



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES IZTACALA**

**PARTICIPACIÓN DE RECEPTORES NICOTÍNICOS
 $\alpha 4\beta 2$ DEL HIPOCAMPO VENTRAL DE RATA EN EL
APRENDIZAJE DE EVITACIÓN**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGO**

**PRESENTA:
GERZON GARCÍA MARTÍNEZ**

**Directora de Tesis:
M. en C. MARÍA EUGENIA GARÍN AGUILAR**



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, 2010

**Tesis parcialmente financiada por el Proyecto de Investigación. 42
(2006-2007) y 78 (2008-2009) PAPCA FES-Iztacala y PAPIIT IN212906 DGAPA-
UNAM**



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.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE

Dra. Beatriz Vázquez Cruz

VOCAL

Biol. José Luís Muñoz López

SECRETARIO

M. en C. María Eugenia Garín Aguilar

SUPLENTE

Biol. María Edith López Villafranco

SUPLENTE

Dr. Gustavo Valencia del Toro

Este trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Farmacobiología (L-514) de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, bajo la dirección de la Mtra. María Eugenia Garín Aguilar y con el apoyo del Programa de Apoyo a Profesores de Carrera para la Formación de Grupos de Investigación (PAPCA 2006-2007 y 2007-2008 FES-Iztacala, UNAM) Proyecto No. 42 y 78; así como por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-DGAPA, UNAM) IN212906-3.

DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

Muchas veces mientras leía la parte de dedicatorias y agradecimientos de un libro, una tesis, de un cuento, etc., me preguntaba que pondría yo, a quién le dedicaría algo que he escrito, a quién le daría las gracias, quiénes serían tan importantes para plasmarlos ahí.

Podría hacer una larga lista de todas las personas a las que podría agradecer por el simple hecho de haber existido en mi vida y por haber ocupado un lugar en ella, a lo mejor le dedicaría unas palabras a aquellos que han estado ahí para darme una mano, un empujoncito para llevar a cabo aquello a lo que no me atrevía. Y solo espero no dejar a ninguno olvidado y si eso ocurre una disculpa de antemano.

Y quisiera comenzar por dedicarte y darte las gracias a ti, la persona más importante en este mundo, la persona más trascendental, te doy gracias de todo corazón por tu amorosa bondad y fidelidad, porque tus promesas están respaldadas por la honra de tu nombre, sin ti no estaría aquí, tú lo sabes todo de mi, sabes como es cada uno de mis pensamientos, sabes lo que voy a decir antes de que lo diga, vas delante y detrás de mi y colocas tu mano de bendición sobre mi cabeza, tú me has llevado hasta donde me encuentro actualmente y se que me llevarás a más porque tu amorosa bondad es para siempre, pues ese ha sido tu designio desde el inicio y se que así será, tu hiciste todas las delicadas partes internas de mi cuerpo y las uniste en el vientre de mi madre, gracias por haberme hecho tan admirablemente complicado, tú estabas presente cuando yo estaba siendo formado en el más completo secreto, tú me viste antes que yo naciera y fijaste cada día de mi vida antes que comenzara a respirar, cada uno de mis días fue anotado en tu libro, tu mano me guía y en ti esta mi fortaleza. Que precioso es Señor darse cuenta de que continuamente estas pensando en mí, ni siquiera

puedo contar cuantas veces al día tus pensamientos se dirigen a mí y cuando despierto en la mañana aún estas pensando en mi.

Proseguiré agradeciéndoles a mis padres Alfredo y María del Carmen García, su apoyo, sus cuidados, su interés en mi y en que siempre fuera un varón de bien, con valores y recto en todo lo que hago.

A mis hermanas Joana y Karina, a mis tíos José Luis y Silvia Navarro y no olvidar a Ian, a Leticia Martínez alias la chatis, a mi abuelita Alicia Rodríguez, a mis primos Carlos y Jared, a mi sobrino Emet por cada una de las atenciones que tuvieron conmigo, por su cariño y afecto.

A Daniel y Estela Dardano, Daniel y Marta Cipolla, Hernán y Leticia Cipolla junto con sus hijos, Enrique y Martha Barrientos, Jorge y Claudia Vargas, José Luis y Rosario Vargas junto con sus niñas por su amor y ejemplo de vida.

A mi profesora María Eugenia Garín Aguilar por su paciencia, tiempo y dedicación, por todo el apoyo que me brindó durante la realización de este proyecto, por los jalones de oreja cuando eran necesarios, muchas gracias, por la supervisión del trabajo en el laboratorio y el escrito al igual que al Dr. Gustavo Valencia por el apoyo que nos brindó en los análisis estadísticos y en la transformación de los fármacos a sales, gracias a ambos, a mi jurado la Dra. Beatriz Vázquez Cruz, al Biol. José Luis Muñoz López y a la Biol. María Edith López Villafranco por la revisión del trabajo, por el tiempo y dedicación a la corrección del mismo, que permitieron que este trabajo fuera mejor, gracias.

A mis amigos la familia Mora Alfredo, Eva, Elizabeth y Anita; a Oscar y Maricel Viñas, sin olvidar a sus pequeños Gustavito, Natalia y Leticia; a Roberto y Martha Hernández con sus dos niños Samuel y Anita; a Raúl y Elvira Alarcón, Jessica y Oscar sus hijos; a Amado y Leonor Peniche, y a sus niños Samuel, Josue y

Daniel; a Bobby y Angie Torres junto con sus tres peques Valerie, Alex y Joshua; a Marcos y Brenda Soto y sus niños David, Jared y Juanito.

A Amando y Laurita Alarcón con sus niñas Yared y Sarai; a Alex y Esperancita Guerrero con Jorge Alejandro, Karina Alejandra y Jeshua David; a Fredy y Marifer Cano junto con Mateo, Josías y Esteban; a la familia Magaña, Juan Carlos y Norma, Carla, Iliana, Benjamin y Judith; Francisco y Cecilia Hernández y a su familia Ceci su hija y Paquito, junto con Mario Flores que ya es de la familia; a Juan y Cristina Ortiz con Ramoncito.

A Pedrito y Lupita Martínez, con sus hijas Ester y Dulce, y sus nietos Isaac, Natanael y Mateo; a Humberto y Lily Gándara con Humbertito y Dévora; a Margarito y Laurita Rivera y a Abdiel; a Fredy y Elidia Jasso con Josesito y Pablito; a Maripaz Quintanar y a sus niñas; a Norma y Alicia Pineda; a Liz Díaz, Perlita García y Blanquita González; a Luigi Vargas y Javier Vázquez; a Juanjo y Gian Rico; a Ricardo Wong; a Marcos Rosas, a las niñas Huerta-Caballero, gracias a todos por su apoyo y sus palabras en esos tiempos de pruebas.

A mis compañeros (as) chivita Pacheco, a Clarita Martínez, a las niñas Edith Andrés y Laurita Martínez, a Uriel Correa, a Paco Ochoa, a Ari Granados, a Claudia Muñoz, a Romina Aguilar, a Aaron Betancourt, a Mayra Bravo, a Ruth Duran, a José Luis Figueroa, a Lidia Osnaya, a Marisol Morales, a Ligia Rivera, a Ricardo Flores, por su compañerismo y amistad.

A mis profesores: el Dr. Víctor Rivera, a Moi Chávez, al Dr. Sarma, a la profesora Idalia, al profesor Juan, los cuales fueron importantes en mi desarrollo académico.

Y por favor, si alguno se me olvidó, discúlpeme.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
ÍNDICE DE CUADROS	IX
ABREVIATURAS	X
RESUMEN	XI
INTRODUCCIÓN	1
- Aprendizaje y memoria	1
- Tipos de aprendizaje	2
- Tipos de memoria	3
- Estudio de la memoria y el concepto de consolidación	5
- Modelos en el estudio de la memoria	6
- El procedimiento de evitación inhibitoria en el estudio de la memoria y el aprendizaje	7
- Manipulaciones farmacológicas en el estudio de la memoria	9
- Hipocampo, acetilcolina y memoria	10
- Receptores colinérgicos	15
- Receptores nicotínicos en el aprendizaje y la memoria	20
JUSTIFICACIÓN	22
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
OBJETIVO GENERAL	24
OBJETIVOS PARTICULARES	24
HIPÓTESIS	24
MATERIALES Y MÉTODOS	25
- Sujetos	25
- Cirugía	25
- Manipulación	25
- Aparato y Procedimiento	25
- Fármacos y Procedimiento de Infusión	26
- Perfusión	26

- Histología	27
- Análisis estadístico	27
- Diagrama de metodología	28
RESULTADOS	29
- Histología	29
- Efecto de nicotina en la latencia de adquisición y escape con el agonista nicotina (Entrenamiento)	29
- Latencias de retención de tratamientos con el agonista nicotina (Prueba)	32
- Latencias de adquisición y escape de tratamientos con antagonistas nicotínicos (Entrenamiento)	35
- Latencias de retención de tratamientos con antagonistas nicotínicos (Prueba)	37
DISCUSIÓN	40
- Nicotina y memoria	40
- Efecto ansiolítico de nicotina	41
- Antagonistas nicotínicos DH β E y erisodina	42
CONCLUSIONES	45
PERSPECTIVAS DE LA INVESTIGACIÓN	46
REFERENCIAS	47

ÍNDICE DE IMÁGENES

FIGURAS		
1	Cámara de evitación inhibitoria	9
2	Síntesis de la acetilcolina	12
3	Vías colinérgicas en el cerebro	15
4	Representación de la estructura del receptor muscarínico	17
5	Representación de la estructura del receptor nicotínico	18
6	Diversidad de los subtipos de receptores acetilcolinérgicos	19
7	Diagrama de metodología	28
8	Localización de la punta de los inyectores	29
9	Medianas de las latencias de adquisición y escape de nicotina	31
10	Medianas del efecto de nicotina	34
11	Medianas de las latencias de adquisición y escape de los antagonistas nicotínicos	36
12	Medianas del efecto de los antagonistas nicotínicos	39

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO		
1	Medianas de las latencias de adquisición y escape de nicotina	30
2	Medianas del efecto de nicotina	32
3	Medianas de las latencias de adquisición y escape de los antagonistas nicotínicos	35
4	Medianas del efecto de los antagonistas nicotínicos	38

Abreviaturas

MCP	Memoria a corto plazo
MLP	Memoria a largo plazo
DA	Dopamina
ACh	Acetilcolina
CoA	Acetil-coenzima A
ChAT	Acetiltransferasa
AChE	Acetilcolinesterasa
R-nic	Receptores nicotínicos
SN	Sistema nervioso
AChRs	Receptores acetil-colinérgicos
nAChRs	Receptores acetil-colinérgicos neuronales
NaCl	Cloruro de sodio
DH β E	Dihidro- β -eritroidina
ip	Intra peritoneal
μ g	Microgramos
mA	Miliamperes
μ L	Microlitro
RPM	Revoluciones por minuto

RESUMEN

Evidencias experimentales señalan la participación de los receptores nicotínicos neuronales sobre la consolidación de la memoria en la prueba de evitación pasiva. Uno de los fármacos empleados para tal fin es dihidro- β -eritroidina (DH β E), que presenta afinidad tanto a receptores $\alpha 7$ como a receptores $\alpha 4\beta 2$, sin embargo, se ha encontrado otro fármaco con una afinidad siete veces mayor al subtipo de receptor nicotínico $\alpha 4\beta 2$, llamado erisodina. Con ayuda de estos fármacos, se evaluó el efecto del bloqueo de receptores $\alpha 7$ y $\alpha 4\beta 2$ del hipocampo ventral sobre el aprendizaje de evitación. Por lo que grupos independientes de ratas macho Wistar (n=10) fueron sometidos a cirugía estereotáxica implantándoles cánulas bilaterales dirigidas al hipocampo ventral (AP=5.1, ML=4.8, V=7.4). Después de ocho días de recuperación, los animales recibieron microinyecciones de nicotina (2.0, 3.0, 4.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}/\text{min}$), DH β E (2.0, 4.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}/\text{min}$), erisodina (1.0, 2.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}/\text{min}$) y el grupo control recibió 1.0 $\mu\text{L}/\text{min}$ de solución salina. Justo quince minutos después de la infusión de los fármacos los animales fueron entrenados en la caja de evitación, recibiendo un choque eléctrico de 0.75 mA. Una retención inmediata se evaluó a los 30 minutos del entrenamiento (memoria a corto plazo) y otra, 24 horas post-entrenamiento (memoria a largo plazo). Las latencias de adquisición, escape y retención fueron analizadas con la prueba de Kruskal-Wallis; en todas las comparaciones $p < 0.05$ fue considerada para indicar significancia estadística. Los resultados evidenciaron que los alcaloides DHBE y erisodina deterioraron el aprendizaje de evitación, interfiriendo con la memoria de corto plazo (retención a los 30 minutos) y la memoria de largo plazo (retención a las 24 horas). Por otro lado, una dosis de 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}/\text{min}$ del agonista colinérgico nicotina, ejerce un efecto ansiolítico, mientras que con 4.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}/\text{min}$ se evidencia no deterioro del aprendizaje. Los resultados sugieren que los receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 7$ del hipocampo ventral participan en la modulación del aprendizaje de evitación y la habilidad de erisodina para diferenciar la participación de receptores $\alpha 4\beta 2$ en la memoria de largo plazo.

INTRODUCCIÓN

El sabio no dice lo que sabe, y el necio no sabe lo que dice...

La mayoría de los individuos del reino animal cuenta con un importante avance evolutivo que les ha ayudado a adaptarse mejor a su medio: el *aprendizaje*. Los animales filogenéticamente menos desarrollados poseen un repertorio conductual limitado y responden reflejamente ante los cambios de la estimulación circundante. Aquellos que han logrado un mayor avance evolutivo cuentan, además, con respuestas instintivas más complejas que las reflejas; pero aún así, sus patrones de respuesta son restringidos y difícilmente pueden ser modificados. Los organismos cuyo sistema nervioso es más complejo, son capaces de modificar sus reacciones de un momento a otro en una situación determinada, dependiendo del resultado de sus experiencias en la misma situación o ante circunstancias similares (Prado-Alcalá, 1991).

APRENDIZAJE Y MEMORIA

De las diversas definiciones que se encuentran en la literatura sobre el **aprendizaje**, aquí se describen algunas que permiten rescatar ciertos aspectos relevantes. En 1934 Hunter, se refirió a este concepto señalando "...podemos decir que se está efectuando aprendizaje cada vez que la conducta muestra un cambio progresivo o tendencia al repetirse la misma situación estimulante y cuando el cambio no puede ser explicado en virtud de la fatiga o de cambios efectuados en el receptor y en el efector"; Wenger, Jones y Jones en 1956 se refirieron al aprendizaje como "Todo lo que es más que una modificación transitoria de la conducta y que es resultado de la experiencia pasada y no de algún cambio orgánico conocido" (citados por Hilgard y Marquis, 1975). Otra propuesta es que "...el aprendizaje es el proceso mediante el cual las experiencias modifican nuestro sistema nervioso y, por lo tanto, nuestra conducta..." (Carlson, 2004).

Con estas definiciones se logran varias cosas: a) al limitar el aprendizaje a cambios relativamente permanentes, se excluyen modificaciones de la conducta debidas a factores de motivación a la adaptación sensorial o a la fatiga; b) al señalar que la práctica, el entrenamiento o la experiencia son las condiciones esenciales del aprendizaje, se excluyen cambios de la conducta que son resultado de la maduración, la senectud, o de variables fisiológicas (Hilgard y Marquis, 1975). Finalmente, que las experiencias modifican el sistema nervioso y por lo tanto la conducta.

TIPOS DE APRENDIZAJE

El aprendizaje **asociativo** implica el establecimiento de una asociación entre un estímulo y una respuesta, o entre dos estímulos. Los principales tipos de aprendizaje asociativo son el condicionamiento clásico y el condicionamiento operante o instrumental.

Condicionamiento Clásico: esta asociación se establece entre dos estímulos (respuestas típicas).

Condicionamiento Instrumental: es la relación entre una respuesta y un estímulo concreto (conductas aprendidas).

Aprendizaje **no asociativo**, aquí se incluyen:

La **habituación**- donde la respuesta desciende a un estímulo moderado.

Sensibilización- aquí la respuesta aumenta.

La **impronta**- que permite la adquisición no espontánea de la conducta de aproximación y seguimiento ante un estímulo no concreto.

Ninguna de ellas depende de la asociación entre dos estímulos.

Aprendizaje **espacial** es la percepción de la localización espacial, es decir, nos indica en donde estamos, este tipo de aprendizaje implica aprender las relaciones existentes entre diversos estímulos, por ejemplo, la localización entre un par de objetos.

La **memoria** es la función cerebral, resultado de conexiones sinápticas entre neuronas, mediante las que el ser humano puede retener experiencias pasadas y que está relacionada con los estímulos que recibe el individuo. En otras palabras, para que un sujeto aprenda, se requiere que las experiencias del pasado se almacenen de alguna forma, de manera que cuando se encuentren otra vez los mismos estímulos, la reacción a éstos fue determinada por lo que sucedió antes, a esta capacidad de recordar se le ha llamado memoria.

TIPOS DE MEMORIA

James (1980) distinguía entre memoria primaria y memoria secundaria, las cuales en 1958 Broadbent, atendiendo a su duración denominó memoria a corto plazo y memoria a largo plazo respectivamente (en Everss, 2002).

La memoria a **corto plazo** (MCP) que es consecuencia de la simple excitación de la sinapsis para reforzarla o sensibilizarla transitoriamente, es decir, es un recuerdo y/o reconocimiento inmediato de un estímulo.

La memoria a **largo plazo** (MLP) es la consecuencia de un reforzamiento permanente de la sinapsis, además depende también de la activación de ciertos genes y síntesis de proteínas correspondientes.

Existen tres **etapas** entre el paso de la memoria de corto plazo a la memoria de largo plazo que son:

La adquisición que implica procesos sinápticos temporales

La consolidación involucra cambios sinápticos desencadenados durante el aprendizaje, y estos adquieren estabilidad y permanencia.

La evocación es la recuperación de los datos de esa memoria (MLP), también llamada recuerdo, permite valorar el aprendizaje de una tarea aprendida.

Atendiendo a su contenido o tipo de información almacenada la memoria se clasifica en memoria declarativa y memoria no-declarativa (Thompson y .Kim, 1996 en Everss, 2002).

A) Memoria declarativa (explícita, intencional o relacional), éste tipo de memoria Implica la asociación de una serie de estímulos simultáneos acerca de una situación ocurrida en un tiempo y lugar determinados, su aprendizaje es rápido pero no seguro. Algunos autores subdividen la memoria declarativa en memoria episódica y memoria semántica, ambas sostenidas por estructuras diferentes:

La memoria episódica es necesaria para lo que sucede en un contexto espacio-temporal concreto y que nos permite conservar experiencias personales y hechos de nuestra vida.

La memoria semántica, hace referencia al conocimiento que se tiene del mundo y de los acontecimientos.

B) Memoria no-declarativa (implícita, procedimental o incidental), éste tipo de memoria es relativa a los procesos en los que se muestran habilidades y hábitos, así como aprendizajes del tipo perceptivos o motor, su aprendizaje es lento, pero más seguro que la memoria declarativa, así mismo, se acumula destreza y automatización a través de ensayos reiterados.

La memoria del trabajo es el sistema responsable del almacenamiento temporal, la activación y el mantenimiento de la información, esencial para un amplio rango de funciones cognitivas que incluyen la comprensión, el razonamiento y el aprendizaje. Se ha señalado a la memoria de trabajo como una especie de memoria explícita a corto plazo, mientras que para otros, es un puente hacia la memoria a largo plazo, independiente a la memoria a corto plazo (Baddeley, 1992 en Everss, 2002).

Algunos autores se refieren al aprendizaje y a la memoria como términos

indistintos, pero otros señalan la diferencia entre ambos. Los estudios sobre aprendizaje hacen énfasis en la adquisición de conocimiento y desarrollo de nuevas conductas y los de memoria subrayan el papel de la retención o recuerdo de las conductas y otros eventos; la memoria se refiere a la persistencia del aprendizaje en un estado que puede ser revelado un tiempo después (Squire, 1987). Sin embargo, es claro que para que el conocimiento se presente o se manifieste, se tiene que hacer referencia tanto a la memoria como a los mecanismos que permiten que la información se recupere; la memoria es la prueba de haber aprendido, es el conocimiento de una experiencia pasada (Sperling, 1964).

La formación de estos procesos cognitivos requiere una serie de etapas sucesivas: por un lado, recibir y codificar esa información que llega al almacén a corto plazo (adquisición), para después gradualmente poder almacenarla en la memoria a largo plazo (consolidación) y gracias a las etapas anteriores, acceder a esa información mediante el recuerdo (evocación), todas ellas relacionadas entre sí (Everss, 2002).

ESTUDIO DE LA MEMORIA Y EL CONCEPTO DE CONSOLIDACIÓN

El primer experimento científico reportado acerca de la memoria fue el que realizó Hermann Ebbinghaus, en donde abordó problemas de aprendizaje espaciado, super-aprendizaje memorístico y describió las curvas de olvido y de ahorro de la memoria en un paradigma de palabras sin sentido. Demostró que a pesar de que la memoria es meramente una variable hipotética, cuya existencia se infiere a través de la conducta, es susceptible de ser analizada experimentalmente, con todo el rigor del método científico (Prado-Alcalá *et al.*, 2006).

A finales del siglo XIX, William James planteó la existencia de dos tipos de memoria: la primaria y la secundaria, que corresponden a las que hoy en día se conocen como memorias de corto y largo plazo (Prado-Alcalá *et al.*, 2006).

A principios del siglo XX Georg Elias Müller y su alumno Alfonso Pilzecker reportaron 40 experimentos realizados entre 1892 y 1900, para identificar las leyes que gobiernan la formación y evocación de la memoria. Propusieron el concepto de consolidación de la memoria y lo introdujeron a la literatura científica. Entre las conclusiones más importantes de su trabajo, estudios anteriores concluyeron que la fijación de la memoria requiere de tiempo (consolidación) y que la memoria es vulnerable durante el periodo de consolidación (Müller y Pilzecker, 1900).

Años más tarde, Hebb propuso una hipótesis acerca de cómo se fortalecen conexiones neuronales en el cerebro de los mamíferos. La idea es que si una neurona estimula a otra neurona, y si la neurona estimulada también está activa, se producen potenciales de acción, entonces la fuerza de la conexión entre las dos neuronas se incrementará, y viceversa, si una está enviando y la otra no lo está haciendo, entonces la fuerza de la conectividad se disminuye. Este mecanismo sería la base para la formación de nuevas conexiones entre neuronas que se activan como consecuencia de una experiencia de aprendizaje, que subsecuentemente daría lugar a la memoria. Las ideas, hipótesis y resultados experimentales de Ebbinghaus, James, Müller y Pilzecker, y Hebb fueron un eficaz fertilizante para el campo de estudio de la memoria (Prado-Alcalá *et al.*, 2006).

MODELOS EN EL ESTUDIO DE LA MEMORIA

En los trabajos dedicados al estudio del aprendizaje y la memoria se han empleado diferentes procedimientos entre los que se encuentran el laberinto radial, laberinto acuático de Morris, la demora en la elección de objetos diferentes a la muestra y el de evitación pasiva también llamada de evitación inhibitoria.

EL PROCEDIMIENTO DE EVITACIÓN INHIBITORIA EN EL ESTUDIO DE LA MEMORIA Y EL APRENDIZAJE

En la evitación inhibitoria se condiciona al animal para que aprenda a evitar un estímulo aversivo suprimiendo o inhibiendo una conducta particular (inhibir una actividad innata a su especie o un hábito adquirido). Durante el entrenamiento se condiciona al animal para que en la prueba permanezca inmóvil ante el estímulo condicionado (luz y estímulos ambientales) consiguiendo así que el estímulo incondicional (choque eléctrico) no se presente.

La evitación inhibitoria se emplea como modelo de memoria por diversos motivos (Bures et al., 1983 en Everss, 2002):

- Su fácil adquisición ya que se requiere de un único ensayo, lo cual permite el estudio de la memoria de trabajo (a los tres segundos), la memoria a corto plazo (los eventos inmediatos al entrenamiento) y la memoria a largo plazo.
- Permite precisar el momento de administración en el que se podría influir en la adquisición de la experiencia, en la consolidación, en la evocación, así como el control exacto de presentación del estímulo o el intervalo entrenamiento-prueba.
- La conducta que se le pide al animal está dentro de las pautas de conducta propias de la especie.
- La evitación inhibitoria es sensible a los deterioros derivados de la inactivación de determinadas áreas o a la administración de diversas sustancias y a los provocados por otro tipo de daño cognitivo, por ejemplo, la edad.

El procedimiento de evitación inhibitoria se realiza en una cámara de acrílico transparente dividido en dos compartimientos (Figura 1), uno con un piso que consta de barras paralelas de acero inoxidable con 1.0 centímetro de separación y otro con una plataforma de acero inoxidable conectado a un estimulador de

corriente, ambos separados por una puerta deslizable. La evaluación se realiza en dos etapas, la sesión de entrenamiento y la sesión de prueba.

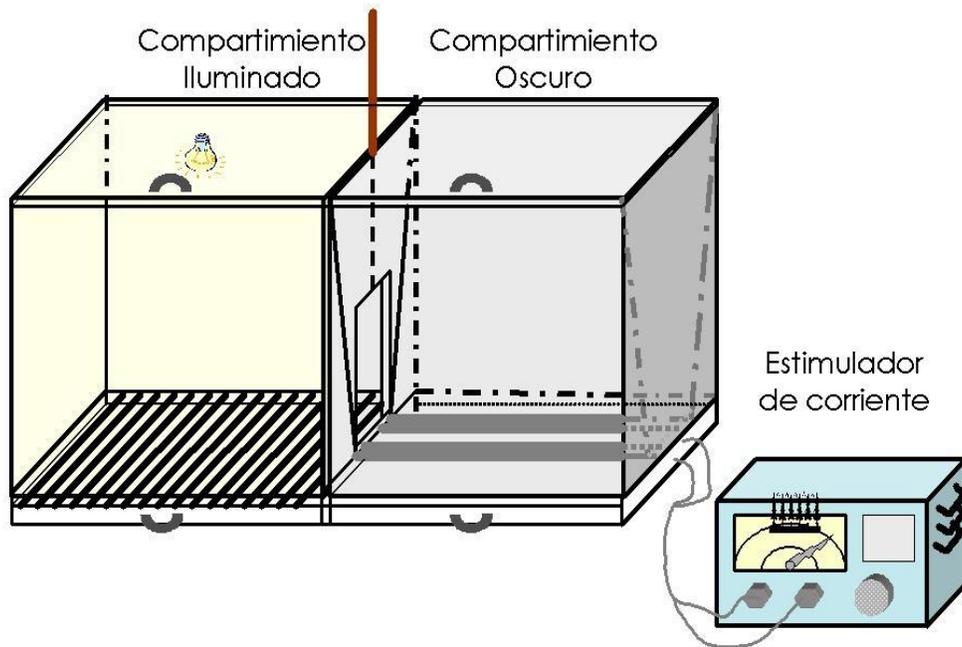


Figura 1. Cámara de evitación inhibitoria (Esquema tomado de Martínez et al., 2002).

En la sesión de entrenamiento se coloca al animal en un compartimiento bien iluminado, poco tiempo después se abre una compuerta y se permite al animal la entrada al compartimiento oscuro (de castigo) de la cámara donde se suministra un choque eléctrico. El tiempo que el animal tarda para cruzar del compartimiento seguro al de castigo durante esta sesión se denomina latencia de adquisición.

En la otra sesión llamada de prueba, que generalmente se realiza a las veinticuatro horas, se procede de manera semejante que en la sesión de entrenamiento, excepto que aquí se omite la presentación del choque eléctrico; durante esta sesión se registra el tiempo que tarda el animal para cruzar del compartimiento seguro al de castigo, y a este tiempo se le denomina latencia de

retención (Gold, 1986). Se esperaría que durante la sesión de entrenamiento el animal asocie el compartimiento oscuro con el choque de tal manera que colocándolo nuevamente en el compartimiento seguro de la cámara, durante la sesión de prueba, este evite recibir el choque, inhibiendo la respuesta de entrada al compartimiento de castigo. Las latencias cortas son consideradas como evidencia de amnesia, y las latencias largas como evidencia de retención y aprendizaje (McGaugh, 1973).

Entre las ventajas que presenta el entrenamiento de evitación inhibitoria se encuentran los siguientes: la respuesta es rápidamente aprendida, la memoria es estable por un tiempo considerable después de entrenar a los sujetos, y los resultados obtenidos son comparables a aquellos obtenidos usando otras tareas como discriminación visual, apetitivas, y de aversión al sabor entre otras. Puesto que en los estudios encaminados a examinar los efectos de diversos tratamientos sobre memoria, generalmente los animales –tanto experimentales como control reciben el tratamiento poco después del entrenamiento, los efectos observados en la sesión de prueba no pueden ser atribuidos a acciones del tratamiento sobre la ejecución sensorial o motora las cuales pueden influenciar el aprendizaje (Gold, 1986).

MANIPULACIONES FARMÁCOLOGICAS EN EL ESTUDIO DE LA MEMORIA

Diversos enfoques y metodologías han sido empleados en la investigación del aprendizaje y la memoria, entre ellos se encuentran las manipulaciones farmacológicas que facilitan o deterioran estos procesos y pueden dirigirse de la manera siguiente:

a) Cuando los estudios están orientados a observar la adquisición o el aprendizaje, los tratamientos se administran antes del entrenamiento (pre-entrenamiento), lo que altera el registro de la información permitiendo estudiar la adquisición y los procesos motores, motivacionales y preceptuales entre otros.

b) Cuando el punto de interés es la memoria o el mantenimiento de la respuesta, los tratamientos se administran después del entrenamiento (post-entrenamiento), entonces se puede estudiar la consolidación del aprendizaje.

c) Si la droga se administra antes de la prueba, entonces se estará evaluando el proceso de recuperación de la información (Kovács y De Wied, 1994; McGaugh, 1966; 1989).

HIPOCAMPO, ACETILCOLINA Y MEMORIA

La base neuronal de la memoria involucra la interacción de diferentes áreas del **cerebro**, así como un variado número de sistemas de **neurotransmisores**, diversas investigaciones han indicado esta variabilidad entre las áreas del cerebro y los neurotransmisores para la formación de la memoria.

HIPOCAMPO

Con base en estudios de lesión, estimulación y registro electrofisiológico se ha propuesto que el HC está implicado en la adquisición y consolidación de una representación del medioambiente con base en estímulos espaciales, sensoriales, configuracionales y temporales (O'Keefe y Nadel, 1978; Sutherland y Rudy, 1989; Anagnostaras, Gale y Fanselow, 2001). En roedores, es una estructura clave para la consolidación de la memoria en tareas espaciales (Jarrard, 1993; Morris *et al.*, 1982) y de la conducta de rastreo olfatorio (Swason, 1983). También ha sido asociado con tareas motivadas aversivamente, observándose que su lesión produce un deterioro significativo en la retención del aprendizaje de evitación inhibitoria (Bailey, Overstreet y Crocker, 1986; Black, Nadel y O'Keefe, 1977; Thompson, 1978; Walsh *et al.*, 1984).

Aún cuando existen reportes indicando que tanto el hipocampo ventral (HV) como el hipocampo dorsal (HD) están implicados, aunque con diferencias, en la adquisición, consolidación y recuperación de la memoria de la respuesta de evitación pasiva, Moser y Moser (1998) revisaron la evidencia anatómica y conductual que indicaba que había una diferenciación funcional entre las porciones dorsal (HD) y ventral (HV) del hipocampo de rata. Se ha propuesto que el HV juega un papel más relevante en conductas motivadas aversivamente (e.g., evitación, condicionamiento de conducta de congelamiento, y ansiedad) debido a sus densas conexiones anatómicas con estructuras subcorticales (hipotálamo, amígdala y núcleo accumbens) implicadas en la defensa y emoción (Ambrogio *et al.*, 1997; Bast, Zhang y Feldon, 2001; Moser y Moser, 1998; Petrovich *et al.*, 2001); mientras que al HD se le atribuye un papel principal en el procesamiento de memoria espacial (Eichenbaum, 1996; Moser y Moser, 1993; Lorenzini *et al.*, 1996). Otro estudio reciente ha destacado la participación de los receptores nicotínicos del hipocampo dorsal en la adquisición, consolidación y recuperación de la memoria de la tarea de evitación inhibitoria (Barros *et al.*, 2004).

ACETILCOLINA

Se reconoce que en el sistema nervioso central los neurotransmisores principales son la acetilcolina (ACh), las monoaminas noradrenalina (NA), dopamina (DA) y serotonina (5-HT). Sin embargo, pueden tener función de transmisor otras sustancias como la histamina, algunos aminoácidos dicarboxílicos como L-glutámico (Glu) y L-aspártico (Asp) y los aminoácidos monocarboxílicos ácido γ -aminobutírico (GABA) y la glicina (Gli).

La acetilcolina (ACh) es el principal neurotransmisor secretado por los axones eferentes del sistema nervioso central. Todos los movimientos musculares se logran por la liberación de acetilcolina. La ACh está constituida por dos componentes: la colina, sustancia derivada de los lípidos y el acetato. El acetato no puede ligarse directamente a la colina; en lugar de ello, es transferido desde

una molécula de acetil-coenzima A (CoA). La CoA es producida por las mitocondrias, y participa en muchas reacciones del organismo. La ACh es producida en presencia de la enzima colina acetiltransferasa (ChAT) y el ión acetato es transferido de la molécula acetil-CoA a la molécula de colina, como se muestra en la Figura 2, produciéndose una molécula de ACh y una de coenzima A (Fox, 2003).

La ACh es degradada por la enzima acetilcolinesterasa (AChE), que está presente en la membrana postsináptica. La degradación produce colina y acetato. Después de que la ACh es degradada por la AChE en la membrana postsináptica, la colina retorna a los botones terminales por recaptación, es decir es reciclada, donde de nuevo se forma la ACh (Carlson, 2004).

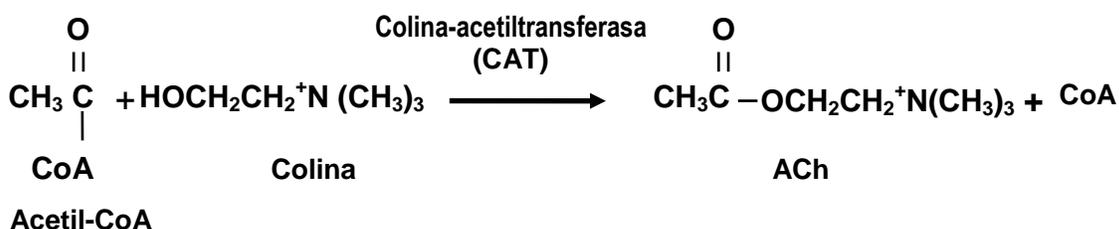


Figura 2. Síntesis de la acetilcolina (López, 2007).

Cuando la acetilcolina se une a su receptor hace que, directa o indirectamente, se abran las puertas reguladas químicamente, lo cual produce distintas respuestas de las células postsinápticas a la misma sustancia química y esto puede explicarse, en parte, por el hecho de que estas distintas células tienen dos tipos diferentes de receptores para la ACh los cuales se clasifican en función de su especificidad hacia otras sustancias químicas (Fox, 2003).

Distribución de ACh en el SNC.- Neuronas que liberan este neurotransmisor se elevan desde el cerebro anterior basal para inervar la corteza cerebral y el hipocampo (Johnston, Mckinney y Coyle 1981; Lewis, Shute y Silver, 1967). Además una proyección colinérgica reticular asciende desde el tallo cerebral para

inervar varias estructuras del cerebro anterior incluyendo la corteza cerebral (Hallanger y Wainer, 1988; Hoover y Jacobowitz, 1979). El núcleo caudado es rico en acetilcolina y es el que posee la actividad de la colina-acetiltransferasa más elevada de todas las regiones cerebrales. La acetilcolina es liberada espontáneamente desde la superficie del núcleo caudado, y dicha liberación aumenta por estimulación eléctrica de baja frecuencia a nivel del núcleo central anterior del tálamo. El núcleo caudado forma parte del sistema extrapiramidal, al cual corresponde el control fino de la actividad muscular esquelética. Los mecanismos colinérgicos del núcleo caudado guardan relación con la enfermedad de Parkinson. Algunas células talamocorticales son colinoceptivas, es decir, extremadamente sensibles a la acetilcolina. Aproximadamente el 30% de las neuronas estudiadas en el hipotálamo responden a la acetilcolina, con una proporción aproximadamente igual de efectos excitadores y efectos inhibidores. Las neuronas que tienen sus cuerpos celulares en los núcleos supraópticos y paraventricular del hipotálamo, y que acaban en la neurohipófisis son estimuladas por la acetilcolina y por anticolinesterasa.

Vías colinérgicas

Se ha propuesto que la mayoría de las vías colinérgicas podrían estar conectadas mediante una red ascendente tegmental-mesencefálico-cortical (Bueno, Sabanes, Salvador y Gascón, 1985). Específicamente, las vías colinérgicas en el SNC que se encuentran fundamentadas son las siguientes: vía dorso-tegmental, vía ventro-tegmental, vía septo-hipocampal y corteza.

Vía dorso tegmental.- Esta vía se origina en el núcleo cuneatus de la médula y proyecta a los colículos de la región pretectal y a algunos núcleos talámicos incluyendo los cuerpos geniculados.

Vía ventro tegmental.- Se origina en el tegmento ventral y sustancia nigra y envía proyecciones al subtálamo, hipotálamo y áreas basales del cerebro anterior.

Vía septo-hipocampal.- Esta es una vía bastante bien definida que también ha sido denominada sistema colinérgico basal del cerebro anterior, y se origina en los cuerpos celulares del septum medial y en los núcleos basales magnocelulares que proyectan al hipocampo, corteza cerebral y mesencéfalo (Seiden y Dycstra, 1979). Los núcleos magnocelulares corresponden al núcleo basal de Meynert en primates y al globo pálido ventral y sustancia innominada en ratas (Beart, 1984). Extensa información indica que en el hipocampo los receptores son de tipo muscarínico.

Corteza.- Se ha sugerido que la corteza cerebral de los mamíferos se encuentra inervada por fibras nerviosas colinérgicas que sugieren diferencias en la topografía subcortical de las células colinérgicas. Se ha descrito que la corteza frontal recibe aferencias colinérgicas del séptum ventro-medial; la corteza parietal recibe aferencias de la sustancia innominada, del globo pálido ventral y del cíngulo; y la corteza occipital de neuronas de los núcleos de la banda diagonal de Broca (brazo horizontal). Las vías colinérgicas se describen en la Figura 3.

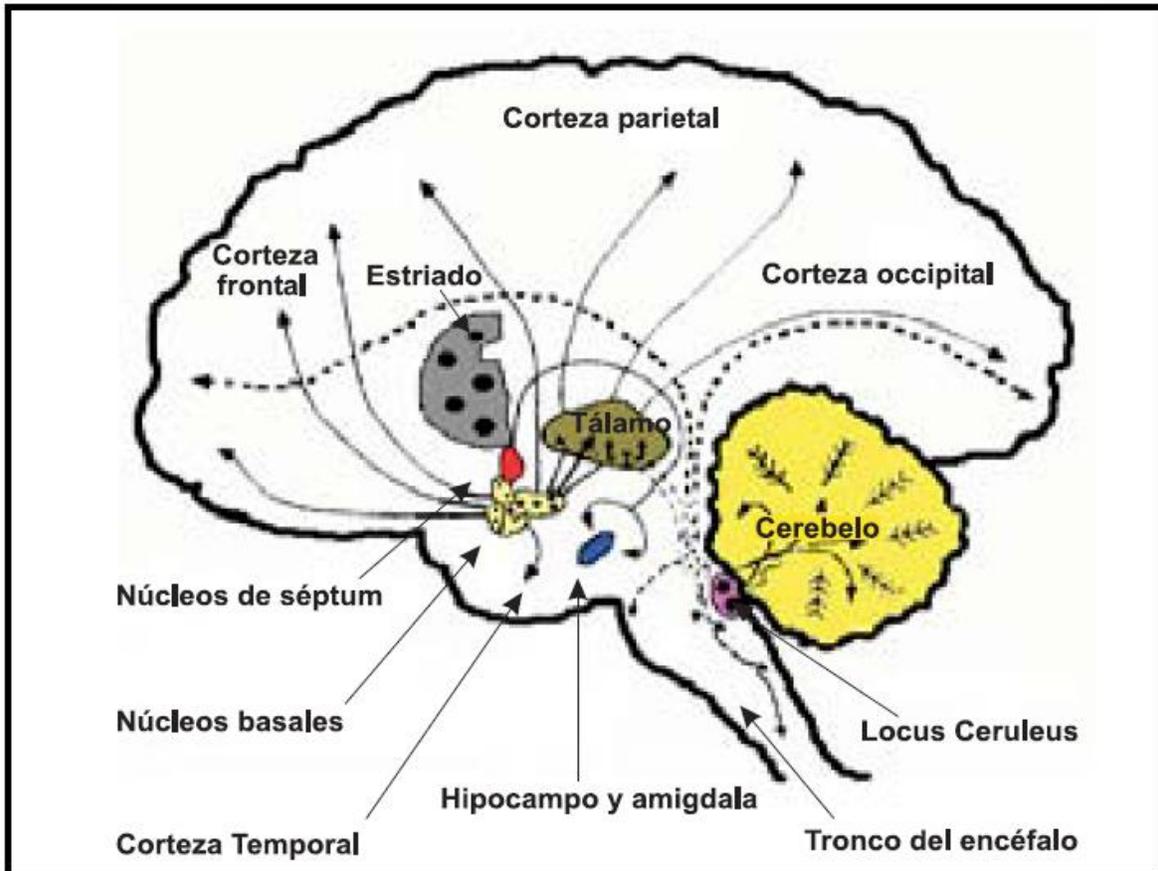


Figura 3. Vías colinérgicas en el cerebro (tomado de: Flores y Segura, 2005).

RECEPTORES COLINÉRGICOS

Existen dos tipos distintos de receptores de ACh, uno metabotrópico, es decir, que éste receptor está asociado a proteínas G; y otro ionotrópico, que está asociado a canales iónicos. Estos receptores se identificaron cuando los investigadores descubrieron que eran activados por compuestos diferentes. El receptor metabotrópico para ACh es estimulado por la muscarina, un compuesto que se encuentra en el hongo venenoso *Amanita muscaria*. El receptor ionotrópico para ACh es estimulado por la nicotina, un compuesto que se haya en las hojas de tabaco. Consecuentemente, estos dos receptores para ACh se denominaron receptores muscarínicos y receptores nicotínicos, respectivamente (Carlson, 2004).

Receptores muscarínicos.- Están formados por una sola subunidad que puede unirse a la molécula de ACh, estos receptores no contienen canales iónicos. Los canales iónicos son proteínas distintas situadas a cierta distancia de los receptores muscarínicos. La unión de la ACh (el ligando) al receptor muscarínico hace que éste active un complejo de proteínas de la membrana celular denominado proteínas G, así llamadas porque su actividad depende de los nucleótidos de guanosina (guanidin difosfato, GDP y guanidin trifosfato, GTP) (Fox, 2003).

Existen tres subunidades de proteína G, llamadas alfa, beta y gamma. En respuesta a la unión de la ACh a su receptor, la subunidad alfa se disocia de las otras dos subunidades, que se mantienen unidas para formar el complejo beta-gamma. Dependiendo de cada caso específico, la subunidad alfa o el complejo beta-gamma difunden a través de la membrana hasta unirse a un canal iónico, haciendo que se abra. Poco tiempo después, la subunidad alfa o el complejo beta-gamma de la proteína G se separa del canal y regresa a su posición anterior (Figura 4), con lo que el canal iónico se cierra (Carlson, 2004).

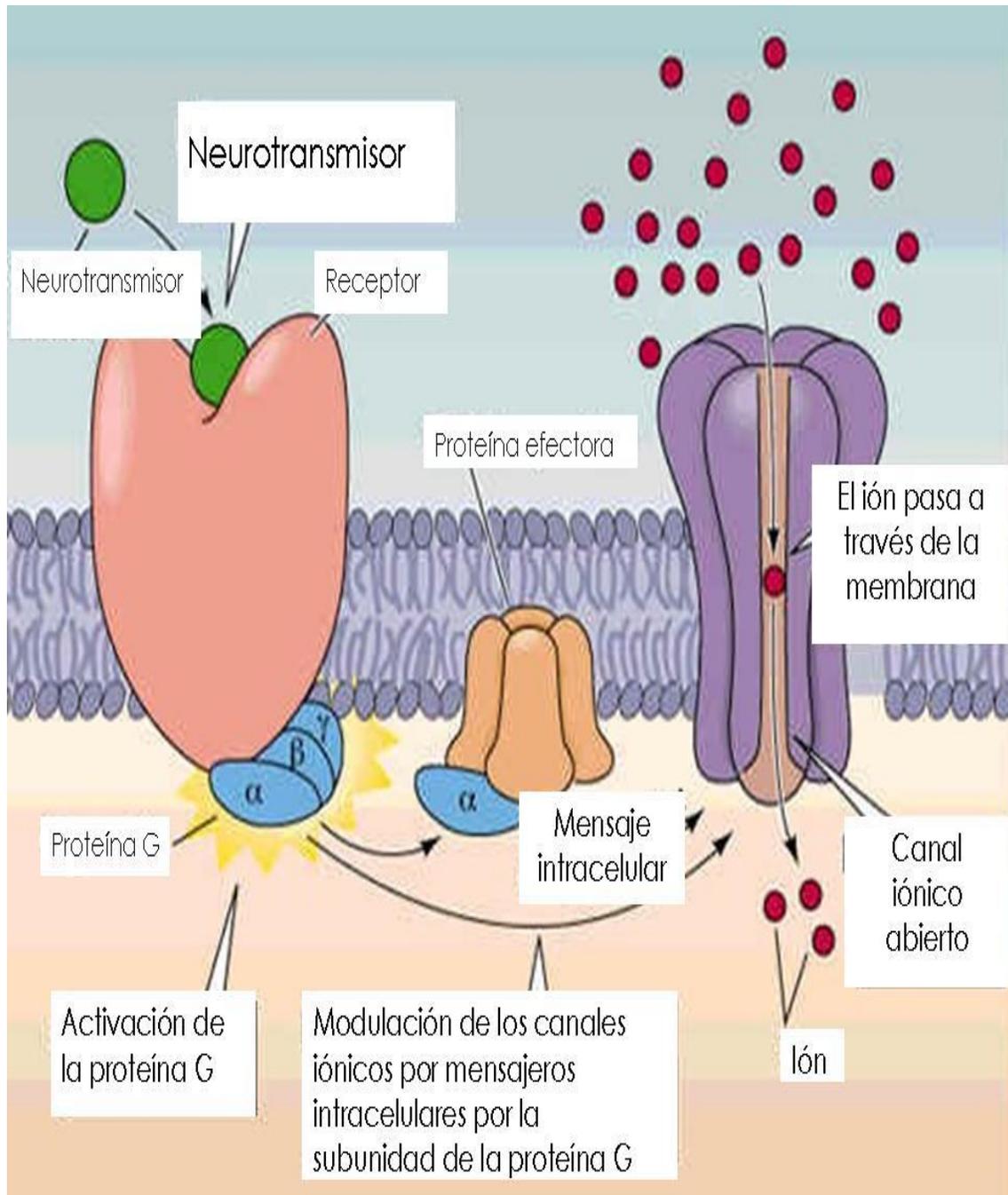


Figura 4. Representación de la estructura del receptor muscarínico, la activación de la proteína G y el flujo de iones a través del canal iónico (tomado de www.javeriana.edu.co/.../receptores.htm).

Receptores nicotínicos.- Se encuentran formados por cinco subunidades polipeptídicas que rodean al canal iónico (Figura 5 y Figura 6). Dos de estas subunidades contienen lugares para la unión de la ACh y el canal se abre cuando

ambos lugares captan ACh. La apertura del canal permite la difusión simultánea de Na^+ hacia el interior de la célula postsináptica y la salida de K^+ al exterior (Fox, 2003). Existen dos subtipos de receptores nicotínicos (R-nic), los musculares y los del sistema nervioso (SN).

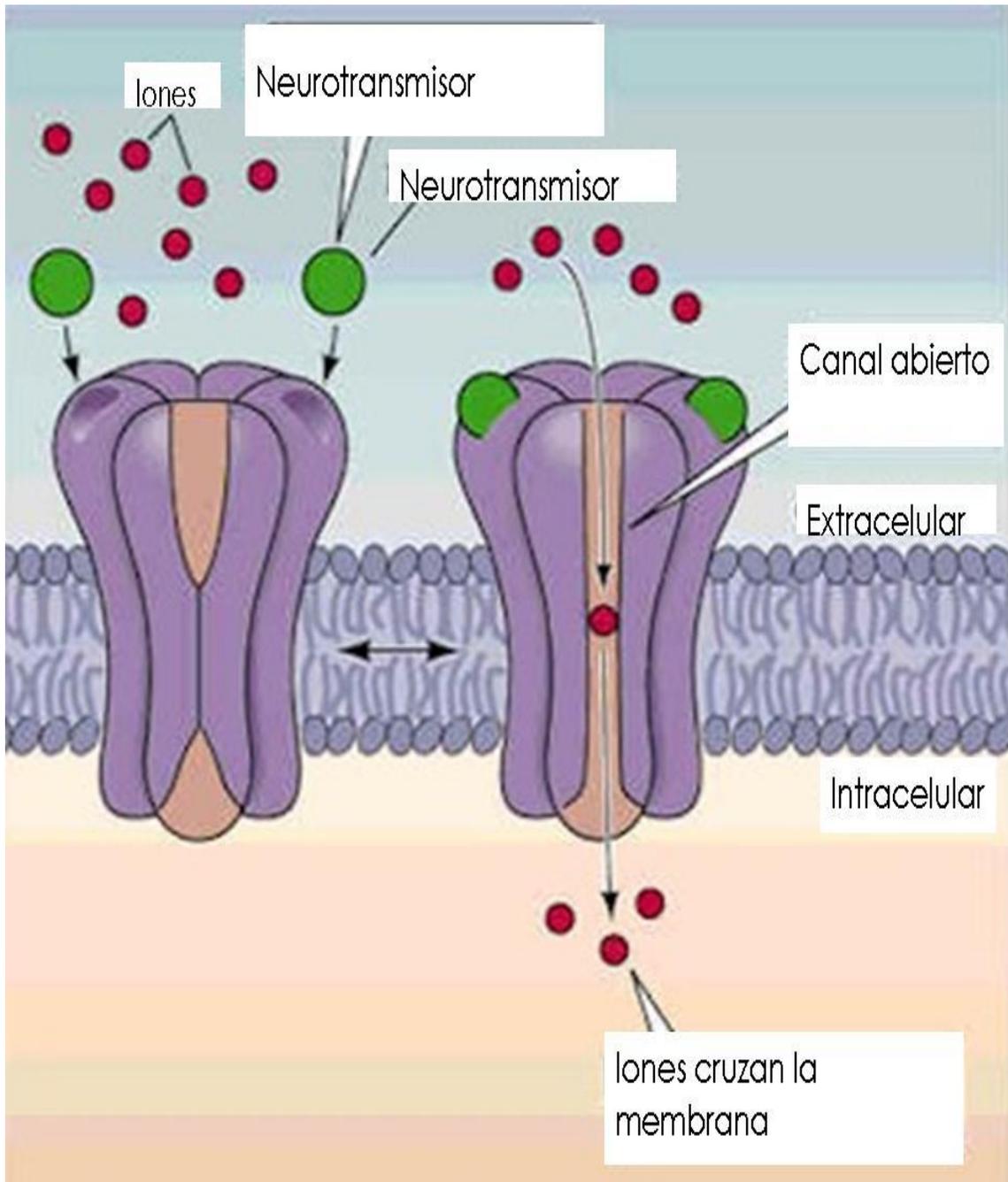


Figura 5. Representación de la estructura del receptor nicotínico y el flujo de iones a través del canal iónico (tomado de www.javeriana.edu.co/.../receptores.htm).

En el sistema nervioso central (SNC) los R-nic se localizan preferentemente en las neuronas presinápticas, donde modulan la liberación de neurotransmisores. Las subunidades neuronales de los receptores acetil-colinérgicos (AChRs) están clasificadas como α ($\alpha 2 - \alpha 10$) y β ($\beta 2 - \beta 4$), y son las $\alpha 4$ y $\beta 2$ las subunidades predominantes en el cerebro (Figura 6).

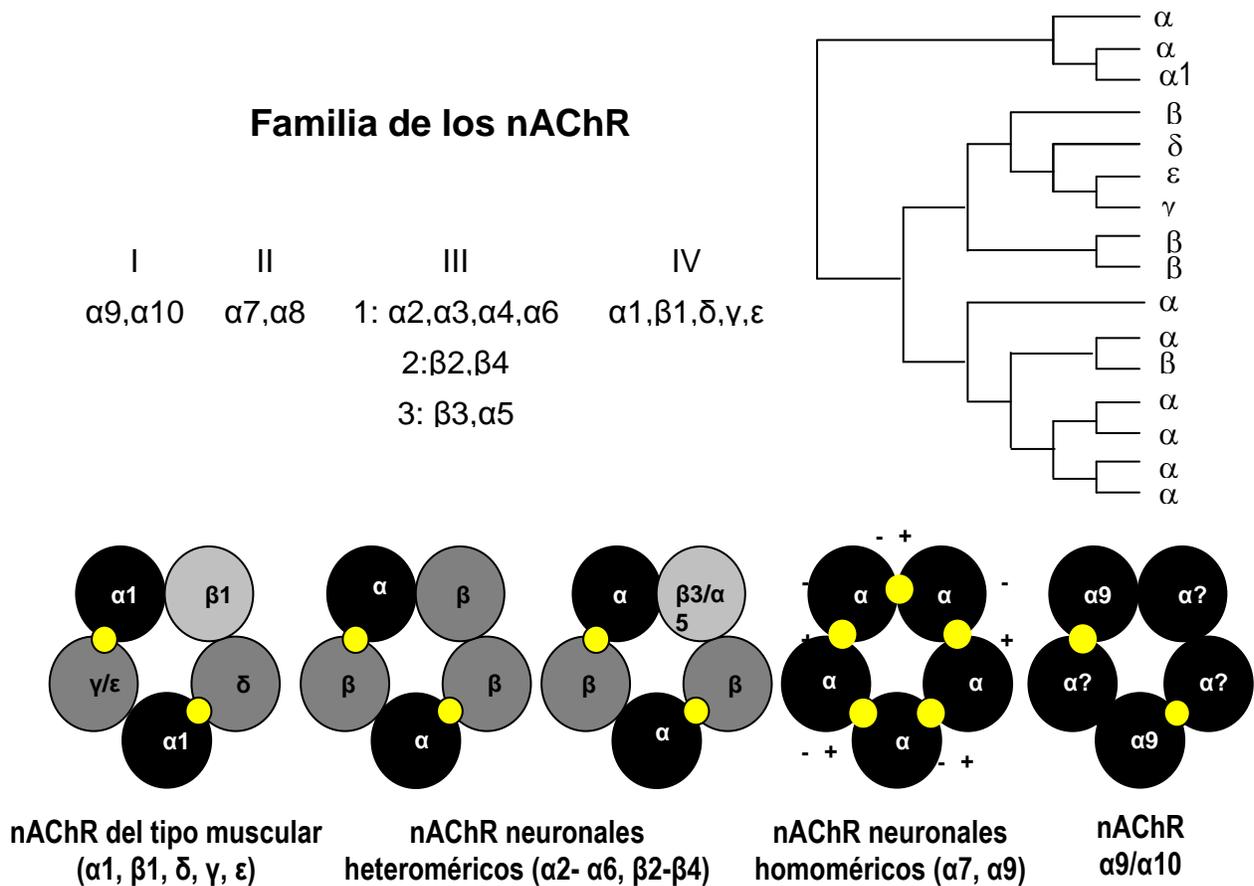


Figura 6. Diversidad de los subtipos de receptores acetilcolinérgicos (modificado de Jensen 2004).

RECEPTORES NICOTÍNICOS EN EL APRENDIZAJE Y LA MEMORIA

Los múltiples subtipos de receptores nicotínicos neuronales muestran diferentes propiedades, dependiendo de las subunidades que los forman y cada subtipo puede presentar una distribución regional distinta, lo cual puede contribuir a explicar su participación en una diversidad de procesos fisiológicos como la memoria, la atención, el aprendizaje, así como en ciertas patologías como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, esquizofrenia, ansiedad y depresión, entre otros (Gotti y Clementi, 2004; Levin *et al.*, 2006). El estudio de la participación de los receptores nicotínicos cerebrales en dichos procesos ha requerido del empleo de diferentes fármacos, agonistas o antagonistas a esos receptores.

Numerosos estudios en humanos, monos, conejos y roedores han evidenciado la participación de la ACh y de sus receptores en las funciones de memoria. Usando diferentes estrategias metodológicas se han obtenido evidencias de mejora en la memoria con la administración de nicotina o sus agonistas, mientras que un deterioro de memoria se ha hecho evidente cuando se administran antagonistas nicotínicos.

Estudios histológicos post mortem en personas que presentaron la enfermedad de Alzheimer han revelado que hay pérdida tanto de la inervación colinérgica de la corteza cerebral y el hipocampo, así como en el número de receptores nicotínicos. El receptor nicotínico que más se pierde es el $\alpha 4\beta 2$ y la subunidad $\alpha 4$ es la más afectada (Aubert *et al.*, 1992).

Con respecto a la función del agonista nicotina en los procesos de aprendizaje, en sujetos humanos fumadores y no fumadores, utilizando un diseño en doble ciego con placebo y parches de nicotina, concluyeron que esta sustancia ayuda a mejorar el rendimiento de una tarea que requiere la identificación de cadenas de tres consonantes (McClernon *et al.*, 2003).

En estudios con monos jóvenes y adultos, con la administración de nicotina, se observó una mejora en el rendimiento de la tarea de demora en la elección de la muestra. Esta tarea permite la medición de habilidades pertinentes al envejecimiento humano; una mejora se observó también cuando se repitió la prueba a las 24 horas después de la dosis de nicotina ya que durante la prueba los monos adultos no demoraron mucho con respecto a los monos jóvenes (Buccafusco y Jackson, 1991).

En experimentos con ratas se encontró que nicotina mejora el aprendizaje y la memoria de una tarea de laberinto radial, este agonista fue eficaz de atenuar los deterioros en la memoria como consecuencia de las lesiones en la vía septohipocampal o el envejecimiento (Levin, 1992).

Decker y colaboradores (1993) evaluaron los efectos de lobelina (agonista nicotínico) en la memoria de una tarea de evitación inhibitoria, donde la lobelina administrada inmediatamente después del entrenamiento mejoró la retención de la tarea evaluada 24 h después. También lobelina mejoró la ejecución de ratas con lesión septal en una tarea de discriminación espacial en el laberinto acuático cuando se administró pre-entrenamiento. Los autores concluyen que los efectos observados de la lobelina en tareas de aprendizaje y memoria pueden ser similares a los de nicotina.

Usando pruebas de condicionamiento palpebral o de parpadeo en conejos, se observó que tanto nicotina como dosis altas de GTS-21 (agonista selectivo de receptores $\alpha 7$) invirtieron el efecto de mecamilamina (antagonista nicotínico) administrada previo a la adquisición de la respuesta condicionada (Woodruff-Pak *et al.*, 2003).

Por otro lado, la administración de mecamilamina, antagonista de receptores $\alpha 3\beta 2$, permitió evaluar la participación de estos receptores en la adquisición, consolidación y evocación de una tarea de evitación pasiva, así como su efecto en

memoria de corto y largo plazo (Barros *et al.*, 2004); mientras que la administración intra-hipocampal de DH β E y metilcaconitina destacaron el papel del bloqueo de los receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 7$ respectivamente, en la formación de la memoria de trabajo, y evidenciaron que el hipocampo ventral es un sitio crítico de la intervención nicotínica para esta función (Felix y Levin, 1997).

El antagonista nicotínico DH β E permitió determinar la participación del receptor $\alpha 4\beta 2$ en la adquisición, cuando DH β E se administró 15 minutos antes del entrenamiento; en la consolidación, cuando DH β E se administró inmediatamente después del entrenamiento y la evocación de memoria de corto y largo plazo, cuando DH β E se administró 15 minutos antes de la sesión de prueba (Barros *et al.*, 2004).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Dado lo anterior, en el laboratorio nos hemos ocupado del aislamiento, purificación y caracterización de los alcaloides presentes en semillas de *Erythrina* spp. específicamente erisodina, con el fin de utilizarle como herramienta farmacológica en la caracterización de los receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 2$. Así, empleando el procedimiento de evitación inhibitoria y el laberinto T elevado, se han realizado diversos experimentos encaminados a delimitar la función de los receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 2$ del hipocampo, aplicando localmente el agonista nicotina, y antagonistas nicotínicos como DH β E y erisodina (Flores, 2004; López, 2007; Garín-Aguilar *et al.*, 2009). Inicialmente, usando el laberinto T elevado se evaluó el efecto de la administración sistémica de erisodina o nicotina sobre memoria y ansiedad. Posteriormente, dada la distribución diferencial que los receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 2$ presentan en el hipocampo, un estudio fue diseñado para evaluar el efecto del bloqueo de los receptores $\alpha 4\beta 2$ en la consolidación de la memoria, para lo cual DH β E y erisodina, se infundieron en el hipocampo dorsal del cerebro de rata justo después del entrenamiento de evitación inhibitoria. Otro estudio evaluó el efecto de estos mismos antagonistas sobre la consolidación de la memoria cuando estas sustancias se administraron en el hipocampo ventral inmediatamente después del entrenamiento. Los resultados de estos estudios indican que los receptores $\alpha 4\beta 2$ de ambas regiones del hipocampo participan en la **consolidación** de la tarea aversiva. Sin embargo, es necesario realizar investigaciones encaminadas a determinar la participación de estos receptores en otras **etapas de la formación de la memoria** tales como la **evocación** y la **adquisición**. Es por ello que en el presente trabajo se planteo el siguiente objetivo.

RECEPTORES NICOTÍNICOS EN EL APRENDIZAJE Y LA MEMORIA

Los múltiples subtipos de receptores nicotínicos neuronales muestran diferentes propiedades, dependiendo de las subunidades que los forman y cada subtipo puede presentar una distribución regional distinta, lo cual puede contribuir a explicar su participación en una diversidad de procesos fisiológicos como la memoria, la atención, el aprendizaje, así como en ciertas patologías como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, esquizofrenia, ansiedad y depresión, entre otros (Gotti y Clementi, 2004; Levin *et al.*, 2006). El estudio de la participación de los receptores nicotínicos cerebrales en dichos procesos ha requerido del empleo de diferentes fármacos, agonistas o antagonistas a esos receptores.

Numerosos estudios en humanos, monos, conejos y roedores han evidenciado la participación de la ACh y de sus receptores en las funciones de memoria. Usando diferentes estrategias metodológicas se han obtenido evidencias de mejora en la memoria con la administración de nicotina o sus agonistas, mientras que un deterioro de memoria se ha hecho evidente cuando se administran antagonistas nicotínicos.

Estudios histológicos post mortem en personas que presentaron la enfermedad de Alzheimer han revelado que hay pérdida tanto de la inervación colinérgica de la corteza cerebral y el hipocampo, así como en el número de receptores nicotínicos. El receptor nicotínico que más se pierde es el $\alpha 4\beta 2$ y la subunidad $\alpha 4$ es la más afectada (Aubert *et al.*, 1992).

Con respecto a la función del agonista nicotina en los procesos de aprendizaje, en sujetos humanos fumadores y no fumadores, utilizando un diseño en doble ciego con placebo y parches de nicotina, concluyeron que esta sustancia ayuda a mejorar el rendimiento de una tarea que requiere la identificación de cadenas de tres consonantes (McClernon *et al.*, 2003).

En estudios con monos jóvenes y adultos, con la administración de nicotina, se observó una mejora en el rendimiento de la tarea de demora en la elección de la muestra. Esta tarea permite la medición de habilidades pertinentes al envejecimiento humano; una mejora se observó también cuando se repitió la prueba a las 24 horas después de la dosis de nicotina ya que durante la prueba los monos adultos no demoraron mucho con respecto a los monos jóvenes (Buccafusco y Jackson, 1991).

En experimentos con ratas se encontró que nicotina mejora el aprendizaje y la memoria de una tarea de laberinto radial, este agonista fue eficaz de atenuar los deterioros en la memoria como consecuencia de las lesiones en la vía septohipocampal o el envejecimiento (Levin, 1992).

Decker y colaboradores (1993) evaluaron los efectos de lobelina (agonista nicotínico) en la memoria de una tarea de evitación inhibitoria, donde la lobelina administrada inmediatamente después del entrenamiento mejoró la retención de la tarea evaluada 24 h después. También lobelina mejoró la ejecución de ratas con lesión septal en una tarea de discriminación espacial en el laberinto acuático cuando se administró pre-entrenamiento. Los autores concluyen que los efectos observados de la lobelina en tareas de aprendizaje y memoria pueden ser similares a los de nicotina.

Usando pruebas de condicionamiento palpebral o de parpadeo en conejos, se observó que tanto nicotina como dosis altas de GTS-21 (agonista selectivo de receptores $\alpha 7$) invirtieron el efecto de mecamilamina (antagonista nicotínico) administrada previo a la adquisición de la respuesta condicionada (Woodruff-Pak *et al.*, 2003).

Por otro lado, la administración de mecamilamina, antagonista de receptores $\alpha 3\beta 2$, permitió evaluar la participación de estos receptores en la adquisición, consolidación y evocación de una tarea de evitación pasiva, así como su efecto en

memoria de corto y largo plazo (Barros *et al.*, 2004); mientras que la administración intra-hipocampal de DH β E y metilcaconitina destacaron el papel del bloqueo de los receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 7$ respectivamente, en la formación de la memoria de trabajo, y evidenciaron que el hipocampo ventral es un sitio crítico de la intervención nicotínica para esta función (Felix y Levin, 1997).

El antagonista nicotínico DH β E permitió determinar la participación del receptor $\alpha 4\beta 2$ en la adquisición, cuando DH β E se administró 15 minutos antes del entrenamiento; en la consolidación, cuando DH β E se administró inmediatamente después del entrenamiento y la evocación de memoria de corto y largo plazo, cuando DH β E se administró 15 minutos antes de la sesión de prueba (Barros *et al.*, 2004).

JUSTIFICACIÓN

Es claro que hasta el momento, el estudio de la participación del receptor $\alpha 4\beta 2$ en los procesos de aprendizaje y memoria, se ha venido determinado utilizando el antagonista competitivo DH β E, el cual tiene el inconveniente de que también se une competitivamente a receptores $\alpha 3\beta 2$ y es 10-50 veces menos potente a $\alpha 3\beta 4$ y $\alpha 7$ (Chávez-Noriega *et al.*, 1997; Harvey *et al.*, 1996, en Sharples y Wonnacott, 2001).

Debido a que hasta el momento, no se han encontrado antagonistas más selectivos a los receptores $\alpha 4\beta 2$ no es posible descartar totalmente la participación de otros subtipos de receptores nicotínicos sobre una función específica estudiada, en nuestro caso en los procesos de memoria y aprendizaje.

En años recientes, Decker y colaboradores (1995), realizaron un estudio donde evidenciaron que erisodina, otro alcaloide aislado de plantas del género *Erythrina* presenta mayor afinidad al receptor nicotínico $\alpha 4\beta 2$, que su análogo DH β E. Estos

autores destacan la importancia de erisodina como una herramienta útil para la caracterización de este subtipo de receptor neuronal.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Dado lo anterior, en el laboratorio nos hemos ocupado del aislamiento, purificación y caracterización de los alcaloides presentes en semillas de *Erythrina* spp. específicamente erisodina, con el fin de utilizarle como herramienta farmacológica en la caracterización de los receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 2$. Así, empleando el procedimiento de evitación inhibitoria y el laberinto T elevado, se han realizado diversos experimentos encaminados a delimitar la función de los receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 2$ del hipocampo, aplicando localmente el agonista nicotina, y antagonistas nicotínicos como DH β E y erisodina (Flores, 2004; López, 2007; Garín-Aguilar *et al.*, 2009). Inicialmente, usando el laberinto T elevado se evaluó el efecto de la administración sistémica de erisodina o nicotina sobre memoria y ansiedad. Posteriormente, dada la distribución diferencial que los receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 2$ presentan en el hipocampo, un estudio fue diseñado para evaluar el efecto del bloqueo de los receptores $\alpha 4\beta 2$ en la consolidación de la memoria, para lo cual DH β E y erisodina, se infundieron en el hipocampo dorsal del cerebro de rata justo después del entrenamiento de evitación inhibitoria. Otro estudio evaluó el efecto de estos mismos antagonistas sobre la consolidación de la memoria cuando estas sustancias se administraron en el hipocampo ventral inmediatamente después del entrenamiento. Los resultados de estos estudios indican que los receptores $\alpha 4\beta 2$ de ambas regiones del hipocampo participan en la **consolidación** de la tarea aversiva. Sin embargo, es necesario realizar investigaciones encaminadas a determinar la participación de estos receptores en otras **etapas de la formación de la memoria** tales como la **evocación** y la **adquisición**. Es por ello que en el presente trabajo se planteo el siguiente objetivo.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la participación de los receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 2$ del hipocampo ventral de rata en el **aprendizaje** de una tarea de evitación inhibitoria.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar el efecto de los **antagonistas** erisodina y DH β E en la memoria de corto y largo plazo de una tarea aversiva cuando se administran antes del entrenamiento.
- Evaluar el efecto del **agonista** nicotina en la memoria de corto y largo plazo de una tarea aversiva cuando se administra antes del entrenamiento.

HIPÓTESIS

Si los receptores $\alpha 4\beta 2$ del hipocampo ventral participan de manera significativa en el aprendizaje de evitación, la administración pre-entrenamiento de erisodina, antagonista con mayor selectividad a dicho receptor, producirá mayor deterioro en la retención de la tarea, comparado con el efecto de DH β E, antagonista de menor afinidad a estos receptores.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sujetos

Se utilizaron ratas adulto macho de la especie *Rattus norvegicus* de la cepa Wistar (250-300g), los cuales fueron proporcionados por el bioterio del Instituto de Neurobiología y mantenidos en el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Los animales fueron mantenidos en cajas individuales con un periodo de luz-oscuridad de 12 horas y libre acceso a comida y agua. Todos los experimentos se llevaron a cabo entre las 11:00 y las 16:00 horas.

Cirugía

Las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico (45 mg/Kg, i.p.) y con la ayuda de un aparato estereotáxico se les colocaron un par de cánulas dirigidas al hipocampo ventral con coordenadas Bregma: AP -5.1; ML \pm 4.8; H -7.4, utilizando el atlas de Paxinos y Watson (1986). Toda la investigación se condujo observando las regulaciones establecidas en la Norma Oficial Mexicana para el uso y cuidado de animales de laboratorio, NOM-062-ZOO-1999.

Manipulación

Después de la recuperación de la cirugía, los animales fueron manipulados durante tres días consecutivos y previos a la sesión de entrenamiento. La manipulación tuvo como finalidad que el animal se habituara al manejo del experimentador, y evitar interferencias al momento de la evaluación conductual misma que ocurrió al octavo día de la cirugía.

Aparato y Procedimiento

Durante el entrenamiento los animales fueron colocados dentro del compartimiento iluminado de la cámara de evitación inhibitoria, después de diez segundos la puerta que divide los dos compartimientos se abrió y se permitió al animal el paso al compartimiento oscuro. Se registró la latencia de adquisición (tiempo en segundos que el animal tardó en pasar del compartimiento seguro al de

castigo. Inmediatamente después de que el animal cruzó y colocó sus cuatro patas sobre el piso del compartimiento no iluminado, se cerró la puerta y recibió un choque eléctrico inevitable en las patas (0.75 mA/5 segundos). Después del suministro del choque, la puerta que separa los compartimientos se reabrió y se registró la latencia de escape (tiempo en segundos que el animal tardó en regresar al compartimiento seguro de la cámara). Treinta segundos después los animales fueron retirados de la cámara y colocados en su caja y regresados al cuarto del bioterio. La memoria de corto plazo fue evaluada 30 minutos después, procediendo de manera semejante a la sesión de entrenamiento, sólo que en esta ocasión no se suministró el choque eléctrico y se registró la latencia de retención (tiempo en segundos que el animal tardó en pasar del compartimiento seguro al de choque haciendo un corte arbitrario a los 600 segundos). Para el registro de la memoria de largo plazo, todos los animales fueron sometidos a una segunda retención 24 horas después del entrenamiento.

Fármacos y Procedimiento de infusión

Quince minutos antes del entrenamiento, los fármacos se aplicaron bilateralmente usando dos jeringas Hamilton de 10 μ L acopladas a una bomba de infusión continua (WPI modelo sp200i). Las jeringas estaban unidas a través de un tubo de polietileno a inyectores construidos con aguja de acero inoxidable. En el momento de la infusión, los inyectores se introdujeron en las cánulas para administrar en el hipocampo ventral a grupos independientes de ratas (n=10) uno de los siguientes tratamientos: erisodina (aislada de semillas de *E. herbacea*) 1, 2 μ g/ μ L; DH β E (Sigma) 2, 4 μ g/ μ L; bitartrato de nicotina (Sigma) 2, 3, 4 μ g/ μ L que fueron disueltos en solución salina. Un grupo control recibió solución salina al 0.9% y en todos los casos la velocidad de infusión fue de 1 μ L/min.

Perfusión

Una vez terminada la fase conductual, todos los animales fueron sacrificados con una sobredosis de pentobarbital sódico y perfundidos intracardialmente con solución salina isotónica seguida de formaldehído al 10%, utilizando una bomba

de infusión (Modelo Manostat) con una velocidad de 48 RPM. Una vez terminada la *perfusión*, se obtuvieron los cerebros y se almacenaron en frascos viales con solución de formaldehído al 10%.

Histología

Para verificar el sitio a donde llegó la punta de los inyectores se realizó el estudio histológico. A los cerebros se les hicieron cortes coronales de 60 micras de espesor que se fijaron en portaobjetos y fueron teñidos con la técnica de Nissl. El análisis microscópico permitió descartar del análisis estadístico aquellos animales cuyas puntas de inyector no se encontraron en la estructura.

Análisis estadístico

La utilización de un corte arbitrario a los 600 segundos durante la retención, hace necesaria la utilización de estadísticos no paramétricos, por lo que las latencias de adquisición, escape y retención fueron analizados con la prueba de Kruskal-Wallis y como prueba post hoc la de U-Mann Whitney ($p < 0.05$). En los casos donde el análisis lo requirió se usó la prueba de Wilcoxon. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS versión 15.

A continuación, en la Figura 7 se muestra un diagrama de flujo de la metodología donde de manera general se muestran las etapas seguidas en la realización de este estudio.

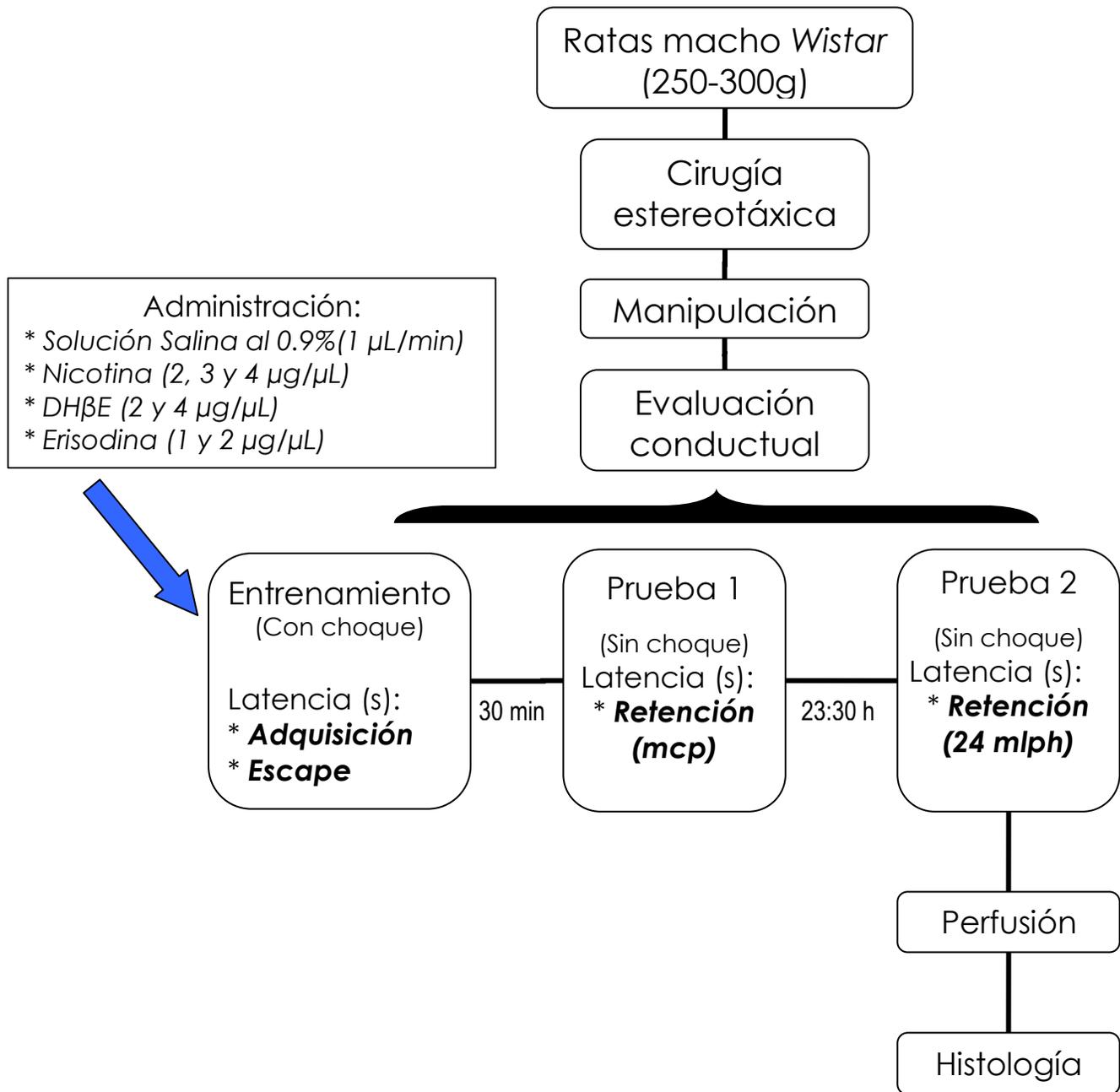


Figura 7. Diagrama de la Metodología seguida en este estudio.

RESULTADOS

Lo que reposa detrás y al frente de nosotros son pequeños detalles en comparación a lo que reposa dentro de nosotros...

Histología

La ubicación de la punta de los inyectores fue verificada histológicamente y de los 104 animales sometidos a la cirugía, se eliminaron 33 porque la punta de los inyectores no llegó a región en estudio, hipocampo ventral coordenadas a partir de Bregma: AP -5.1; ML \pm 4.8; H -7.4 (Figura 8).

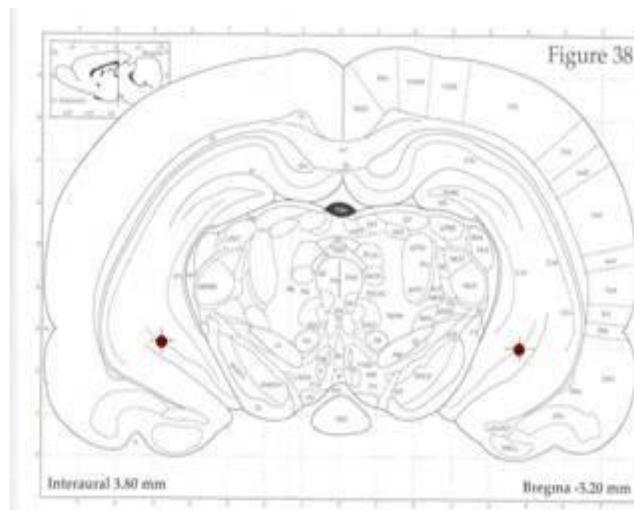


Figura 8. Lámina del Atlas de Paxinos mostrando los sitios de ubicación en el hipocampo ventral de rata a donde deben llegar las puntas de los inyectores (Bregma: AP -5.1; ML \pm 4.8; H -7.4).

Efecto de nicotina en la latencia de adquisición y escape con el agonista nicotina (Entrenamiento)

En el condicionamiento de evitación inhibitoria, al analizar las latencias de adquisición y escape obtenidas con la aplicación del agonista nicotina en sus dosis

2, 3 y 4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y salina 1 $\mu\text{L}/\text{min}$, la prueba estadística de Kruskal-Wallis, no reveló diferencias entre los distintos tratamientos durante la fase de entrenamiento: Adquisición [$H(3) = 0.84$, $p = 0.84$] y Escape $H(3) = 1.451$, $p = 0.694$ (Cuadro 1 y Figura 9). Estos resultados indican que con la administración de cualquiera de las tres dosis de nicotina (2, 3 y 4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), los animales se comportaron de forma semejante durante la primera exposición a la cámara y presentaron el mismo comportamiento ante al choque eléctrico.

Ya que la administración del agonista se llevó a cabo justo 15 minutos antes del entrenamiento, y todos los grupos no fueron diferentes del grupo de animales que recibió solución salina, es evidente que nicotina no deterioró la actividad motora de los sujetos y en consecuencia estas dosis (2, 3 y 4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) de nicotina no interfirieron con la ejecución de la tarea.

Cuadro 1. Mediana de las latencias de adquisición y escape de los tratamientos del agonista nicotina, obtenidas durante el entrenamiento de evitación inhibitoria con un choque eléctrico de 0.75 mA.

Tratamiento	<i>Medianas de la latencia</i>	
	<i>Adquisición (s)</i>	<i>Escape (s)</i>
Salina 1 $\mu\text{L}/\text{min}$	15.91	1.50
Nicotina 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	10.00	1.40
Nicotina 3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	13.67	1.90
Nicotina 4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	14.20	1.62

Nota. Los tratamientos salina (1 $\mu\text{L}/\text{min}$) y nicotina (2, 3 ó 4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) se administraron justo 15 minutos antes del entrenamiento.

Latencias de Adquisición y Escape del agonista nicotina

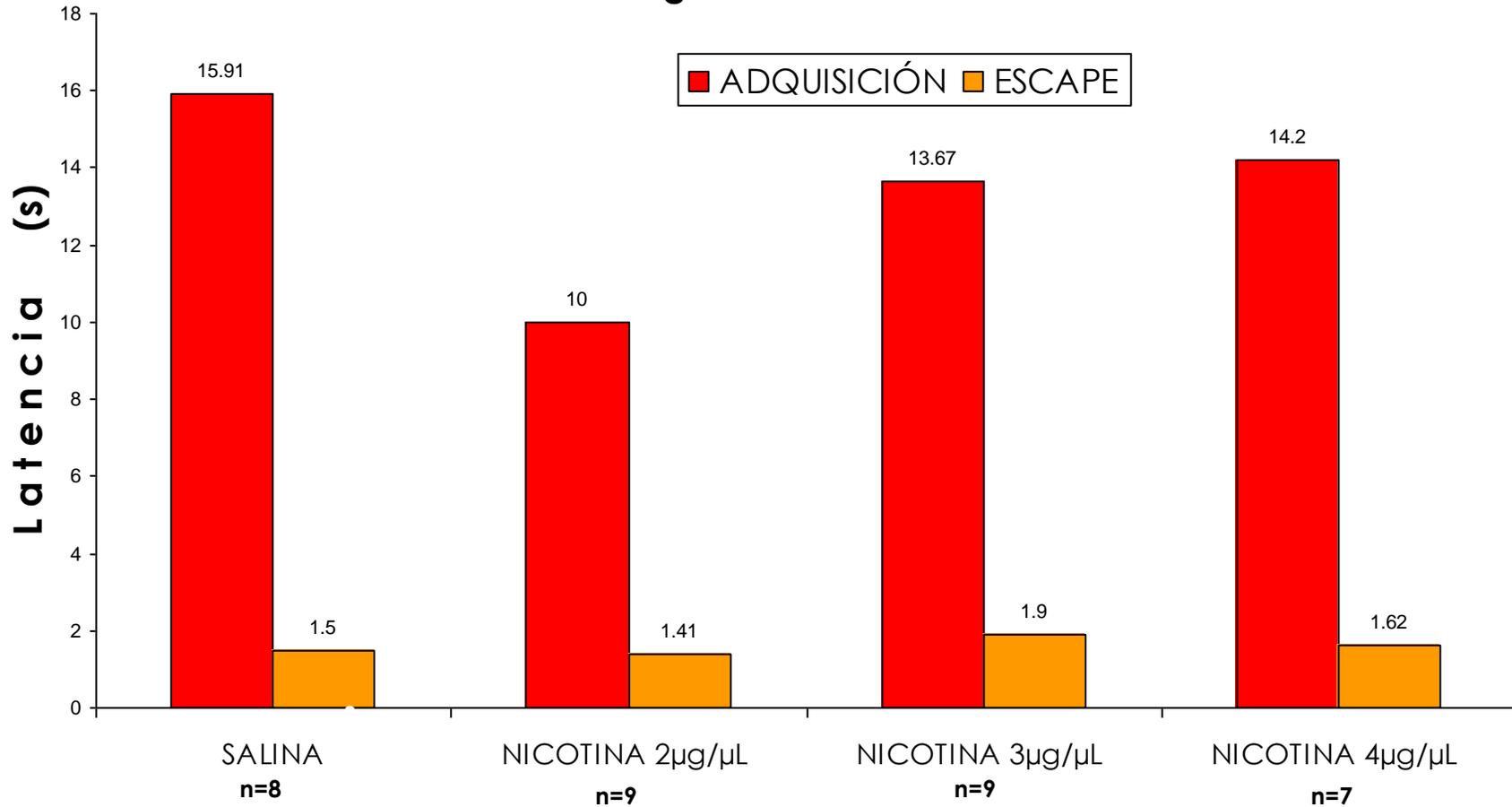


Figura 9. Mediana de las latencias de adquisición y escape del agonista nicotina obtenidas durante la sesión de entrenamiento. Se evidencia que los animales desarrollaron una actividad normal durante su primera exposición a la cámara (sesión de adquisición) y una reactividad similar al choque eléctrico (sesión de escape).

Latencias de retención de tratamientos con el agonista nicotina (Prueba)

En la sesión de prueba del condicionamiento de evitación, al analizar los resultados del efecto del agonista nicotínico, el estadístico de Kruskal-Wallis mostró que se presentaron diferencias significativas entre los grupos en la retención inmediata (MCP evaluada a 30 minutos), $H(3)$, $p=0.016$, así como en la retención evaluada a las 24 horas (MLP), $H(3)$, $p=0.0001$ (Cuadro 2).

Cuadro 2. Mediana de las latencias de retención inmediata (MCP) y retención a las 24 horas (MLP) con la administración de diferentes dosis de nicotina (2, 3 y 4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) antes del entrenamiento de evitación.

<i>Tratamiento</i>	<i>Retención inmediata (30 minutos) (MCP)</i>	<i>Retención a las 24 horas (MLP)</i>
Salina 1 $\mu\text{L}/\text{min}$	365.08	315.28
Nicotina 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	111.55 *	56.82 *
Nicotina 3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	276.20	153.45 *
Nicotina 4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	329.51	260.87

Nota: La dosis de 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de nicotina ocasionó un significativo deterioro de la retención inmediata, que puede interpretarse como reflejo del efecto ansiolítico de las bajas dosis de este agonista.

Las comparaciones a posteriori con el análisis U de Mann-Whitney indicaron que la retención inmediata (MCP) del grupo que recibió el tratamiento de nicotina 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ fue significativamente menor con respecto al grupo control ($p=0.010$), al grupo NIC3 ($p=0.046$) y al grupo NIC4 ($p=0.019$).

Con respecto a la retención evaluada a las 24 horas (MLP), la prueba U de Mann-Whitney reveló diferencias significativas entre todos los grupos, excepto entre NIC4 vs SAL ($p=0.297$). Los valores de significancia (p) entre los otros grupos

fueron los siguientes: NIC2 vs NIC3 $p=0.007$, NIC2 vs NIC4 $p=0.001$, NIC2 vs SAL $p=0.001$, NIC3 vs NIC4 $p=0.005$, NIC3 vs SAL $p=0.007$ (Figura 10).

Hay que recordar que los animales experimentales habían recibido el respectivo tratamiento de nicotina 45 minutos antes del registro de la retención inmediata, por lo que cuando se evaluó ésta, se encontraban bajo el efecto del fármaco. Estos resultados muestran que la retención inmediata no fue deteriorada con altas dosis de nicotina (3 y 4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), y que un deterioro en la MCP se evidenció sólo con la dosis más baja (2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Así, estos efectos de aparente deterioro de la MCP pueden interpretarse como resultado de un efecto ansiolítico con la dosis baja de nicotina, ya que esta dosis deterioró las dos retenciones (MCP y MLP) mientras que la dosis de 3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ sólo deterioró la MLP y la dosis alta (4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) no ocasionó deterioro en ambas memorias.

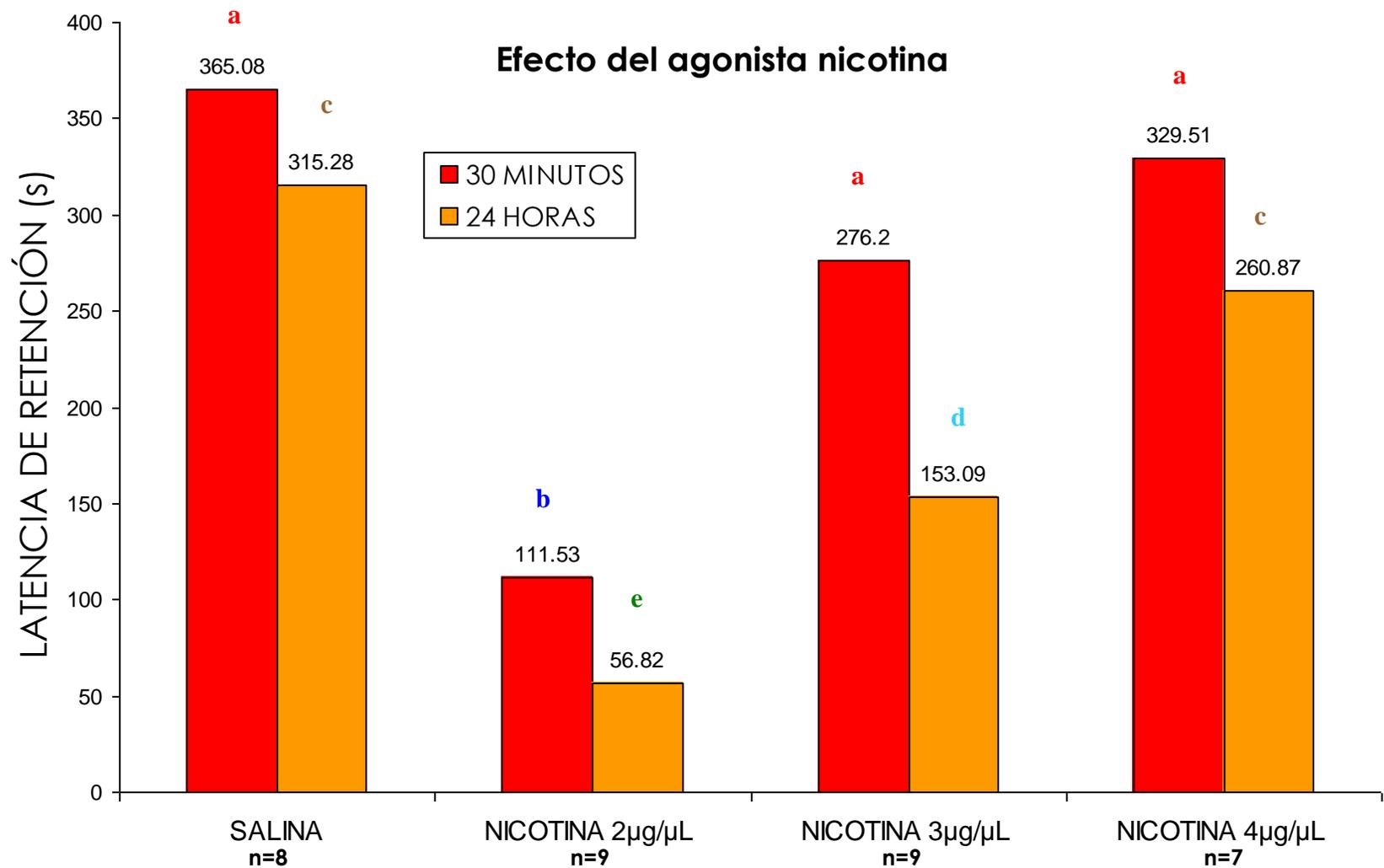


Figura 10. Latencia de retención (mediana) del agonista nicotínico. Se observa que Nicotina interfirió con el aprendizaje de la tarea de evitación inhibitoria deteriorando la memoria de corto y largo plazo con la dosis baja (2µg/µL). La dosis de 3 µg/µL sólo deterioró la memoria de largo plazo. La dosis alta (4 µg/µL) no deterioró ambas memorias.

Latencias de adquisición y escape de tratamientos con antagonistas nicotínicos (Entrenamiento)

En el condicionamiento de evitación inhibitoria, al aplicar la prueba estadística de Kruskal-Wallis para analizar las latencias de adquisición y escape obtenidas con la aplicación de los antagonistas nicotínicos DH β E en sus dosis 2 y 4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ o erisodina en sus dosis 1 y 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, así como salina 1 $\mu\text{L}/\text{min}$, no reveló diferencias entre los tratamientos en el entrenamiento (Cuadro 3 y Figura 11). Estos resultados indican que con la administración de cualquiera de los antagonistas nicotínicos (DH β E 2 y 4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y de erisodina 1 y 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) los animales se comportaron de forma semejante durante la primera exposición a la cámara y presentaron el mismo comportamiento ante al choque eléctrico, por lo que a pesar de que estos antagonistas se administraron antes del entrenamiento y los sujetos se encontraban bajo el efecto de los fármacos, éstos no interfirieron con la ejecución de la tarea.

Cuadro 3. Mediana de las latencias de adquisición y escape de los tratamientos de antagonistas nicotínicos, obtenidas durante el entrenamiento de evitación inhibitoria con un choque eléctrico de 0.75 mA.

<i>Tratamiento</i>	<i>Mediana de la Latencia</i>	
	<i>Adquisición (s)</i>	<i>Escape (s)</i>
Salina 1 $\mu\text{L}/\text{min}$	15.91	1.50
DH β E 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	13.85	1.80
DH β E 4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	13.43	1.60
Erisodina 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	15.88	1.54
Erisodina 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	16.60	1.27

Nota: Los tratamientos salina (1 $\mu\text{L}/\text{min}$), dihidro- β -eritroidina (2 ó 4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) y erisodina (1 ó 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) se administraron justo 15 minutos antes del entrenamiento.

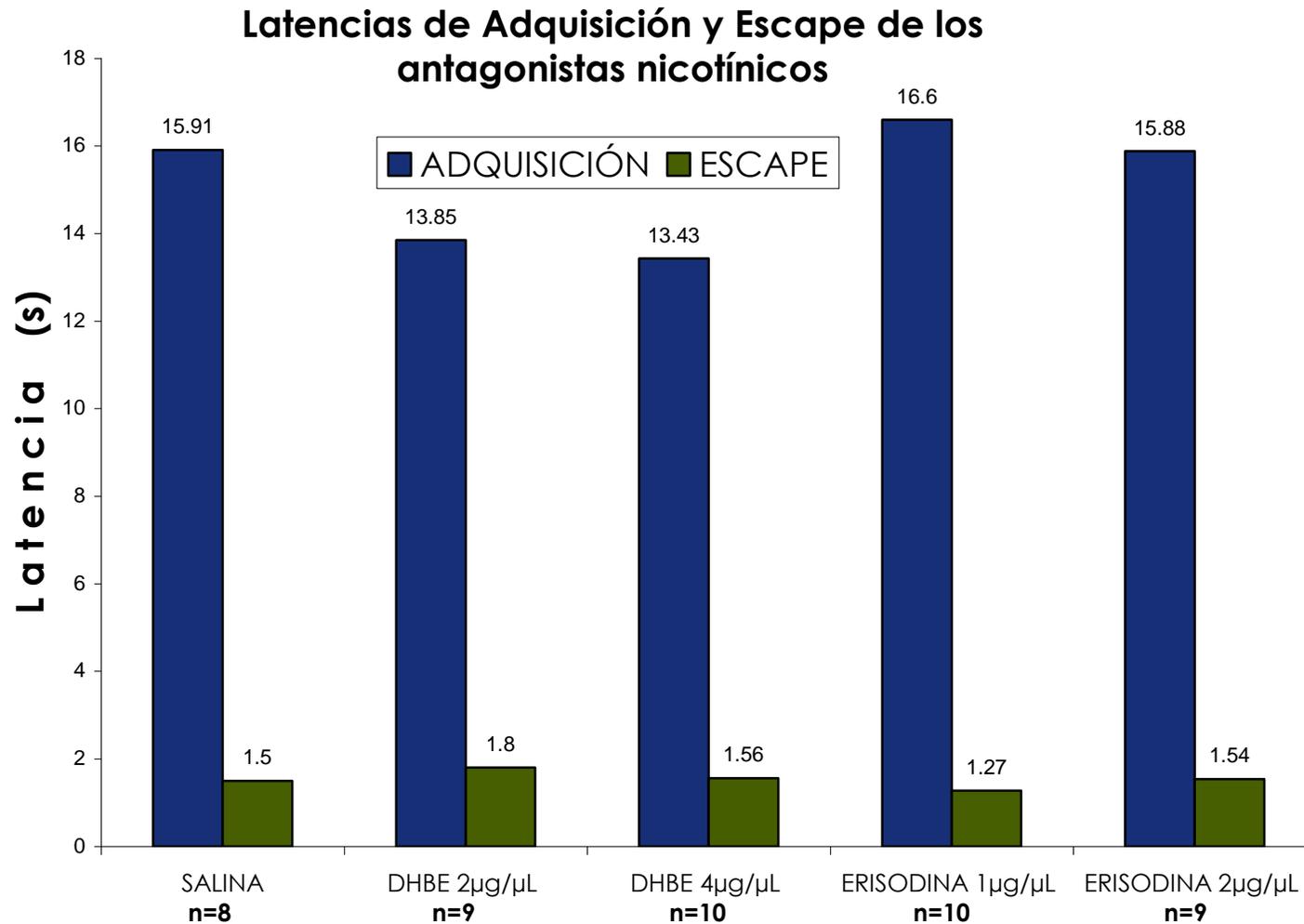


Figura 11. Mediana de las latencias de adquisición y escape de los antagonistas nicotínicos (DHβE y erisodina) obtenidas durante la sesión de entrenamiento. Se evidencia que los animales desarrollaron una actividad normal durante su primera exposición a la cámara (latencia de adquisición) y un comportamiento similar al choque eléctrico (latencia de escape).

Latencias de retención de tratamientos con antagonistas nicotínicos (Prueba)

Durante la sesión de prueba, el efecto de los antagonistas nicotínicos, analizados con el estadístico de Kruskal-Wallis muestra diferencias significativas entre los grupos, tanto en la retención evaluada a los 30 minutos, como a la evaluada a las 24 horas (Cuadro 4 y Figura 12).

Por lo que respecta a la retención inmediata (MCP), las comparaciones a posteriori con el análisis U de Mann-Whitney indicaron que, todas las dosis de los dos antagonistas estudiados, DH β E y erisodina provocaron una significativa disminución en la retención inmediata con respecto a del grupo control, por lo que todas las dosis de los antagonistas deterioraron la MCP (DH β E4 vs SAL $p=0.0001$, DH β E2 vs SAL $p=0.001$, ERISODINA2 vs SAL $p=0.001$; ERISODINA1 vs SAL $p=0.0001$). Sin embargo, las comparaciones dentro de los mismos antagonistas muestran efectos diferenciales, ya que aunque 4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de DHBE deterioraron la MCP, el deterioro con esta dosis fue menor al ocasionado con dosis más bajas de DH β E (2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), así como con las dosis de erisodina aplicadas en este estudio (DH β E4 vs DH β E2 $p=0.001$, DH β E4 vs ERISODINA2 $p=0.0001$, DH β E4 vs ERISODINA1 $p=0.0001$).

Por otro lado, al comparar las latencias de retención, evaluadas durante la sesión de prueba, realizada a las 24 horas, con el grupo control el estadístico U de Mann-Whitney mostró que todas las dosis de DH β E y erisodina deterioraron la MLP siendo la significancia la siguiente: DH β E4 vs SAL $p=0.0001$, DH β E2 vs SAL $p=0.001$, ERISODINA2 vs SAL $p=0.001$, ERISODINA1 vs SAL $p=0.0001$). Este estadístico también reveló que no hubo diferencias significativas entre las dos dosis de erisodina (1 y 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) y tampoco entre las dos dosis de DH β E (2 y 4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$); sin embargo, las latencias de retención con erisodina fueron significativamente menores a las obtenidas con las dosis del antagonista DH β E

(DH β E4 vs ERISODINA2 $p=0.009$, DH β E4 vs ERISODINA1 $p=0.000$, DH β E2 vs ERISODINA2 $p=0.019$, DH β E2 vs ERISODINA1 $p=0.014$).

Estos datos evidencian que los antagonistas estudiados deterioraron la MLP, sin embargo, es contundente que el deterioro ocasionado por las dosis de erisodina fue mayor que el deterioro producido con las de DH β E.

Cuadro 4. Mediana de las latencias de retención (Sesión de Prueba) de la memoria de corto plazo (MCP) y la memoria de largo plazo (MLP).

<i>Tratamiento</i>	<i>Retención inmediata a los 30 minutos (MCP)</i>	<i>Retención a las 24 horas (MLP)</i>
Salina 1 μ L/min	365.08	315.28
DH β E 2 μ g/ μ L	81.33 *	82.43 *
DH β E 4 μ g/ μ L	245.08 *	95.46 *
Erisodina 1 μ g/ μ L	45.93 *	34.77 **
Erisodina 2 μ g/ μ L	92.66 *	49.87 **

Nota: Los antagonistas dihidro- β -eritroidina (2 ó 4 μ g/ μ L) y erisodina (1 ó 2 μ g/ μ L) significativamente deterioraron la MLP. El deterioro de la MLP fue mayor fue producido con la administración de las dos dosis de erisodina.

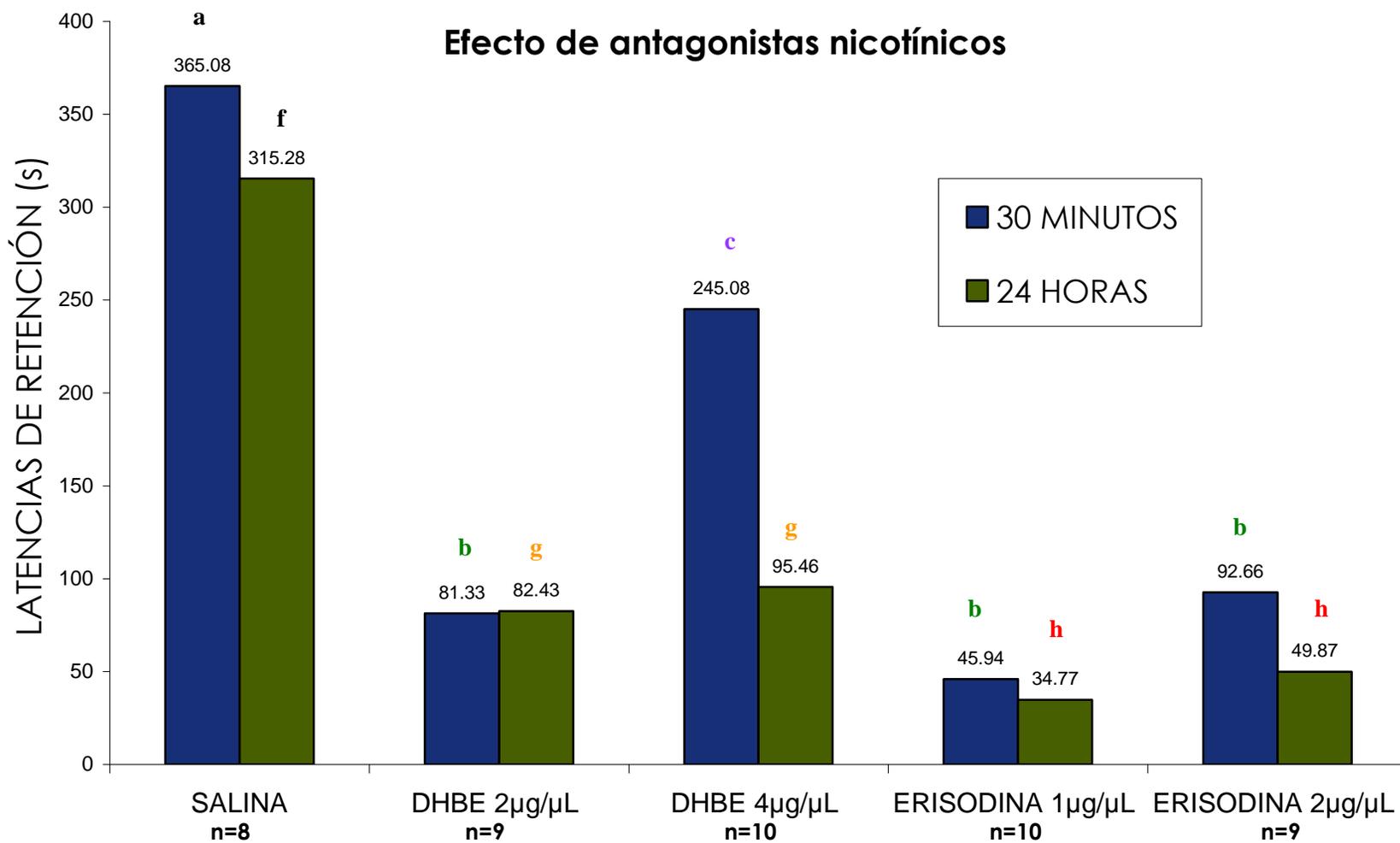


Figura 12. Mediana de la latencia de retención de los antagonistas nicotínicos DHβE y erisodina. La administración de los antagonistas colinérgicos, erisodina y DHBE en el hipocampo ventral antes del entrenamiento interfirió con el aprendizaje de la tarea de evitación inhibitoria deteriorando la MCP y MLP.

DISCUSIÓN

Estar preparado es importante, saber esperar lo es aún más, pero aprovechar el momento adecuado es la clave de la vida...

En este trabajo se estudió, administrando los antagonistas DH β E y erisodina, la participación de los receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 2$ del hipocampo ventral de rata en el deterioro diferencial de la MCP y MLP, empleando el condicionamiento de evitación inhibitoria cuando estas sustancias se infundieron en esa estructura cerebral justo antes del entrenamiento.

Fue evidente que los animales utilizados en la conformación de los grupos, no se vieron afectados en su actividad motora con la administración de los fármacos, previa al entrenamiento de evitación ya que observó que todos los grupos reaccionaron de manera similar ante su primera exposición a la cámara y al choque eléctrico que recibieron en el compartimiento oscuro de la cámara.

Nicotina y memoria

En términos generales, nuestro estudio muestra que conforme se aumentó la dosis de la nicotina, se observó un incremento en la latencia de retención, de tal manera que no hubo deterioro en la memoria a corto plazo (30 minutos) ni en la memoria de largo plazo (24 horas) cuando la dosis de nicotina fue de 4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Este efecto de mejora de la nicotina ha sido ampliamente documentado en otros modelos experimentales y con dosis que van desde 0.6, 1, 3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Bancroft y Levin, 2000; Barros et al., 2004; Levin y Bettany, 2001; López, 2007; Garín-Aguilar et al., 2009). Los efectos de mejora en la retención se han observado sobre todo donde la administración de éste agonista se dio de manera crónica y los sujetos se sometieron a un entrenamiento continuo; sin embargo, hay que recordar que en nuestro modelo el entrenamiento se realiza en un sólo ensayo y que el fármaco se administró una sola vez. Barros y colaboradores (2004) realizaron un estudio donde administraron dosis de nicotina de 0.6, 1 y 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, en un entrenamiento de

evitación de un ensayo (step-down); allí, todos los animales presentaron una retención máxima de 180 segundos. En nuestro estudio, es posible que los resultados obtenidos (bajas latencias de retención) con las dosis bajas de nicotina (2 y 3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) se deban a la variante de nuestra tarea de evitación inhibitoria (step-through). Otro aspecto a considerar es la intensidad de choque eléctrico aplicada durante el entrenamiento, mientras estos autores aplicaron durante el entrenamiento un choque con intensidad de 0.5mA; nosotros además de la diferencia en el tipo de evitación, el choque eléctrico fue de 0.75mA. Estos resultados los podemos interpretar considerando la propiedad ansiolítica de la nicotina así como la distribución regional de los receptores $\alpha 4\beta 2$ en el hipocampo.

Efecto ansiolítico de nicotina

Desde nuestro punto de vista, la administración que hicimos del agonista nicotina en la dosis de 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en la región ventral del hipocampo, evidenció un efecto ansiolítico de este fármaco en la memoria de corto plazo (30 minutos) y por lo tanto, puede explicar el deterioro de la memoria de largo plazo (24 horas). Decker y colaboradores (1995) han descrito el efecto ansiolítico de la administración de nicotina (0.62 $\mu\text{mol}/\text{Kg}$) administrada en ratones y evaluada en el laberinto en cruz elevado, modelo útil en la evaluación de la ansiedad (Brioni et al., 1993; Pellow et al., 1985). Si bien, el modelo de evitación inhibitoria es útil en el estudio de la memoria y el aprendizaje, presenta componentes que pueden generar ansiedad en los sujetos experimentales; uno de ellos es el estímulo aversivo (choque eléctrico) y otro, el hecho que durante el entrenamiento los animales no pueden prescindir del choque eléctrico, es decir, este es inevitable ya que la puerta permanece cerrada y no se le permite escapar al compartimiento iluminado o seguro de la cámara hasta que transcurren los 5 segundos de su duración.

Por otro lado, numerosos estudios señalan que la estructura cerebral en estudio, el hipocampo ventral, presenta una regionalización en sus funciones, esta regionalización del hipocampo le permite participar tanto en procesos de ansiedad

como de memoria. Se ha sugerido que el hipocampo ventral puede tener un papel preferencial en procesos cerebrales asociados a conductas relacionadas a la ansiedad a través de sus conexiones con el hipotálamo y el complejo amigdaloides (Pentkowski et al., 2006), mientras que el hipocampo dorsal podría estar preferentemente implicado en procesos de aprendizaje y memoria, sobre todo memoria de tipo espacial. El papel preferencial para el hipocampo dorsal en el aprendizaje y memoria espacial es consistente con el hecho de que la principal entrada de información visual y espacial al hipocampo desde las áreas cortico-sensoriales, vía corteza de asociación, y áreas perirhinal y entorhinal, es principalmente hacia el hipocampo dorsal (Bertoglio et al., 2006). Sin embargo, otros tipos de entradas sensoriales, tales como claves olfatorias parecen estar igualmente distribuidas a lo largo de estos polos del hipocampo (Moser y Moser, 1998). Esto implica que el hipocampo dorsal puede ser menos importante cuando otros tipos de información son considerados. El hipocampo ventral puede contribuir al aprendizaje espacial al menos bajo algunas condiciones.

Antagonistas nicotínicos DH β E y erisodina

El estudio de los receptores nicotínicos neuronales ha requerido el empleo de diferentes fármacos antagonistas, por ejemplo, se ha utilizado mecamilamina, un antagonista específico para los receptores nicotínicos del subtipo $\alpha 3\beta 2$ (Barros, et al., 2004), la metilcaconitina que es un antagonista selectivo para los receptores $\alpha 7$ (Levin y Felix, 1997) y DH β E un antagonistas de receptores $\alpha 4\beta 2$ (Bancroft y Levin, 2000). La administración de DH β E ha sido ampliamente documentada (Barros et al., 2004; Bancroft y Levin, 2000; Levin y Felix, 1997; Levin et al., 2002; Levin y Alexi, 2006) evidenciando un deterioro en tareas de laberinto y evitación inhibitoria. Sin embargo, se sabe que este fármaco no es selectivo únicamente para $\alpha 4\beta 2$, sino que además se une competitivamente a receptores del subtipo $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 3\beta 4$ y $\alpha 7$ (Sharples y Wonnacott, 2001). Sin embargo, se ha señalado que erisodina es un antagonista selectivo siete veces más a fin al receptor $\alpha 4\beta 2$ que DH β E (Decker, 1995), por lo cual esperábamos que su administración en el

hipocampo ventral antes del entrenamiento de evitación, nos permitiera caracterizar más finamente la participación de estos receptores en la MCP y MLP.

Los resultados de este estudio muestran que los antagonistas nicotínicos DH β E y erisodina deterioraron tanto la memoria de corto plazo (30 minutos) como la memoria de largo plazo (24 horas). Se observó que con la dosis alta de DH β E (4 μ g/ μ L) hubo un menor deterioro en la memoria de corto plazo. Estos resultados sugieren que la dosis de antagonista infundido guarda relación con la afinidad al receptor. Esta afirmación se sustenta en el hecho de que concentraciones sub-micromolar de DHBE bloquean receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 3\beta 2$ en humanos y ratas, mientras que este alcaloide es 10-50 veces menos potente a receptores nicotínicos $\alpha 3\beta 4$ y $\alpha 7$ expresados en ovocitos de *Xenopus*. Otra observación importante es que en neuronas hipocampales, DHBE (100 nM) bloquean Corrientes tipo II, atribuidas a receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 2$, mientras que las corrientes tipo I mediadas por receptores nicotínicos $\alpha 7$ fueron insensibles a concentraciones de DH β E menores a 10 μ mol (Chávez-Noriega *et al.*, 1997; Harvey *et al.*, 1996, en Sharples y Wonnacott, 2001).

Muchos son los autores que distinguen la participación del hipocampo ventral en los procesos de aprendizaje y memoria (Bancroft y Levin, 2000; Bannerman *et al.*, 2004; Bertoglio, 2006; Levin y Feliz, 1997; Levin y Bettany, 2001), los cuales hacen alusión a la participación de los receptores nicotínicos del subtipo $\alpha 4\beta 2$ del hipocampo ventral en dichos procesos, sin embargo, para dichos estudios se utilizó el antagonista DH β E, ya que no se contaba con un fármaco que presentara mayor afinidad a estos receptores. En el laboratorio erisodina se utilizó para determinar la participación de los receptores nicotínicos neuronales $\alpha 4\beta 2$ del hipocampo ventral sobre la consolidación de la memoria y en este estudio erisodina permitió el estudio de la MCP y MLP.

Los resultados también muestran que si bien la administración intra-hipocampal de DH β E o erisodina deterioraron la MCP y MLP, este deterioro fue 1.7 veces mayor

con la infusión de 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de erisodina que con la administración de 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de DH β E, con lo cual este estudio evidencia que erisodina presenta una mayor afinidad a los receptores $\alpha 4\beta 2$ del hipocampo ventral concordando con lo dicho por Decker y colaboradores (1995).

En estudios previos llevados a cabo en el laboratorio se utilizaron los antagonistas DHBE y erisodina para caracterizar la participación de los receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 2$ del hipocampo dorsal sobre la consolidación de la memoria de la tarea de evitación inhibitoria (Garín-Aguilar *et al.*, 2009). Allí se concluyó que estos receptores participan en la consolidación de la memoria de la tarea aversiva, sin embargo, no hubo diferencias en el efecto que ocasionaron dosis bajas de erisodina (1 y 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) y una dosis de DH β E (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Estos resultados confirman la participación diferencial que pueden tener las subregiones del hipocampo, HD e HV en las funciones de memoria, aprendizaje y ansiedad. Por otro lado, estos resultados también pueden ser producto de la distribución regional de los receptores $\alpha 4\beta 2$ en el hipocampo.

Estudios como éste, donde se utilizó un antagonista más selectivo, son útiles para determinar la participación de estructuras cerebrales que presentan receptores $\alpha 4\beta 2$, en las diferentes etapas o fases del proceso mnemónico (adquisición, consolidación o evocación). En última instancia, la información obtenida aquí se suma a la existente, para conocer los mecanismos neuronales que participan en dichos procesos. Mientras más nos acerquemos al conocimiento de la participación propia de cada receptor nicotínico, más cerca se estará de desarrollar fármacos que permitan usar la modulación nicotina con fines terapéuticos más seguros. Finalmente, los resultados presentados aquí aportan información que sustenta la hipótesis de que el hipocampo ventral puede regular la memoria y procesos relacionados con la ansiedad.

CONCLUSIONES

- La dosis alta de nicotina (4 μ g/ μ L) no deterioró la MCP ni la MLP.
- La dosis baja de nicotina (2 μ g/ μ L) evidenció su efecto ansiolítico.
- Los alcaloides DH β E y erisodina deterioraron el aprendizaje de evitación interfiriendo con la MCP y con la MLP.
- El deterioro ocasionado con erisodina en MCP y MLP fue mayor que el observado con DHBE.
- Existe una relación inversa entre la dosis de los antagonistas y el deterioro que ocasionan en la memoria.
- Los resultados obtenidos con DH β E sugieren que los receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 7$ del hipocampo ventral participan en la modulación del aprendizaje de evitación.
- Erisodina permitió evaluar la participación diferencial de los receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 2$ del hipocampo ventral en la MCP y la MLP.
- El estudio aporta información que sustenta la hipótesis de la regionalización del hipocampo en dorsal y ventral y que estas regiones pueden regular la memoria y procesos relacionados con la ansiedad, respectivamente.

PERSPECTIVAS DE LA INVESTIGACIÓN

If you find the path you should walk down. You'll not only do yourself a favor. But those around you as well...

1.- Debido a la relación dosis-efecto observada en este estudio, se recomienda en futuras investigaciones encaminadas al estudio del efecto de antagonistas nicotínicos sobre los procesos mnemónicos, aplicar dosis de DH β E menores a 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y dosis de erisodina menores a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

2.- En estudios previos realizados en el laboratorio usando una tarea de evitación inhibitoria, se evaluó la participación de los receptores $\alpha 4\beta 2$ en la consolidación de la memoria en áreas como el HD e HV sin embargo, falta evaluar su participación en otras etapas de la formación de la memoria como son aprendizaje en HD y evocación en HD e HV.

3.- Ya que DH β E y erisodina se obtuvieron de semillas de *Erythrina* y presentan afinidad a receptores nicotínicos neuronales, es importante continuar con el aislamiento y purificación de otros alcaloides de *Erythrina* que, muy probablemente presenten antagonismo a receptores nicotínicos y evaluar su efecto en tareas de aprendizaje y memoria.

4.- Sería de utilidad determinar la afinidad que esos alcaloides presentan a receptores nicotínicos usando el modelo de expresión en ovocitos de *Xenopus*.

PERSPECTIVAS DE LA INVESTIGACIÓN

If you find the path you should walk down. You'll not only do yourself a favor. But those around you as well...

- 1.- Debido a la relación dosis-efecto observada en este estudio, se recomienda en futuras investigaciones encaminadas al estudio del efecto de antagonistas nicotínicos sobre los procesos mnemónicos, aplicar dosis de DH β E menores a 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y dosis de erisodina menores a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.
- 2.- En estudios previos realizados en el laboratorio usando una tarea de evitación inhibitoria, se evaluó la participación de los receptores $\alpha 4\beta 2$ en la consolidación de la memoria en áreas como el HD e HV sin embargo, falta evaluar su participación en otras etapas de la formación de la memoria como son aprendizaje en HD y evocación en HD e HV.
- 3.- Ya que DH β E y erisodina se obtuvieron de semillas de *Erythrina* y presentan afinidad a receptores nicotínicos neuronales, es importante continuar con el aislamiento y purificación de otros alcaloides de *Erythrina* que, muy probablemente presenten antagonismo a receptores nicotínicos y evaluar su efecto en tareas de aprendizaje y memoria.
- 4.- Sería de utilidad determinar la afinidad que esos alcaloides presentan a receptores nicotínicos usando el modelo de expresión en ovocitos de *Xenopus*.

REFERENCIAS

- Ambrogio Lorenzini, C., Baldi, E., Bucherelli, C., Sacchetti, B., Tassoni, G. (1997) Role of ventral hippocampus in acquisition, consolidation and retrieval of rat's passive avoidance response memory trace. *Brain Research*, 768: 242-248.
- Anagnostaras, S. G., Gale, G. D., Fanselow, M. S. (2001) Hippocampus and contextual fear conditioning: recent controversies and advances. *Hippocampus*, 11: 8-17.
- Aubert, I., Araujo, D. M., Cécyre, D., Robitaille, Y., Gauthier, S., Quirion, R. (1992) Comparative alterations of nicotinic and muscarinic binding sites in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Journal of Neurochemistry*, 58: 529-541.
- Bailey, E. L., Overstreet, D. H., Crocker, A. D. (1986) Differential effects of intrahippocampal injections of the cholinergic neurotoxin AF64A on open-field activity and avoidance learning in the rat. *Behavioral and Neural Biology*, 45: 263-274.
- Bancroft, A., Levin, E. D. (2000) Ventral hippocampus $\alpha 4\beta 2$ nicotinic receptors and chronic nicotine effects on memory. *Neuropharmacology*, 39: 2770-2778.
- Barros, D. M., Ramírez, M. R., Reis, E. A., Izquierdo, I. (2004) Participation of hippocampal nicotinic receptors in acquisition, consolidation and retrieval of memory for one trial inhibitory avoidance in rats. *Neuroscience*, 126:651-656.
- Bast, T., Zhang, W. N., Feldon, J. (2001) Hippocampus and classical fear conditioning. *Hippocampus*, 11: 828-831.
- Beart, P. M. (1984) Basal ganglia transmitters and receptors. En: McKenzie, J. S., Kemm, R. E., Wilcock, L. N. (Eds.). *The basal ganglia: structure and function* (Pp. 261-298). New York: Plenum Press.
- Bennerman, D. M., Rawlins, J. N. P., McHugh, S. B., Deacon, R. M. J., Yee, B. K., Bast, T., Zhang, W. N., Pothuizen, H. H. J., Feldon, J. (2004) Regional dissociations within the hippocampus-memory and anxiety. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 28: 273-283.

- Bertoglio, L. J., Lourenço, J. S. R., Silveira, F. S. (2006) Further evidence that anxiety and memory are regionally dissociated within the hippocampus. *Behavioural Brain Research*, 175: 183-188.
- Black, A. H., Nadel, L., O'Keefe, J. (1977) Hippocampal function in avoidance learning and punishment. *Psychological Bulletin*, 84: 1107-1129.
- Brioni, J. D., O'Neill, A. B., Kim, D. J. B., Decker, M. W. (1993) Nicotinic receptor agonists exhibit anxiolytic-like effects on the elevated plus-maze. *European Journal of Pharmacology*, 238: 1-8.
- Buccafusco, J. J., Jackson, W. J. (1991) Beneficial effects of nicotine administered prior to a delayed matching-to-sample task in young and aged monkeys. *Neurobiology of Aging*, 12: 233-238.
- Bueno, J. A., Sabanes, F., Salvador, L., Gascón, J. (1985) *Psicofarmacología Clínica*. Mallorca: Salvat Editores.
- Carlson, N. R. (2004) *Fisiología de la conducta*. España: Pearson.
- Decker, M. W., Anderson, D. J., Brioni, J. D., Donnelly-Roberts, D. L., Kang, C. H., O'Neill, A. B., Piattoni-Kaplan, M., Swanson, S., Sullivan, J. P. (1995) Erysodine, a competitive antagonist at neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *European Journal of Pharmacology*, 280: 79-89.
- Decker, M. W., Majchrzak, M. J., Arneric, S. P. (1993) Effects of lobeline, a nicotinic receptor agonist, on learning and memory. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 45: 571-576.
- Eichenbaum, H. (1996) Is the rodent hippocampus just for "place"? *Current Opinion in Neurobiology*, 6: 187-195.
- Everss, V. E. (2002) Efecto de la amitriptilina sobre la Evitación inhibitoria en ratones machos y hembras. Tesis de doctorado. Universidad de Valencia. España.
- Flores, H. L. (2004) Estudio comparativo del efecto de erisodina y nicotina sobre una tarea en laberinto T elevado. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. México.

- Flores, S. M. E., Segura, T. J. E. (2005) Estructura y función de los receptores acetilcolina de tipo muscarínico y nicotínico. *Revista Mexicana Neurociencia*, 6 (4): 315-326.
- Fox, S. I. (2003) *Fisiología Humana*. México: Mc Graw-Hill Interamericana.
- Garín-Aguilar, M. E., López-Valera, S., Martínez, V. C. L., Valencia del T. G., Soto-Hernández, M., Prado-Alcalá R. A. (2009) Erisodina y receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 2$ del hipocampo dorsal en la consolidación de la memoria. *Revista Latinoamericana de Química*, 37(3): 206-217.
- Gold, E. P. (1986) The use of avoidance training in studies of modulation of memory storage. *Behavioral and Neural Biology*, 46: 87-98.
- Gotti, C., Clementi, F. (2004) Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Progress in Neurobiology*, 74: 363-396.
- Hallanger, A. E., Wainer, B. H. (1988). Ascending Projections from the pedunculopontine tegmental nucleus and the adjacent mesopontine tegmentum in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 274: 483-515.
- Hilgard y Marquis. (1975) *Condicionamiento y aprendizaje*. México: Trillas.
- Hoover, D. B., Jacobowitz, D. M. (1979). Neurochemical and histochemical studies of the effect of a lesion of the nucleus cuneiformis on the cholinergic innervation of discrete areas of the rat brain. *Brain Research*, 170: 113-122.
- Jarrard, L. (1993) On the role of the hippocampus in learning and memory in the rat. *Behavioral and Neural Biology*, 60: 9-26.
- Johnston, M. V., Mckinney, M., Coyle, J. T. (1981). Neocortical cholinergic innervation: A description of extrinsic and intrinsic components in the rat. *Experimental Brain Research*, 43: 159-172.
- Kovács, G. L., De Wied, D. (1994) Peptidergic modulation of learning and memory processes. *Pharmacology Review*, 46: 269-291.
- Levin, D. E., Bradley, A., Addy, N., Sigurani, N. (2002) Hippocampal $\alpha 7$ and $\alpha 4\beta 2$ nicotinic receptors and working. *Neuroscience*, 109(4): 757-765.
- Levin, E. D. (1992) Nicotina systems and cognitive function. *Psychopharmacology*, 108: 418-431.

- Levin, E. D., Alexi, N. (2006) Dorsal hippocampal $\alpha 7$ and $\alpha 4\beta 2$ nicotinic receptor and memory. *Brain Research*, 1081: 72-78.
- Levin, E. D., Bettany, J. E. (2001) Ventral hippocampal $\alpha 7$ nicotinic receptor blockade and chronic nicotine effects on memory performance in the radial-arm maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 70: 467-474.
- Levin, E. D., Felix, R. (1997) Nicotinic antagonist administration into the ventral hippocampus and spatial working memory in rats. *Neuroscience*, 81: 1009-1077.
- Levin, E. D., McClernon, F. J., Rezvani, A. H. (2006) Nicotonic effects on cognitive function: behavioural characterization, pharmacological specification, and anatomic localization. *Psychopharmacology*, 184: 523-539.
- Levin, E. D., Rezvani, A. H. (2000) Development of nicotinic drug therapy for cognitive disorders. *European Journal of Pharmacology*, 393: 141-146.
- Lewis, P. R., Shute, C. C. D., Silver, A. (1967). The cholinergic limbic system: Projections to hippocampal formation, medial cortex, nuclei of the ascending cholinergic reticular system, and the subcortical organ and supra-optic crest. *Brain*, 90: 521-540.
- López, V. S. (2007) Efecto de la administración intra-hipocampal de erisodina sobre la consolidación de una tarea de evitación inhibitoria. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. México.
- Lorenzini, A. C., Baldi, E., Bucherelli, C., Sacchetti, B., Tassoni, B. (1996) Role of dorsal hippocampus in acquisition, consolidation and retrieval of rats passive avoidance response: a tetrodotoxin functional inactivation study. *Brain Research*, 730: 32-39.
- Martínez, I., Quirarte, G.L., Díaz-Cintra, S., Quiroz, C., Prado-Alcalá, R.A. (2002) Effects of lesion of hippocampal fields CA1 and CA3 on acquisition of inhibitory avoidance. *Neuropsychobiology*, 46: 97-103.
- McGaugh, J. L. (1966). Time-dependent processes in memory storage. *Science*, 153: 1351-1358.
- McGaugh, J. L. (1973). Drug facilitation of learning and memory. *Pharmacology*, 13: 229-241.

- McGaugh, J. L. (1989). Dissociating learning and performance: drug and hormones enhancement of memory storage. *Brain Research Bulletin*, 23: 339-345.
- Mehul, A. T., Gary, D. C. (2004) Lesions of the hippocampus, but not the dorsal hippocampus, impair conditioned fear expression and inhibitory avoidance on the elevated T-maze. *Neurobiology of Learning and memory*, 81: 172-184.
- Morris, R. G. M., Garrud, P., Rawlins, J. N. P., O'Keefe, J. (1982) Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature*, 297: 681-683.
- Moser, M. B., Moser, E. I. (1998) Functional differentiation in the hippocampus. *Hippocampus*, 8: 608-619.
- Müller, G. E., Pilzecker, A. (1900) Experimentelle Beiträge zur Lehre vom Gedächtnis. *Zeitschrift für Psychologie*, 1: 1-288.
- O'Keefe, J., Nadel, L. (1978) The hippocampus as a cognitive map. Oxford: The Clarendon Press.
- Paxinos, G., Watson, C. (1998). The rat brain in stereotaxic coordinates. (8^a Ed.) San Diego: Academic Press.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S.E., Briley, M. (1985) Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 14: 149.
- Pentkowski, N. S., Blanchard, D. C., Lever, C., Litvin, Y., Blanchard, R. J. (2006) Effects of lesions to the dorsal and ventral hippocampus on defensive behaviors in rats. *European Journal of Neuroscience*, 23: 2185-2196.
- Petrovich, G. D., Canteras, N. S., Swanson, L. W. (2001) Combinatorial amygdalar inputs to hippocampal domains and hypothalamic behavior systems. *Brain Research Reviews*, 38: 247-289.
- Prado-Alcalá R. A. (1991) Fisiología del aprendizaje y la memoria. En: Ninomiya, J. G. (Ed.). Fisiología humana: Neurofisiología (Pp. 492-507). México: El Manual Moderno.
- Prado-Alcalá, R. A., Díaz, del G. M. A., Garín-Aguilar, M. E., Díaz, T. A., Martínez, G. M. I., Quirarte, G. L. (2006) Reorganización cerebral inducida por la

- experiencia incrementada de aprendizaje. *Revista Mexicana de Análisis de la Conducta*, 32: 203-218.
- Seiden, L. S., Dycstra, L. A. (1979). *Psychopharmacology: a biochemical and behavioral approach*. New York: Van Nostrand Reinhold Company.
- Sharples, G. V. S., Wonnacott, S. (2001) Neuronal nicotinic receptors. *Tocris Reviews*, 19: 1-12.
- Sperling, A. D. (1964). *Psicología simplificada*. México: Compañía General de Ediciones.
- Squire, R. L. (1987). *Memory: and brain*. Oxford: University Press.
- Sutherland, R. J., Rudy, J. W. (1989) Configural association theory: The role of the hippocampal formation in learning, memory, and amnesia. *Psychobiology*, 17: 129-144.
- Swanson, L. W., Cowan, W. M. (1977) An autoradiographic study of the organization of the efferent connections of the hippocampal formation in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 172: 49–84.
- Swason, L. W. (1983) The hippocampus and the concept of the limbic system. En: Seifert W (Ed.). *Neurobiology of the hippocampus* (Pp. 3-19). London: Academic Press.
- Thompson, R. (1978) Localization of a “passive avoidance memory system” in the white rat. *Physiological Psychology*, 6: 263-274.
- Walsh, T. J., Tilson, H. A., DeHaven, D. L., Mailman, R. B., Fisher, A., Hanin, I. (1984) AF64A a cholinergic neurotoxin, selectively depletes acetylcholine in hippocampus and cortex, and produces long-term passive avoidance and radial-arm maze deficits in the rat. *Brain Research*, 321: 91-102.
- Woodruff-Pak, D. S. (2003) Mecamylamine reversal by nicotina and by a partial $\alpha 7$ nicotonic acetylcholine receptor agonist (GTS-21) in rabbits tested with delay eyeblink classical conditioning. *Science*, 143: 159-167.