory avoidance training. 33rd Society for neuroscience abstracts . 2003.

Mandel, R.J., Gage, F.H. y Thal, L.J. (1989). Enhanced detection of nucleus basalis magnocellularis lesion-induced spatial learning deficit in rats by modification of training regimen. *Behav. Brain Res.* 31, 221-229.

Mandel, R.J., Gage, F.H. y Thal, L.J. (1989). Spatial learning in rats: correlation with cortical choline acetyltransferase and improvement with NGF following NBM damage. *Exp. Neurol.* 104, 208-217.

Massey, P.V., Bhabra, G., Cho, K., Brown, M.W. y Bashir, Z.I. (2001). Activation of muscarinic receptors induces protein synthesis-dependent long-lasting depression in the perirhinal cortex. *Eur. J Neurosci* 14, 145-152.

Mayford, M., Bach, M.E., Huang, Y.Y., Wang, L., Hawkins, R.D. y Kandel, E.R. (1996). Control of memory formation through regulated expression of a CaMKII transgene. *Science* 274, 1678-1683.

Mayo, W., Kharouby, M., Le Moal, M. y Simon, H. (1988). Memory disturbances following ibotenic acid injections in the nucleus basalis magnocellularis of the rat. *Brain Res.* 455, 213-222.

McClelland, J.L., McNaughton, B.L. y O'Reilly, R.C. (1995). Why there are complementary learning systems in the hippocampus and neocortex: insights from the successes and failures of connectionist models of learning and memory. *Psychol. Rev.* 102, 419-457.

McGaugh, J.L. e Izquierdo, I. (2000). The contribution of pharmacology to research on the mechanisms of memory formation. *Trends Pharmacol. Sci.* 21, 208-210.

Mesulam, M.M. y Mufson, E.J. (1982). Insula of the old world monkey. I. Architectonics in the insulo-orbito-temporal component of the paralimbic brain. *J Comp Neurol.* 212, 1-22.

Mesulam, M.M., Mufson, E.J., Wainer, B.H. y Levey, A.I. (1983). Central cholinergic pathways in the rat: an overview based on an alternative nomenclature (Ch1-Ch6). *Neuroscience* 10, 1185-1201.

Mesulam, M.M., Mufson, E.J., Levey, A.I. y Wainer, B.H. (1983). Cholinergic innervation of cortex by the basal forebrain: cytochemistry and cortical connections of the septal area, diagonal band nuclei, nucleus basalis (substantia innominata), and hypothalamus in the rhesus monkey. *J Comp Neurol.* 214, 170-197.

Milner, B., Squire, L.R. y Kandel, E.R. (1998). Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron* 20, 445-468.

Miranda, M.I., Ramirez-Lugo, L. y Bermudez-Rattoni, F. (2000). Cortical cholinergic activity is related to the novelty of the stimulus. *Brain Res.* 882, 230-235.

Mishkin, M. y Manning, F.J. (1978). Non-spatial memory after selective prefrontal lesions in monkeys. *Brain Res.* 143, 313-323.

Mishkin, M. (1982). A memory system in the monkey. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* 298, 83-95.

Morris, R.G., Anderson, E., Lynch, G.S. y Baudry, M. (1986). Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* 319, 774-776.

Morris, R.G., Halliwell, R.F. y Bowery, N. (1989). Synaptic plasticity and learning. II: Do different kinds of plasticity underlie different kinds of learning? *Neuropsychologia* 27, 41-59.

Morris,R.G. (1989). Synaptic plasticity and learning: selective impairment of learning rats and blockade of long-term potentiation in vivo by the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist AP5. *J Neurosci* 9, 3040-3057..

Morris,R.G. (2001). Episodic-like memory in animals: psychological criteria, neural mechanisms and the value of episodic-like tasks to investigate animal models of neurodegenerative disease. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* 356, 1453-1465.

Moser,M.B., Trommald,M. y 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 U.S.A* 91, 12673-12675.

Mundy,W.R., Barone,S. y Tilson,H.A. (1990). Neurotoxic lesions of the nucleus basalis induced by colchicine: effects on spatial navigation in the water maze. *Brain Res.* 512, 221-228.

Nadel,L. y Moscovitch,M. (1997). Memory consolidation, retrograde amnesia and the hippocampal complex. *Curr.Opin.Neurobiol* 7, 217-227.

Nader,K., Schafe,G.E. y LeDoux,J.E. (2000). The labile nature of consolidation theory. *Nat.Rev.Neurosci* 1, 216-219.

Nader,K. (2003). Memory traces unbound. *Trends Neurosci* 26, 65-72.

Nakazawa,K., McHugh,T.J., Wilson,M.A. y Tonegawa,S. (2004). NMDA receptors, place cells and hippocampal spatial memory. *Nat.Rev.Neurosci* 5, 361-372.

Naor,C. y Dudai,Y. (1996). Transient impairment of cholinergic function in the rat insular cortex disrupts the encoding of taste in conditioned taste aversion. *Behav.Brain Res.* 79, 61-67.

Nerad,L., Ramirez-Amaya,V., Ormsby,C.E. y Bermudez-Rattoni,F. (1996). Differential effects of anterior and posterior insular cortex lesions on the acquisition of conditioned taste aversion and spatial learning. *Neurobiol Learn Mem* 66, 44-50.

Nowak,L., Bregestovski,P., Ascher,P., Herbet,A. y Prochiantz,A. (1984). Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* 307, 462-465.

O'Connell,A.W., Fox,G.B., Barry,T., Murphy,K.J., Fichera,G., Foley,A.G., Kelly,J. y Regan,C.M. (1997). Spatial learning activates neural cell adhesion molecule polysialylation in a corticohippocampal pathway within the medial temporal lobe. *J Neurochem.* 68, 2538-2546.

O'Keefe,J. y Dostrovsky,J. (1971). The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res.* 34, 171-175.

O'Keefe,J. y Speakman,A. (1987). Single unit activity in the rat hippocampus during a spatial memory task. *Exp.Brain Res.* 68, 1-27.

O'Keefe J.y Nadel L. (1978). *The Hippocampus as a Cognitive Map.* (Oxford).

Ohno,M., Shibata,S., Yamamoto,T. y Watanabe,S. (1993). Working memory deficits following muscarinic blockade combined with depletion of brain somatostatin in rats. *Brain Res.* 610, 348-353.

Olton,D.S., Markowska,A.L., Pang,K., Golski,S., Voytko,M.L. y Gorman,L.K. (1992). Comparative cognition and assessment of cognitive processes in animals. *Behav.Pharmacol.* 3, 307-318.

- Packard,M.G. y Teather,L.A. (1997). Posttraining estradiol injections enhance memory in ovariectomized rats: cholinergic blockade and synergism. *Neurobiol Learn Mem* 68, 172-188.
- Parada,M.A., Hernandez,L. y Degoma,E. (1992). Serotonin may play a role in the anorexia induced by amphetamine injections into the lateral hypothalamus. *Brain Res.* 577, 218-225.
- Pascoe,J.P. y Kapp,B.S. (1987). Responses of amygdaloid central nucleus neurons to stimulation of the insular cortex in awake rabbits. *Neuroscience* 21, 471-485.
- Paxinos G.y Watson C (1986). *The rat brain in stereotaxic coordinates.* (San Diego).
- Penfield,W. y Milner,B. (1958). Memory deficit produced by bilateral lesions in the hippocampal zone. *AMA.Arch.Neurol.Psychiatry* 79, 475-497.
- Petrides,M., Alivisatos,B., Evans,A.C. y Meyer,E. (1993). Dissociation of human mid-dorsolateral from posterior dorsolateral frontal cortex in memory processing. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 90 , 873-877.
- Piggott,M., Owens,J., O'Brien,J., Paling,S., Wyper,D., Fenwick,J., Johnson,M., Perry,R. y Perry,E. (2002). Comparative distribution of binding of the muscarinic receptor ligands pirenzepine, AF-DX 384, (R,R)-I-QNB and (R,S)-I-QNB to human brain. *J Chem.Neuroanat.* 24, 211-223.
- Piggott,M., Owens,J., O'Brien,J., Paling,S., Wyper,D., Fenwick,J., Johnson,M., Perry,R. y Perry,E. (2002). Comparative distribution of binding of the muscarinic receptor ligands pirenzepine, AF-DX 384, (R,R)-I-QNB and (R,S)-I-QNB to human brain. *J Chem.Neuroanat.* 24, 211-223.
- Porter,A.C., Bymaster,F.P., DeLapp,N.W., Yamada,M., Wess,J., Hamilton,S.E., Nathanson,N.M. y Felder,C.C. (2002). M1 muscarinic receptor signaling in mouse hippocampus and cortex. *Brain Res.* 944, 82-89.
- Pouzet,B., Zhang,W.N., Feldon,J. y Rawlins,J.N. (2002). Hippocampal lesioned rats are able to learn a spatial position using non-spatial strategies. *Behav.Brain Res.* 133, 279-291.
- Power,A.E., Roozendaal,B. y McGaugh,J.L. (2000). Glucocorticoid enhancement of memory consolidation in the rat is blocked by muscarinic receptor antagonism in the basolateral amygdala. *Eur.J Neurosci* 12, 3481-3487
- Power,A.E. y McGaugh,J.L. (2002). Phthalic acid amygdalopetal lesion of the nucleus basalis magnocellularis induces reversible memory deficits in rats. *Neurobiol Learn Mem* 77, 372-388.
- Pribam K.H.,Lennox M.A.y Dunsmore R.H. (1950). Some connections of the orbitofronto-temporal, limbic and hippocampal areas of *Macaca mulatta*. *J.Neurophysiol* 13, 127-135.
- Pribam K.H. y MacLean P.D. (1953). Neuronographic análisis of medial and basal cerebral cortex. II. Monkey. *J.Neurophysiol* 16, 324-340.
- Ragozzino,M.E., Adams,S. y Kesner,R.P. (1998). Differential involvement of the dorsal anterior cingulate and prelimbic-infralimbic areas of the rodent prefrontal cortex in spatial working memory. *Behav.Neurosci* 112, 293-303.
- Ragozzino,M.E. y Kesner,R.P. (1999). The role of the agranular insular cortex in working memory for food reward value and allocentric space in rats. *Behav.Brain Res.* 98, 103-112.
- Ramirez-Amaya,V., Escobar,M.L., Chao,V. y Bermudez-Rattoni,F. (1999). Synaptogenesis of mossy fibers induced by spatial water maze overtraining. *Hippocampus* 9, 631-636.

- Ramirez-Amaya,V., Balderas,I., Sandoval,J., Escobar,M.L. y Bermudez-Rattoni,F. (2001). Spatial long-term memory is related to mossy fiber synaptogenesis. *J Neurosci* 21, 7340-7348.
- Ramirez-Lugo,L., Miranda,M.I., Escobar,M.L., Espinosa,E. y Bermudez-Rattoni,F. (2003). The role of cortical cholinergic pre- and post-synaptic receptors in taste memory formation. *Neurobiol Learn Mem* 79, 184-193.
- Riedel,G., Wetzel,W. y Reymann,K.G. (1996). Comparing the role of metabotropic glutamate receptors in long-term potentiation and in learning and memory. *Prog.Neuropsychopharmacol.Biol.Psychiatry* 20, 761-789.
- Riedel,G., Micheau,J., Lam,A.G., Roloff,E.L., Martin,S.J., Bridge,H., de Hoz,L., Poeschel,B., McCulloch,J. y Morris,R.G. (1999). Reversible neural inactivation reveals hippocampal participation in several memory processes. *Nat.Neurosci* 2, 898-905.
- Riekkinen,P., Jr., Sirvio,J. y Riekkinen,P. (1990). Similar memory impairments found in medial septal-vertical diagonal band of Broca and nucleus basalis lesioned rats: are memory defects induced by nucleus basalis lesions related to the degree of non-specific subcortical cell loss? *Behav.Brain Res.* 37, 81-88.
- Riekkinen,P., Jr., Kuitunen,J. y Riekkinen,M. (1995). Effects of scopolamine infusions into the anterior and posterior cingulate on passive avoidance and water maze navigation. *Brain Res.* 685, 46-54.
- Rosenblum,K., Dudai,Y. y Richter-Levin,G. (1996). Long-term potentiation increases tyrosine phosphorylation of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit 2B in rat dentate gyrus in vivo. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93, 10457-10460.
- Rosenblum,K., Berman,D.E., Hazvi,S. y Dudai,Y. (1996). Carbachol mimics effects of sensory input on tyrosine phosphorylation in cortex. *Neuroreport* 7, 1401-1404.
- Rosenblum,K., Berman,D.E., Hazvi,S., Lamprecht,R. y Dudai,Y. (1997). NMDA receptor and the tyrosine phosphorylation of its 2B subunit in taste learning in the rat insular cortex. *J Neurosci* 17, 5129-5135.
- Sala,M., Braida,D., Calcaterra,P., Leone,M.P., Comotti,F.A., Gianola,S. y Gori,E. (1991). Effect of centrally administered atropine and pirenzepine on radial arm maze performance in the rat. *Eur.J Pharmacol.* 194, 45-49.
- Sanchez-Santed,F., de Bruin,J.P., Heinsbroek,R.P. y Verwer,R.W. (1997). Spatial delayed alternation of rats in a T-maze: effects of neurotoxic lesions of the medial prefrontal cortex and of T-maze rotations. *Behav.Brain Res.* 84, 73-79.
- Saper,C.B. (1982). Convergence of autonomic and limbic connections in the insular cortex of the rat. *J Comp Neurol.* 210, 163-173.
- Sargolini,F., Florian,C., Oliverio,A., Mele,A. y Roulet,P. (2003). Differential involvement of NMDA and AMPA receptors within the nucleus accumbens in consolidation of information necessary for place navigation and guidance strategy of mice. *Learn Mem* 10, 285-292.
- Schacter D.L.y Tulving E (1994). What are the memory systems of 1994? In *Memory Systems*, E. T. DL.Schacter, ed. Cambridge, MA: MIT Press, pp. 1-38.
- Schafe,G.E., Nader,K., Blair,H.T. y LeDoux,J.E. (2001). Memory consolidation of Pavlovian fear conditioning: a cellular and molecular perspective. *Trends Neurosci* 24, 540-546.
- Schroeder,J.P. y Packard,M.G. (2002). Posttraining intra-basolateral amygdala scopolamine impairs food- and amphetamine-induced conditioned place preferences. *Behav.Neurosci* 116, 922-927.

Scoville,W.B. y Milner,B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurochem.* 20, 11-21.

Shapiro,M.L., Tanila,H. y Eichenbaum,H. (1997). Cues that hippocampal place cells encode: dynamic and hierarchical representation of local and distal stimuli. *Hippocampus* 7, 624-642.

Siegal, George J.; Agranoff, Bernard W.; Albers, R. Wayne; Fisher, Stephen K.; Uhler, Michael D., editors *Basic Neurochemistry, Molecular, Cellular, and Medical Aspects 6th ed.* Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins; 1999.

Song,I. y Huganir,R.L. (2002). Regulation of AMPA receptors during synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 25, 578-588.

Spencer,D.G., Jr., Horvath,E. y Traber,J. (1986). Direct autoradiographic determination of M1 and M2 muscarinic acetylcholine receptor distribution in the rat brain: relation to cholinergic nuclei and projections. *Brain Res.* 380, 59-68.

Squire,L.R. (1987). The organization and neural substrates of human memory. *Int.J Neurol.* 21-22, 218-222.

Squire,L.R., Ojemann,J.G., Miezin,F.M., Petersen,S.E., Videen,T.O. y Raichle,M.E. (1992). Activation of the hippocampus in normal humans: a functional anatomical study of memory. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89, 1837-1841.

Squire,L.R. (1992). Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychol.Rev.* 99, 195-231.

Squire,L.R., Knowlton,B. y Musen,G. (1993). The structure and organization of memory. *Annu.Rev.Psychol.* 44, 453-495.

Squire,L.R. (1993). The hippocampus and spatial memory. *Trends Neurosci* 16, 56-57.

Squire,L.R. y Alvarez,P. (1995). Retrograde amnesia and memory consolidation: a neurobiological perspective. *Curr.Opin.Neurobiol* 5, 169-177.

Squire,L.R. (1998). Memory systems. *C.R.Acad.Sci.III* 321, 153-156.

Steward,O. y Schuman,E.M. (2001). Protein synthesis at synaptic sites on dendrites. *Annu.Rev.Neurosci* 24, 299-325.

Sutherland,R.J., Kolb,B. y Whishaw,I.Q. (1982). Spatial mapping: definitive disruption by hippocampal or medial frontal cortical damage in the rat. *Neurosci Lett.* 31, 271-276.

Sutherland,R.J., Whishaw,I.Q. y Kolb,B. (1988). Contributions of cingulate cortex to two forms of spatial learning and memory. *J Neurosci* 8, 1863-1872.

Tani,Y., Saito,K., Imoto,M. y Ohno,T. (1998). Pharmacological characterization of nicotinic receptor-mediated acetylcholine release in rat brain--an in vivo microdialysis study. *Eur.J Pharmacol.* 351, 181-18.

Taubenfeld,S.M., Milekic,M.H., Monti,B. y Alberini,C.M. (2001). The consolidation of new but not reactivated memory requires hippocampal C/EBPbeta. *Nat.Neurosci* 4, 813-818.

Tulving E. (1983). *Elements of Episodic Memory.*

Wall,S.J., Yasuda,R.P., Hory,F., Flagg,S., Martin,B.M., Ginns,E.I. y Wolfe,B.B. (1991). Production of antisera selective for m1 muscarinic receptors using fusion proteins: distribution of m1 receptors in rat brain. *Mol Pharmacol.* 39, 643-649.

Watkins J.C. y Olverman H.J (1987). Agonists and antagonists for excitatory amino acid receptors. *Trends Neurosc* 10, 265-272.

Weinberger,N.M. (1998). Physiological memory in primary auditory cortex: characteristics and mechanisms. *Neurobiol Learn Mem* 70, 226-251.

Wenk,G., Hughey,D., Boundy,V., Kim,A., Walker,L. y Olton,D. (1987). Neurotransmitters and memory: role of cholinergic, serotonergic, and noradrenergic systems. *Behav.Neurosci* 101, 325-332.

Whishaw,I.Q., O'Connor,W.T. y Dunnett,S.B. (1985). Disruption of central cholinergic systems in the rat by basal forebrain lesions or atropine: effects on feeding, sensorimotor behaviour, locomotor activity and spatial navigation. *Behav.Brain Res.* 17, 103-115.

Whishaw,I.Q., Mittleman,G., Bunch,S.T. y Dunnett,S.B. (1987). Impairments in the acquisition, retention and selection of spatial navigation strategies after medial caudate-putamen lesions in rats. *Behav.Brain Res.* 24, 125-138.

Wiener,S.I., Paul,C.A. y Eichenbaum,H. (1989). Spatial and behavioral correlates of hippocampal neuronal activity. *J Neurosci* 9, 2737-2763-

Wigstrom,H., Gustafsson,B. y Huang,Y.Y. (1986). Mode of action of excitatory amino acid receptor antagonists on hippocampal long-lasting potentiation. *Neuroscience* 17, 1105-1115.

Winkler,J., Suhr,S.T., Gage,F.H., Thal,L.J. y Fisher,L.J. (1995). Essential role of neocortical acetylcholine in spatial memory. *Nature* 375, 484-487.

Wright,C.I. y Groenewegen,H.J. (1996). Patterns of overlap and segregation between insular cortical, intermediodorsal thalamic and basal amygdaloid afferents in the nucleus accumbens of the rat. *Neuroscience* 73, 359-373.

Wu,L., Wells,D., Tay,J., Mendis,D., Abbott,M.A., Barnitt,A., Quinlan,E., Heynen,A., Fallon,J.R. y Richter,J.D. (1998). CPEB-mediated cytoplasmic polyadenylation and the regulation of experience-dependent translation of alpha-CaMKII mRNA at synapses. *Neuron* 21, 1129-1139.