

112
2 es.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE PSICOLOGIA

PARTICIPACION DIFERENCIAL DEL NUCLEO BASAL
MAGNOCELULAR EN LA ADQUISICION Y
EVOCACION DE VARIAS TAREAS DE APRENDIZAJE

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADA EN PSICOLOGIA
P R E S E N T A
CLAUDIA LETICIA / GONZALEZ RODRIGUEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. FEDERICO BERMUDEZ RATTONI



MEXICO, D. F.

1998

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

264874



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.



A Babi
(Luchadora invencible)

A mis padres Antonio y Leticia por ser finalmente los principales responsables.

A mis hermanos Toño y Lali, el primero por cambiarme la vida; la segunda por ayudarme a vivirla.

AGRADECIMIENTOS

Gracias (muchas) a Keo, más que por iniciarme en estas andanzas, más que por ayudarme siempre con mis experimentos, más que por hecharme la mano cada vez; por su amistad invaluable.

Gracias a todos mis compañeros del laboratorio: Maribel, Humberto, Víctor, Rolando, Martha, Lety, Ricardo, Marisela, Enrique, Gustavo; con los que de una u otra manera crecí. En especial a Vincent e Itzel por compartir más que 8 horas en el lab.

Gracias a Yolanda Díaz de Castro y Oreste Carbajal por toda su ayuda técnica.

Gracias a Ma. Carmen, Natalia, Norma, Emma, Selene, Julio, la amiba, Garci, y por supuesto la “cuñis”, amigos que soportaron mis manías y me ayudaron en la estancia de tan nebuloso recinto.

Finalmente, gracias a aquellos que de una u otra manera siempre han estado.

RECONOCIMIENTOS

Un agradecimiento muy especial al Dr. Federico Bermúdez Rattoni, por su apoyo en todo momento y su inigualable paciencia.

Agradezco también a mis maestros Carolina, Paco, Pablo, Ma. Elena, Raúl, GUIA; con los que sí pude dialogar.

Otro agradecimiento al Mtro. Salgado, al Dr. David Velázquez, al Dr. Juan Fernández y al Mtro. Raúl Avila; por la tarea de revisar este trabajo y por sus valiosos comentarios. Una disculpa por las prisas.

Gracias al apoyo económico que para ésta investigación fué otorgado al Dr. Bermúdez Rattoni por CONACyT (proyecto 3260-P-N9608).

A very special acknowledgement to Dr. Bryan Kolb, Dr. Ian Wishaw and Robbin Gibb for emphasizing my interest and love for science, and because they were in great extent the main responsables of mine finishing this work so fast.

Thanks, also, to my friends in Lethbridge.

*“La línea mas corta -contestó Einstein-
no es aquella que parece recta
Ella se curva alrededor de sí misma,
De modo muy parecida a la figura de un ocho
Y si vais demasiado deprisa,
Llegaréis demasiado tarde.*

*El día de Pascua es tiempo de Navidad,
Y lo lejos está cerca,
Y dos y dos son más que cuatro
Y allá abajo está aquí.”
“Puede que tengáis razón -dijo Eddington-,
Parece un poco extravagante”*

(W. William)

*-¿Es cierto que responden a sus nombres?
-observó negligentemente el Mosquito.
-Nunca oí que lo hiciesen -dijo Alicia.
-¿De qué les sirven pues los nombres -dijo el Mosquito-
si no responden a ellos?*

(Lewis Carroll)

INDICE

I. Introducción	1
Ia. Antecedentes	1
Ib. Memoria a corto y largo plazo	4
Ic. Aprendizaje y Memoria	6
II. El sistema colinérgico y su papel en el aprendizaje y memoria	9
IIa. Consideraciones anatómicas	9
IIb. El NBM y algunas funciones cognitivas	12
III. Tres paradigmas conductuales	16
IIIa. Prevención pasiva	16
IIIb. Laberinto de Agua	17
IIIc. Condicionamiento Aversivo a los Sabores (CAS)	18
IV. Planteamiento del problema y Objetivos	25
V. Metodo	28
Va. Sujetos	28
Vb. Materiales	28
Vc. Lesiones	29
VI. Experimento I	31
VIa. Procedimiento	31
VIb. CAS Grupo Memoria	31
VIc. CAS Grupo Aprendizaje	34
VId. Prevención Pasiva (PP) Grupo Memoria	35
VIe. Histologías	36
VII. Experimento II	41
VIIa. Procedimiento	41
VIIb. Prevención Pasiva (PP) Grupo Aprendizaje	41
VIIc. Laberinto de Agua Grupo Memoria	41
VIId. Laberinto de Agua Grupo Aprendizaje	45
VIIe. Histologías	46
VIII. Resultados	50
VIIIa. Experimento I CAS	50
VIIIb. Grupo Memoria	50
VIIIc. Grupo Aprendizaje	51

VIII d. Prevención Pasiva Grupo Memoria	53
VIII e. Histologías	53
VIII f. Experimento 2 (PP) Grupo Aprendizaje	56
VIII g. Laberinto de Agua Grupo Memoria	57
VIII h. Prueba	58
VIII i. Grupo Aprendizaje	60
VIII j. Prueba	61
VIII k. Histologías	63
IX Discusión y Conclusión	68
Referencias	

CAPITULO I

INTRODUCCION

Ia. Antecedentes

Que difícil parece referirnos al aprendizaje sin que nos venga a la mente el término memoria, y viceversa, y es que por décadas ambos fenómenos han sido estudiados en paralelo. Para muchos psicólogos la memoria es un indicador de que el aprendizaje ha permanecido a través del tiempo, y aprendizaje es por otro lado, una de esas palabras que todos utilizamos intuitivamente sabiendo a lo que nos referimos pero que resulta difícil definir.

Una definición de aprendizaje que reúne los principales elementos que engloban este fenómeno es enunciada por Kimble: "*El aprendizaje es un cambio permanente en el potencial conductual que ocurre como resultado de la practica reforzada*" (Kimble 1967). Cuando Kimble utiliza el término *permanente*, excluye los cambios conductuales temporales, como los que resultan de la fatiga, el uso de drogas o la enfermedad.

Ahora bien, es obvio que el aprendizaje puede ocurrir sin que haya un cambio evidente en la conducta, todos tenemos el potencial para atarnos las agujetas, pero si en este momento no lo hacemos, no quiere decir que no lo sepamos, técnicamente decimos que tal aprendizaje está latente. Esto es a lo que Kimble se refiere por *potencial conductual*; a la distinción entre un estado (aprendizaje), y la manifestación del mismo (ejecución).

Por último, *práctica* es el termino que utiliza para excluir aquellos cambios relativamente permanentes que son producto de procesos fisiológicos o de la maduración. *Reforzada* se refiere únicamente a los eventos que aseguran la ocurrencia del aprendizaje.

Si ahora definimos memoria como el almacenamiento y evocación de experiencias previas (Shepherd, 1994) o como un proceso que resulta de un cambio relativamente permanente en la conducta que nunca se ve pero siempre se infiere (Kolb et al., 1990); las definiciones de aprendizaje y memoria resultan muy parecidas entre sí.

Resulta muy difícil tratar de comprender un sistema tan complicado como el aprendizaje o la memoria, sin pensar en los elementos más básicos que los subyacen. La siguiente afirmación: "*Todo lo psicológico es al mismo tiempo biológico*" (Myers, 1998), es un buen ejemplo de esta problema. Así pues nuestros pensamientos, sentimientos, nuestro comportamiento son producto de nuestro cuerpo, de nuestros genes, de nuestro cerebro.

Pero tuvieron que pasar muchos años antes de poder hacer esta afirmación. Recordemos a Platón con la idea de que la mente estaba en la cabeza por ser el lugar de nuestro cuerpo mas próximo al cielo; Aristóteles afirmaba que los procesos mentales estaban localizados en el corazón porque bombeaba vitalidad y calor al resto del cuerpo; posteriormente Hipócrates empezó a apuntar hacia la hipótesis del cerebro, y finalmente, Descartes que sustituye la idea platónica del alma tripartita, por un "alma" racional localizada en el cerebro.

Pero no fue sino hasta principios del siglo XIX con Gall y Spurzheim que la idea de las funciones localizadas en el cerebro comenzó a tomar fuerza. Su teoría frenológica puede ser resumida por el título de uno de sus trabajos: "Sobre las funciones del cerebro y de cada una de sus partes, con observaciones vinculadas a la posibilidad de determinar los instintos, propensiones y talentos, o las disposiciones morales e intelectuales de los hombres y los animales, debido a las configuraciones del cerebro y la cabeza" Gall defendió en sus escritos la hipótesis de que el cerebro está dividido de modo tal que puede efectuar muchas funciones separadas, y afirmó: "*el cerebro está compuesto de tantos órganos particulares independientes como facultades fundamentales existen en la mente*" (citado en Robinson 1976, p. 339).

A mediados de este siglo Lashley comienza sus trabajos para describir el sustrato neural de alguna conducta en particular. Con esta idea en mente pasó gran parte de su vida haciendo uso de la técnica de ablación o lesión quirúrgica en regiones específicas del sistema nervioso con el fin de determinar cuales conductas se ven perjudicadas por dicha lesión.

Llevó a cabo decenas de experimentos sobre el sistema nervioso de la rata. En uno de los más clásicos, efectuaba la lesión en alguna zona de la corteza cerebral relacionada con la visión, para determinar los efectos en la capacidad perceptual. Cuestionó fuertemente la idea de la importancia de las zonas y conexiones neurales específicas: *"es muy dudoso que estén involucradas las mismas neuronas o sinapsis aun en dos reacciones similares frente al mismo estímulo"* (Lashley, 1929, p.3). Desarrolló también otros conceptos vinculados en el mismo problema, por ejemplo el de la equipotencialidad que es la capacidad de cualquier parte de una zona funcional para llevar a cabo cierta conducta.

Al tratar el problema de la memoria afirmó que durante el proceso de aprendizaje la información queda representada en vastas regiones del cerebro. y que el trazo de memoria está localizado en todas partes del área funcional (Lashley 1950 p.287-313)

Los estudios ya clásicos de Hubel y Weisel sobre los registros de células aisladas de la corteza cerebral del gato mediante el empleo de microelectrodos, así como los de Sperry y el cerebro dividido y la notable plasticidad cerebral, no solo les valió el Premio Nobel en 1981, sino que marcó el inicio del estudio minucioso de sistemas específicos sobre las bases neurales de la cognición.

Estudios más recientes hechos por Kandel, han tocado puntos medulares en la relación que existe entre el funcionamiento de la célula nerviosa individual y el comportamiento del organismo. Su trabajo en *Aplysia* mostró que los aspectos elementales del aprendizaje no están distribuidos en forma difusa en el cerebro, sino que es posible localizarlos en partes específicas de las redes neurales. Según Kandel el aprendizaje es provocado por una alteración en las conexiones sinápticas, y en esta alteración sináptica cumplen un papel fundamental los

transmisores químicos liberados en las terminales de las neuronas. Así por ejemplo, si se aplica un choque eléctrico a la cola de una babosa marina, se libera un neurotransmisor y los poros de la neurona se modifican de modo tal, que frente a un impulso posterior, es mayor la cantidad de neurotransmisor liberada, así pues, la siguiente vez que se aplica el choque a la cola del molusco la neurona "recuerda" rápidamente que debe enviar ordenes químicas para retraer el sifón, (Kandel, 1987).

Kandel resume su propuesta acerca de la relación entre los datos innatos y los estímulos experimentales en un aprendizaje como el anterior, de la siguiente manera: *"la capacidad potencial de un organismo para muchos comportamientos forma parte intrínseca del andamiaje básico de su cerebro, y en este sentido está bajo control genético y evolutivo. Los factores ambientales y el aprendizaje sacan a relucir estas capacidades latentes, al alterar la eficacia de los canales de acción preexistentes, promoviendo así la expresión de nuevas pautas de conducta"* (citado en Gardner 1987 p. 305).

Ib. MEMORIA A CORTO Y LARGO PLAZO

El estudio científico de la memoria se remonta a 1885 cuando H. Ebbinghaus realiza las primeras investigaciones sistemáticas sobre la memoria humana. Su obsesión por el control experimental lo llevó a utilizar como estímulos de aprendizaje sílabas sin sentido, de esta manera se evitaba que el sujeto empleara sus conocimientos previos en la tarea de memoria. Según Ebbinghaus el uso de material significativo provocaba asociaciones idiosincrásicas en cada sujeto, y por consiguiente "ruido" en el experimento. El procedimiento consistía en aprender una larga serie de palabras sin sentido (de 20 a 50) en un tiempo predeterminado y probar escribir todas las palabras posibles que se recordasen. La tarea se repite determinando diferentes tiempos entre el estudio y la prueba. La conclusión a la que llegó Ebbinghaus fue que el recuerdo se podía dividir en dos fases, una en la que el recuerdo caía rápidamente al aumentar el intervalo entre el estudio y la prueba, y otra fase después de esta caída, en que se alcanzaba un nivel

relativamente estable. A la primera fase le llamó memoria a corto plazo, y a la segunda memoria a largo plazo.

Esta acepción tomó más fuerza con Hebb (1949), quien sugirió la necesidad de asumir dos sistemas de memoria separables: uno a corto plazo, cuya base fisiológica estaría en la actividad de los circuitos neuronales reverberantes, y otro a largo plazo, que implicaría un cambio estructural permanente en el sistema nervioso. Y precisamente porque tal cambio requeriría de un tiempo considerable para producirse, planteó la necesidad de un sistema de memoria a corto plazo responsable de mantener la información mientras tanto (Hebb, 1949).

Los estudios realizados con el paciente H.M (este paciente sufría de una epilepsia intratable y se le sometió a una cirugía en donde se le extirparon gran parte de los lóbulos temporales incluyendo estructuras como el hipocampo); ofrecen un ejemplo para establecer la distinción entre memoria a corto plazo (MCP) y memoria a largo plazo (MLP):

El paciente H.M sufre de una amnesia anterógrada que le hace olvidar los sucesos de cada día con la misma rapidez con que suceden, reteniendo por otro lado, los viejos recuerdos. Sus habilidades lingüísticas son normales y su coeficiente intelectual se encuentra en la franja normal a normal-alto; sin embargo es incapaz de aprender los nombres o reconocer las caras de médicos o personas que lo visitan diariamente, lee una y otra vez las mismas revistas sin darse cuenta de que ya las ha leído. En cambio tiene una amplitud de dígitos normal, es decir es capaz de repetir una lista de 5 o 6 dígitos tan bien como cualquier otra persona normal. Cuando en una tarea de este tipo, la cantidad de dígitos no excede la capacidad de la memoria a corto plazo, H.M es capaz de repetir explícitamente los dígitos y mantenerlos durante varios minutos, sin embargo si la cantidad de dígitos supera su amplitud o si el tiempo es demasiado largo toda esa información se pierde.

El daño cerebral de H.M que no afecta a su memoria a corto plazo hace que sus sistemas de memoria a corto y largo plazo funcionen de un modo independiente, sin conexión entre ellos. La disociación entre MCP y MLP en H.M es evidente y

permite establecer una distinción que resulta fundamental para cualquier aproximación a los fenómenos de aprendizaje y memoria.

Ic. APRENDIZAJE Y MEMORIA

Rescorla y Holland (1982), señalaron un problema en el estudio de la memoria que había sido descuidado por la gran mayoría de las investigaciones: el problema de la expresión del aprendizaje. La observación de que en los condicionamientos pavlovianos la respuesta condicionada rara vez era idéntica a la respuesta incondicionada, llevaron a algunos autores (p. e. Rescorla, 1988) a postular que la expresión o evocación de las respuestas aprendidas era un proceso relativamente independiente del aprendizaje. No es difícil generar explicaciones para el descuido histórico de los temas de la expresión en el campo del aprendizaje animal. Ha habido por mucho tiempo en el campo de la psicología experimental una disposición para tratar al aprendizaje como inseparable de la respuesta usada para medirlo. La orientación estímulo-respuesta de Thordike patrocinó en gran medida esta distorsión, así como el positivismo lógico ortodoxo, opacando la distinción entre los experimentos, que necesariamente miden una respuesta particular a una estímulo particular, y las interpretaciones teóricas de lo que es aprendido, y por tanto del proceso distinto de evocación. De tal manera que el proceso tradicionalmente llamado aprendizaje, es en realidad una suma de varias fases.

El siguiente modelo permite formar un bosquejo acerca de la función temporal que atraviesa el continuo aprendizaje y memoria, donde la información entra al organismo en forma de estímulos que actúan sobre los sentidos. El organismo debe quedar relativamente intacto por un tiempo corto (minutos u horas, dependiendo del estímulo) para que ocurra una asociación entre el primer estímulo y un segundo (de origen interno o externo) y pueda así mantenerse por largos periodos (se consolide), después de lo cual casi ninguna alteración del organismo puede afectar que se evoque la respuesta (recuerdo). De tal manera que el proceso tradicionalmente llamado aprendizaje, puede ser concebido como una suma de varias fases (modificado de Atkinson y Shiffrin por Ormsby 1994):

- a) Adquisición, o aprendizaje propiamente dicho, en donde el organismo es expuesto a los cambios del medio físico que constituyen los estímulos que se asocian o son contingentes.
- b) Consolidación, en donde se activan mecanismos que permitan una cierta permanencia de la experiencia concreta recién percibida.
- c) Retención, fenómeno pasivo o activo por medio del cual el organismo es capaz de expresar en el tiempo los efectos del aprendizaje en varias ocasiones.
- d) Evocación, expresión de conductas determinadas por experiencias de aprendizaje anteriores. (Fig. 1.)

Las tres primeras fases del continuo no son en realidad observables, al menos en estado actual de su estudio, sin embargo son inferibles a partir de los diferentes efectos observados en la evocación de la respuesta.

La aceptación anterior, es vital en el estudio neurofisiológico de la memoria dado que gran parte de las manipulaciones se realizan durante alguna o algunas de las fases inferidas y no necesariamente antes del aprendizaje, además de que las manipulaciones experimentales previas al aprendizaje pueden estar afectando solo alguna (s) de estas fases y no el proceso íntegro y total (para una revisión de este problema ver Spear, et al., 1990).

Esta separación en fases no ha sido claramente marcada por la literatura, ni considera explícitamente los diferentes tipos de aprendizaje más complicados, y solo representa una propuesta que permite formular preguntas concretas de investigación incluyendo las realizadas en este trabajo.

TIEMPO

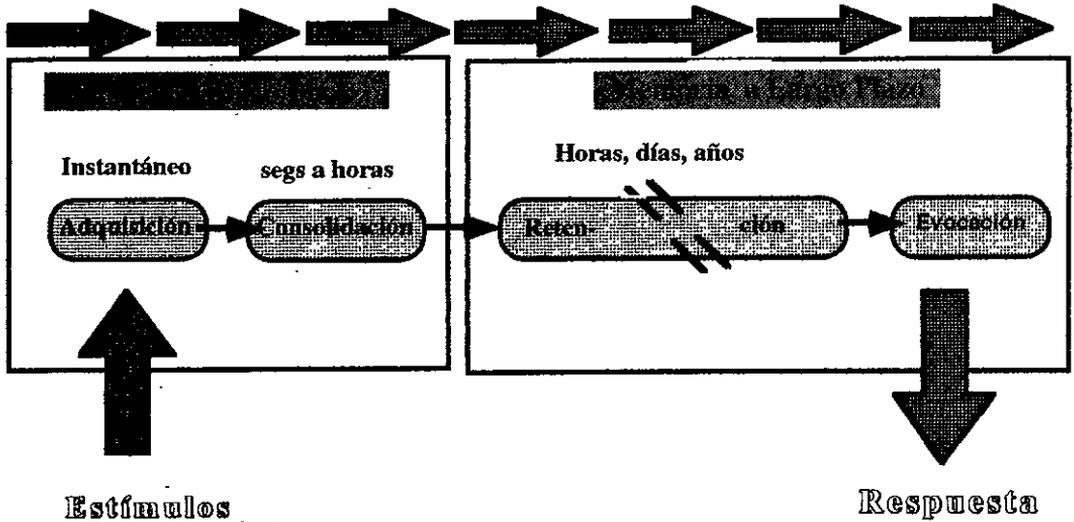


Fig 1. La figura muestra el continuo aprendizaje-evocación. En el lado izquierdo se muestran la adquisición (presentación de los estímulos) y la consolidación (retención por corto tiempo de ésta información, así como la transformación a memoria de largo plazo), que son las dos etapas que pertenecen a la memoria a corto plazo (MCP). A la izquierda se muestran la retención (mantener latente la capacidad de respuesta en el tiempo) y la evocación (la emisión de la respuesta ante los estímulos adecuados), ambas etapas de la memoria a largo plazo (MLP).

CAPITULO II

El sistema colinérgico y su papel en el Aprendizaje y la Memoria

En lo que se ha llamado "la década del cerebro" (1990-2000) se ha acumulado una gran cantidad de información que apunta hacia el sistema colinérgico como uno de los principales candidatos responsables de procesos superiores tales como el aprendizaje y la memoria. Este marcado interés por el sistema colinérgico, tiene sentido si se considera que en enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer; caracterizada por la pérdida progresiva de funciones cognitivas, se observa una disminución dramática de las neuronas del Núcleo Basal Magnocelular (NBM) (Christensen et. al., 1992) así como un decremento importante en la actividad de la colin-acetiltransferasa (ChAT) en el hipocampo y la corteza. De aquí el interés por el sistema colinérgico y la acetilcolina como el principal neurotransmisor utilizado por este sistema.

La idea de nuevas estrategias para el desarrollo de terapias que ayuden a resolver algunos tipos de enfermedades neurodegenerativas, surge al considerar al sistema colinérgico como el principal sustrato fisiológico en fenómenos como el aprendizaje y la memoria, aunado a que el decaimiento de dicho sistema como resultado del envejecimiento, provoca deficiencias en estas tareas cognitivas, (Bartus et. al., 1982; Coyle, et al., 1983).

Ila. Consideraciones anatómicas

A continuación se presenta un reconocimiento anatómico general de las áreas que forman parte del sistema colinérgico:

La disposición anatómica de los núcleos colinérgicos en el sistema nervioso central de mamíferos sugiere una actividad muy coordinada. En el cerebro de la

rata, las neuronas colinérgicas forman columnas continuas de células que se pueden clasificar en dos grandes grupos:

a) Estructuras estriadas, que comprenden los islotes de Calleja, el tubérculo olfatorio, el núcleo acumbens, el caudado putamen.

b) Estructuras del cerebro anterior basal (CAB), que a su vez se subdivide en rostral y caudal. La rama rostral incluye al núcleo septal medial y al núcleo de la banda diagonal (vertical). La rama caudal incluye al núcleo basal magnocelular, a la sustancia inominata y al núcleo del ansa lenticular, (Woolf, 1991), (Fig. 2).

En la corteza cerebral, las principales vías de proyección del CAB pueden dividirse en tres ramas (Sinden, et al., 1995):

La primera, la rama rostral, se origina en el núcleo septal medial y el brazo vertical de la banda diagonal de Broca, sus fibras ChAT-positivas en el cingulum, viajan caudalmente a través del fornix para inervar la formación hipocampal, así como las cortezas entorrinal y peririnal. Las células blanco de las neuronas colinérgicas en la formación hipocampal han sido quizás las mas estudiadas en el cerebro (Frotscher et al., 1992).

La segunda rama o vía media, inicia de una parte del brazo vertical, y del brazo horizontal de la banda diagonal, así como del área preoptica magnocelularis, inervando las cortezas cingulada y retrosplenial, además de ciertas estructuras allocorticales, particularmente el bulbo olfatorio, la amígdala, así como las cortezas insular* y piriforme.

Por último, la tercera rama del sistema colinérgico del CAB comprende una mayor extensión de proyecciones que inervan principalmente y por completo a la neocorteza.

*A diferencia de estas investigaciones, en nuestro laboratorio recientemente encontramos, por medio del trazador retrogrado Fluorogold, que la ubicación de las aferencias provenientes del CAB en la corteza insular, se originan principalmente del NBM, incluyendo a la sustancia innominata y al hipotálamo lateral (resultados no publicados).

En la región adyacente a la zona ventral del globus palidus, se observa un grupo de grandes células cuya fuerte actividad de colin-acetiltransferasa (ChAT) y

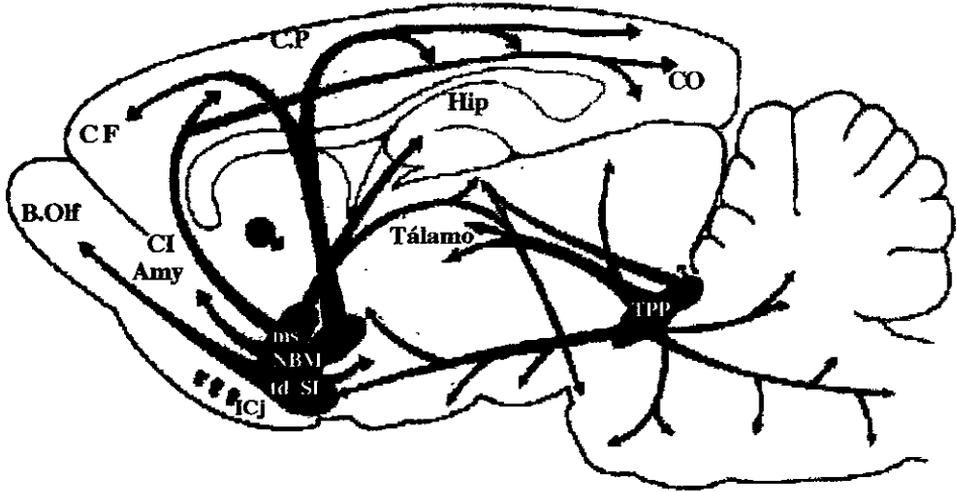


Fig. 2. Representación esquemática de los principales sistemas colinérgicos en el cerebro de mamíferos (modificado de Woolf, 1991). De las proyecciones de neuronas colinérgicas que se interconectan con estructuras centrales, han sido descritas dos ramas principales: a) el complejo colinérgico del CAB compuesto por neuronas positivas a ChAT en el núcleo septal medial (ms), el núcleo de la banda diagonal (td), substancia inominata (SI) y el núcleo basal magnocelular propiamente (NBM) y, b) el complejo colinérgico pontomesencefalotegmental compuesto por células inmunoreactivas a ChAT en el núcleo tegmental penduculopontino (TPP) proyectando ascendente al tálamo y a otros sitios diencefálicos. Otras abreviaciones: amígdala (Amy), corteza insular (CI), bulbo olfatorio (B.Olf), corteza frontal (CF), corteza parietal (CP), hipocampo (Hip), corteza occipital (CO), complejo de islotes de Calleja (ICj).

colinesterasa (ChE) les identifica como neuronas colinérgicas (Abdulla, et al., 1995).

La rama del CAB que inerva a la neocorteza de la rata se origina en los somas de neuronas ChAT-positivas del núcleo basalis, sustancia innominata y del núcleo del ansa lenticularis (denominados colectivamente Núcleo Basal Magnocelular, NBM). Este núcleo está localizado en la región ventromedial del globus pallidus, compuesto por un gran número de neuronas multipolares de las cuales el 70-80% son colinérgicas.

Sus proyecciones ascendentes se dirigen principalmente a la corteza frontal y a la neocorteza parietal. Otras proyecciones van a la amígdala, (Ambrogi-Lorenzini, et al., 1994). La estructura equivalente al NBM en el cerebro humano se llama Núcleo Basal de Meynert por ser él el primero en describirlo como un grupo disperso de neuronas que descansa en posición ventral al estriado y al globo pálido.

IIb. El NBM y algunas funciones cognitivas

Un número de evidencia apunta hacia los somas colinérgicos del NBM como los principales responsables de la inervación colinérgica hacia la neocorteza y otras regiones del cerebro que se ha visto están involucradas de alguna manera con funciones cognitivas. (Everitt, et al., 1988; Mandel, et al., 1989; Wainer, et al., 1990; Butcher, et al., 1992; Bronzetti et al., 1993).

Más evidencia proveniente de estudios farmacológicos ha revelado que compuestos que bloquean reversiblemente los receptores muscarínicos (compuestos anticolinérgicos) tales como la atropina y la escopolamina o la lesión de los sistemas colinérgicos del sistema nervioso central, producen alteraciones que interfieren dramáticamente en la adquisición y ejecución de tareas de aprendizaje, tales como la prevención pasiva (Prado-Alcala et al., 1978; Bermúdez-Rattoni et al., 1985). Se sabe también que en animales normales agentes que inhiben la acetilcolinesterasa (agonistas colinérgicos) tales como la fisostigmina

facilitan la ejecución de tareas de aprendizaje y memoria, y pueden incluso revertir algunos de los efectos de lesiones del cerebro basal, (Murray et al., 1985; Aigner et al., 1987).

Si se intenta hacer un estudio mas detallado del vínculo existente entre el sistema colinérgico y las funciones de aprendizaje y memoria, nos encontraremos ante un problema de inespecificidad. Con esto quiero decir que hay bases suficientes para sugerir que está involucrado en procesos de aprendizaje, pero el papel que esta jugando el sistema colinérgico cortical en los mecanismos de retención o evocación (memoria), es menos conocido.

Recientemente se ha propuesto que la proyección basalocortical podría estar jugando un papel importante únicamente en los estadios iniciales del proceso de aprendizaje (Durkin, et al., 1992). En favor de esta propuesta, se ha observado que la duración de la activación colinérgica cortical disminuye progresivamente a medida que aumenta el numero de entrenamientos durante la prueba y el correspondiente aumento en el desempeño de la misma en modelos de laberinto radial. La extensión lógica de este proceso implicaría la existencia de un momento en el que la intervención del sistema colinérgico podría no ser requerida durante el proceso de evocación (Durkin, 1994; Durkin et al., 1992).

Mas evidencia a favor de esta propuesta son los estudios realizados por Tang (Tang, et al., 1996; Tang et al., 1997) en monos, en donde la adquisición y almacenamiento de una tarea (ver apéndice 1) dependen de la activación colinérgica de receptores muscarínicos localizados específicamente en el área perirhinal. Observaciones análogas se han reportado en experimentos con administración sistémica de escopolamina, en los cuales se ha observado un efecto decreciente dependiendo de si el tratamiento se lleva a cabo en las etapas iniciales o finales del programa de entrenamiento en el laberinto radial (Toumane, et al., 1993). Esta sensibilidad diferencial al bloqueador muscarínico sugiere que el sistema colinérgico deja de participar una vez que se ha aprendido la tarea en cuestión.

En recientes trabajos (Aigner, et al., 1991) se ha reportado que la administración de escopolamina previa a la adquisición de una tarea¹, impide su posterior ejecución; no así la administración después de la adquisición. Esto sugiere fuertemente que la escopolamina esta interfiriendo en la adquisición y almacenamiento de ésta tareas, pero no en la evocación de la misma.

Nuestros datos concuerdan con datos previos del laboratorio basados en experimentos de transplantes de corteza fetal en animales previamente lesionados de la corteza insular. En estos experimentos se observó que los transplantes corticales inducían el recuerdo de condicionamientos previamente adquiridos lo cual entre otras cosas significaría que la traza de memoria (engrama) no se encuentra localizada en la región insular, lo cual a su vez implica que probablemente la corteza insular se halla involucrada en la salida de la información almacenada en alguna otra parte del cerebro. Por otra parte estos transplantes inducen también la recuperación de la capacidad de aprender nuevas conductas.

Si bien muchos estudios reportan deficiencias en el aprendizaje y/o la memoria en animales que fueron lesionados o manipulados farmacológicamente en el cerebro basal, afectando principalmente neuronas colinérgicas, no existe sin embargo un acuerdo sobre los mecanismos fisiológicos subyacentes a las deficiencias observadas y aún se desconocen los mecanismos mediante los cuales la aferencia colinérgica basalocortical promueve o regula las funciones de aprendizaje y/o memoria.

Queda aún por establecer si las pérdidas observadas en el aprendizaje y/o memoria, se deben a alteraciones sensoriomotoras o disfunciones en la atención, quizás provocadas por la interrupción de la actividad moduladora del sistema colinérgico del CAB. Tampoco se puede despreciar la posibilidad de que las deficiencias cognoscitivas sean el resultado de la pérdida de otras inervaciones

¹ Selección diferida no correspondiente a la muestra, (delayed nonmatching-to-sample; DNMS)

colinérgicas del CAB que no se dirigen directamente a la corteza, como el caso de la amígdala y el tálamo (Björklund, et al., 1995).

Es muy probable que además del sistema colinérgico otros sistemas estén jugando un papel importante en los fenómenos de aprendizaje y/o memoria. Recientes hallazgos sugieren que el cerebelo podría estar mediando algunos procesos cognitivos y perceptuales, (Leiner et al., 1993; Allen et al., 1997). Mas específicamente se ha reportado una activación del cerebelo lateral durante la adquisición y discriminación de información sensorial. (Gao, et al., 1996). Esta aceptación rompe con la idea general de que la función de dicha estructura, esta restringida al control motor.

CAPITULO III

Tres paradigmas conductuales

Algunos paradigmas conductuales que se han empleado para estudiar el aprendizaje y la memoria en nuestro laboratorio, son la Prevención Pasiva (PP), el laberinto de agua de Morris (Morris Water Maze) y el condicionamiento aversivo a los sabores (CAS).

IIIa. Prevención Pasiva

La tarea de prevención pasiva consiste en introducir al animal en una caja que se encuentra dividida en dos compartimentos, uno claro (iluminado) y el otro oscuro (sin iluminación) que además contiene un piso de metal a través del cual se le puede administrar una descarga eléctrica al animal provocando así la evitación al lado oscuro.

La tarea de prevención pasiva es un claro ejemplo de condicionamiento clásico donde podemos identificar al estímulo incondicionado (EI) como la descarga eléctrica, que provoca una respuesta (respuesta incondicionada, RI) en este caso es la piloerección, la inmovilización por unas fracciones de segundo y la subsiguiente huida; que al ser pareado con otro estímulo (estímulo condicionado, EC) en este caso el lado oscuro, que por sí solo no produce una respuesta aversiva, (sino que de hecho los animales prefieren por ser fotofóbicos), produce una respuesta similar a la RI, denominada respuesta condicionada (RC).

Este procedimiento se explica más detalladamente en la parte de materiales de este trabajo.

IIIb. Laberinto de Agua

El laberinto de agua de Morris ó "water maze" se utiliza para evaluar algunos procesos mnemicos en roedores. Una característica que resulta ventajosa en esta tarea es que los animales no tienen que estar privados de agua o alimento para estar motivados y aprender la tarea.

La tarea consiste en poner a nadar al animal en un estanque circular (laberinto) que contiene agua fría. Cabe mencionar que los roedores son excelentes nadadores y que se encuentran motivados a escapar del agua debido a que su tamaño pequeño los pone en peligro de perder temperatura corporal rápidamente si permanecen por mucho tiempo dentro del agua.

El laberinto se subdivide en cuatro cuadrantes (imaginarios) de manera arbitraria. Para poder escapar del estanque con agua, los animales deben encontrar una plataforma (blanco) que se encuentra oculta en uno de los cuadrantes dentro del estanque con agua. Al principio del entrenamiento los animales logran escapar del agua porque encuentran azarosamente la plataforma. Con el transcurso de los ensayos aprenden a identificar la posición de la plataforma dentro del estanque, disminuyendo así el tiempo (latencia de escape) que requieren para encontrar la plataforma.

Este procedimiento tiene la ventaja de que se requiere de pocos ensayos para que el animal aprenda la tarea (Morris, 1984; Brandeis et al., 1989), y se pueden modificar algunos elementos como el lugar de la plataforma, eliminar la plataforma por completo, o bien introducir claves espaciales para el estudio de distintos procesos de memoria. Así por ejemplo se puede probar la memoria de referencia si se deja la plataforma en una posición permanente durante todos los ensayos; o bien memoria de trabajo si se cambia el sitio de la plataforma cada ensayo.

En la primera mitad de este siglo Tolman (1948), sugirió que los animales tienen la capacidad de hacer mapas de su entorno y después "navegar" en él utilizando la información de estos mapas. Por ejemplo si una rata es entrenada en un laberinto

a cruzar un espacio desde el extremo sur hasta el extremo norte, y un tiempo después es colocada en la posición oeste, el animal es capaz de viajar al extremo correcto (norte) aunque jamás haya sido entrenado en esa ruta.

Las teorías de condicionamiento clásico y operante no pueden explicar estos fenómenos. Parece ser que los animales tienen la habilidad de formar mapas de su entorno que puedan utilizar posteriormente en situaciones novedosas. Estos mapas se pueden formar extraordinariamente rápido incluso con un solo ensayo, lo que sugiere que en algunas ocasiones no son formados en un procedimiento de ensayo tras ensayo, sino como una conexión neural específica de procesos cognitivos, (Tolman, 1948).

IIIc. Condicionamiento Aversivo a los Sabores

Un modelo que se ha estudiado intensamente desde finales de lo 60s porque representa un modelo muy apropiado para el estudio de mecanismos de aprendizaje y memoria es el condicionamiento aversivo a los sabores (CAS) que consiste básicamente en la presentación de un sabor seguido por un malestar o envenenamiento, con lo cual se consigue que los animales eviten ingerir sustancias que tengan ese sabor.

En 1955 John García investigaba los efectos de radiaciones en la conducta de ratas. Los animales eran expuestos a radiaciones gamma por periodos de 8 horas. El grado de radiación era suficiente para provocar un malestar temporal, que como resultado ocasionaba un decremento importante en el consumo de agua y comida durante la prueba. Después de las sesiones los animales eran devueltos a sus cajas y eventualmente el consumo de comida y agua volvía a la normalidad. Sin embargo unos días después los animales fueron llevados nuevamente a la situación de prueba y aunque no había radiación alguna, los animales se rehusaron a beber. Los bebederos en las cajas donde se realizaba la prueba estaban hechos de plástico, mientras que los de las cajas "habitación" eran de vidrio. Posteriores estudios demostraron que el agua de los bebederos de plástico tenía un sabor ligeramente

distinto que el de los bebederos de vidrio, que los animales habían aprendido a evitar.

García y sus colegas sospecharon que se encontraban ante un ejemplo de condicionamiento clásico en donde un sabor en particular era evitado después de ser pareado con la radiación y por tanto con el malestar.

En posteriores experimentos hechos por el mismo García (García, et al., 1966) el animal era expuesto a beber agua con sacarina (nunca antes probada) y después recibían una inyección de algún emético que les producía náusea en cuestión de minutos. Para distintos sujetos el intervalo entre la ingesta y la inyección variaba de 5 a 22 minutos y aun así, todos los animales expuestos posteriormente a la sacarina se rehusaron a beber. Ahora se sabe que el intervalo entre la ingesta del agua con sacarina (o cualquier sabor) y la inyección, puede ser de varias horas, y aun así, encontrar el fenómeno de aversión.

Para entonces empezó a llamar la atención el hecho de que bastara un solo pareamiento para producir una respuesta robusta y que la aversión persistiera aun cuando el intervalo entre la presentación del sabor y del malestar fuera de varias horas. El problema consistía en que estas peculiaridades no cabían en el marco teórico de aprendizaje que prevalecía entonces.

Si revisamos el paradigma pavloviano (Fig. 3), de condicionamiento clásico, un estímulo (estímulo incondicionado EI) que elicitaba una respuesta (respuesta incondicionada RI) es pareado con otro estímulo (estímulo condicionado EC) que no provoca la RI. Los dos estímulos son pareados de tal manera que sean contiguos y que el EC pueda proveer información acerca del EI (Pavlov, 1927/1994). El aprendizaje se puede inferir cuando la presentación del EC produce una respuesta similar a la RI, denominada respuesta condicionada (RC).

Tradicionalmente se ha considerado al CAS como un ejemplo de condicionamiento clásico, aunque no cabe dentro del modelo de cuatro variables

descrito por Pavlov. En este caso el EC es por definición el sabor de algo que el sujeto come o bebe. En la mayoría de los casos la comida o bebida es algo que el sujeto no ha probado antes es decir es un estímulo novedoso; después de comer o beber el sujeto recibe una inyección de algún veneno (el EI) que lo hará sentir enfermo. Varios días más tarde, una vez que el sujeto se ha recuperado totalmente, se le expone nuevamente a la sustancia que fungió como EC. El resultado es que el animal consume poco o nada de lo que se le dió a ingerir. Es así como la medida del condicionamiento es el grado en que el sujeto evita el alimento (la RC). Pero como resulta evidente, no existe un cuarto componente que en este caso es una RI identificable.

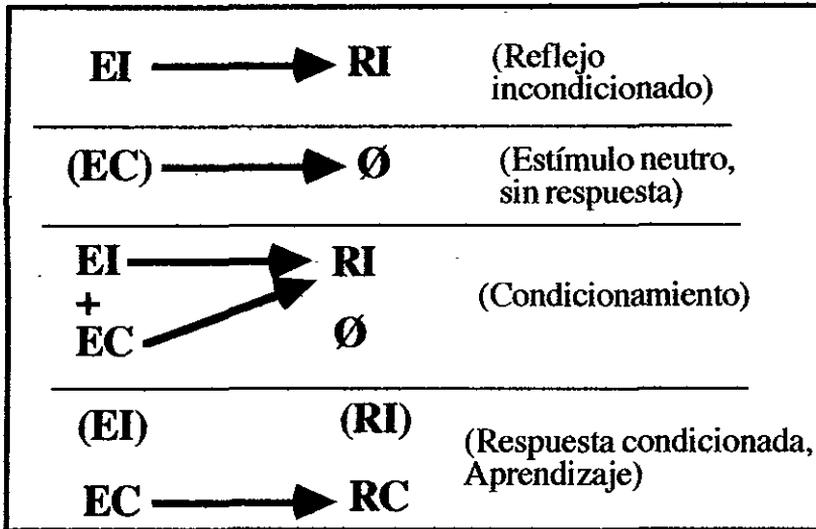


Fig. 3. Esquema representando el proceso del condicionamiento clásico, descrito por [Pavlov, 1927, 1994]. Se comienza con un estímulo incondicionado (EI) que produce un reflejo o respuesta incondicionada (RI). Por otro lado, hay un estímulo neutro que no produce la RI, y que es el que será después del condicionamiento el estímulo condicionado (EC). El condicionamiento consiste en presentar contingentemente ambos estímulos varias veces, lo que produce que eventualmente el EC produzca una respuesta condicionada (RC) muy similar a la RI (para una discusión ver el apartado Ic. p. 7).

Uno de los primeros problemas que se tuvo que resolver fue la idea de que quizá la evitación que el animal hace de la comida se deba a su reciente enfermedad, es decir había que establecer si existía o no una relación específica entre el alimento y la enfermedad. La forma en que se descartó esta idea fue incluir dos grupos de sujetos: un grupo experimental cuyos sujetos recibían un pareamiento de la comida y el veneno y un grupo control al que solo se le administro el veneno. En las pruebas subsecuentes se observó que los sujetos control consumen grandes cantidades de dicha comida, mientras que los sujetos experimentales no lo hacen y así se puede atribuir esta diferencia entre los grupos al pareamiento de la comida y el veneno en el grupo experimental. En estos estudios se encontró que los sujetos experimentales efectivamente consumen menos de la comida de prueba que los sujetos control. (García, et al., 1972).

El condicionamiento aversivo a los sabores ha recibido especial atención por varias razones:

Como ya se mencionó, se ha sugerido por algunos psicólogos que el CAS no es un ejemplo común de condicionamiento clásico, debido a que transgrede algunos de los principios generales que se aplican a la mayoría de los ejemplos.

La aversión al sabor a menudo se desarrolla después de un solo ensayo de condicionamiento y dicha rapidez resulta ventajosa para algunas cuestiones teóricas.

La aversión al sabor es algo que mucha gente experimenta al menos una vez en la vida. Esta aversión se puede desarrollar aunque la persona este segura de que la comida no fue la causa de su posterior enfermedad y puede durar toda la vida.

Aunque se ha aceptado conceptualizar a este paradigma con solo las tres variables evidentes, se han postulado soluciones para obtener una conceptualización más adecuada:

En diversos estudios, Chambers (1990) analiza minuciosamente la situación de aprendizaje en particular en el CAS: concluyó que los estímulos gustativos

pueden provocar respuestas conductuales antes de la absorción del alimento, además de las respuestas fisiológicas tales como salivación y secreción de insulina. Los sabores preferidos, tales como el dulce, provocan respuestas de consumo incrementadas, y los sabores evitados o menos preferidos, tales como el amargo, evocan respuestas de consumo decrementadas, y una disminución en las visitas al comedero (Rozin, 1967). Estudios hechos por Grill y Norgren (1978) reportan respuestas conductuales a estímulos gustativos más complejos. Ante los estímulos dulces los animales mostraban movimientos rítmicos de la mandíbula con protrusiones y retracciones de la lengua resultando en una mayor ingesta. Ante los estímulos amargos, en cambio, las protrusiones de la lengua eran mas largas y las retracciones se llevaban a cabo con la mandíbula casi cerrada, lo que producía que el líquido se vertiera fuera de la boca y que por ende hubiera una menor ingesta. Cuando los animales sufrían malestar después del consumo de una sustancia, se podían apreciar las conductas características de cuando degustaban un sabor amargo.

Lo que distingue al CAS de otras formas de condicionamiento clásico es el hecho de que la RC (la evitación al sabor) es parte del repertorio de conductas elicidadas por el EC en este caso el sabor. Y aunque la respuesta es apropiada al EI en el hecho de que la enfermedad provoca una disminución en la ingesta, el decremento en la ingesta es específica al EC.

La RC no es similar a la respuesta elicitada por el EC, (de hecho es opuesta), de ahí que el papel del EI sea también diferente para el caso particular del CAS. El EI no actúa como el facilitador de lo que será la RC. En su lugar cambia la respuesta elicitada por el EC de una (ingestiva) a una (aversiva), (Chambers, 1990).

En 1990 el mismo García (García, 1990), hace una propuesta para resolver el problema. (Fig. 4). En esta hace una reevaluación del planteamiento pavloviano original. En este planteamiento el estímulo incondicionado juega un doble papel:

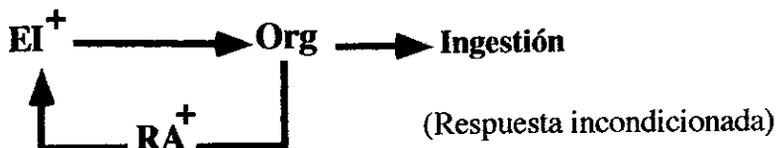
- En primer lugar es un estímulo a ser asociado con otro, el EC, formando la diada EC-EI.

- En segundo lugar se asocia con un factor llamado retroalimentación (RA) formando la diada EI-RA.

El último factor es una propuesta novedosa a la teoría del aprendizaje, que intenta llenar las dos brechas teóricas destacadas por Skinner (1989) en donde afirma que en cualquier descripción conductual tiene dos caminos: una entre la acción estimuladora del ambiente y la respuesta del organismo, y otra entre las consecuencias y el cambio conductual resultante.

En esta propuesta que hace García, el primer vacío teórico correspondería a la diada EC-EI y el segundo vacío teórico sería el EI-RA. La retroalimentación consiste en todos los fenómenos fisiológicos y neurales derivados de la presentación del EI, lo cual produce una transposición del valor hedónico que tenía el EI originalmente, en el caso del condicionamiento aversivo al sabor el estímulo sávido es el EI (a diferencia de la propuesta anterior, en la que el sabor es el EC), con una RI consumatoria; al presentarse después del malestar gástrico (RA) el sabor sufre un cambio en su valor hedónico convirtiéndose de agradable a aversivo, de tal manera que al volverse a presentar el sabor la RI habrá cambiado a una evitación (RC).

(A)



(B)

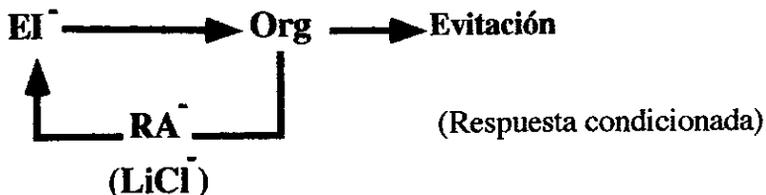


Fig. 4. Esquema del condicionamiento de condicionamiento aversivo al sabor propuesto por [García, 1990]. A) En este caso un estímulo sávido incondicionado (EI) actúa sobre el organismo (**Org**) el cual al no tener consecuencias produce una retroalimentación con valor hedónico positivo (RA^+) y la ingestión. B) Si después de la presentación del EI este tiene consecuencias, en forma de una retroalimentación negativa tal como un malestar gástrico inducido por cloruro de litio, que actúe sobre el EI cambiándole el valor hedónico, la respuesta subsiguiente será en sentido contrario al que se venía presentando.

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS

Existe aún un importante debate acerca de los diferentes sistemas y/o estructuras que están involucrados en la mediación de procesos como lo son la adquisición de nuevas conductas, y el almacenamiento y evocación de las mismas. La evidencia hasta ahora encontrada a este respecto no resuelve (o resulta contradictoria) un problema medular:

¿Los procesos de adquisición y de evocación se encuentran regulados principalmente por un solo sistema que resulta ser el mismo para ambos fenómenos, o por el contrario son sistemas separados los que están mediando cada uno de los procesos?

Como ya se mencionó, se ha demostrado que la reducción de la actividad colinérgica cortical, relacionada con el daño de las neuronas del sistema colinérgico del cerebro anterior basal (CAB), en particular el núcleo basalis magnocelularis (NBM), tiene un papel preponderante en el deterioro cognoscitivo asociado con la demencia (Nitsch, et al., 1994).

A pesar de los numerosos estudios sobre el tema, que sugieren que la participación del neurotransmisor acetilcolina (ACh) es importante en el mantenimiento de las funciones cognitivas normales, no se ha podido dilucidar si la ACh es imprescindible para el aprendizaje y/o la memoria; tampoco está claro hasta qué grado las deficiencias observadas después de las lesiones del NBM puedan ser atribuidas exclusivamente a pérdidas de funciones cognitivas (Björklund et al., 1995).

Con el fin de probar el posible papel diferencial que está jugando el sistema colinérgico y el NBM en el proceso de aprendizaje (ver definición apartado la. p. 2) y en el proceso de evocación (memoria) de nuevas conductas se llevaron a cabo los siguientes experimentos:

Se dividió aleatoriamente a los animales en dos grupos:

- 1) El primer grupo sirvió para probar los procesos de memoria (evocación de la conducta). En este caso el animal recibió el entrenamiento conductual, después la lesión, y por último la prueba conductual.
- 2) El segundo grupo sirvió para probar los procesos de aprendizaje (adquisición de la conducta). En este caso los animales recibieron primero la lesión, después el entrenamiento conductual y por último la prueba.

En ambos grupos se incluyeron a su vez 3 grupos: el grupo de lesión (NBM); un grupo de lesión falsa (Sham) para descartar la posibilidad de que los efectos observados fueran debidos a la sola manipulación quirúrgica y no a procesos específicos del área lesionada; y por último un grupo control quirúrgicamente intacto que sirvió para observar los efectos conductuales que tuvieron las manipulaciones experimentales en el animal íntegro.

Así mismo se realizaron dos experimentos, (cuadro 1):

Experimento 1: Todos los animales fueron sometidos a la tarea de condicionamiento aversivo a los sabores tanto para la evaluación de los procesos de memoria, como para el de aprendizaje. Así mismo los animales se sometieron a la tarea de prevención pasiva, evaluándose exclusivamente procesos de memoria (evocación).

Experimento 2: Todos los animales fueron sometidos a la tarea de laberinto de agua, tanto para la evaluación de los procesos de memoria, como para el de aprendizaje. Así mismo los animales se sometieron a la tarea de prevención pasiva, evaluándose exclusivamente procesos de aprendizaje (adquisición).

CUADRO 1:

EXPERIMENTO 1

ADQUISICION	LESION	PRUEBA
CAS (SACARINA)	X	CAS (SACARINA)
PREVENCION PASIVA	X	PREVENCION PASIVA
LESION	ADQUISICION	PRUEBA
X	CAS (SALINA)	CAS (SALINA)

EXPERIMENTO 2

LESION	ADQUISICION	PRUEBA
X	LABERINTO DE AGUA	LABERINTO DE AGUA
X	PREVENCION PASIVA	PREVENCION PASIVA
ADQUISICION	LESION	PRUEBA
LABERINTO DE AGUA	X	LABERINTO DE AGUA

V. METODO

Va. Sujetos

Se utilizaron 72 ratas macho de la cepa Wistar provenientes del bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, de aproximadamente 5 meses de edad de un peso que osciló entre 290-310gr. al principio de los experimentos. Todos los animales fueron mantenidos en cajas-habitación individuales de Plexiglas con agua corriente y comida (Purina Rodent Lab Pellets) ad libitum excepto cuando fue indicado en el protocolo. Los animales se mantuvieron en un ciclo de luz oscuridad 12:12.

Vb. Materiales

En la tarea del condicionamiento aversivo a los sabores se utilizaron como bebederos probetas graduadas de plástico de 50 ml con tapón de hule y pipeta de metal. Las sustancias que se utilizaron fueron sacarina sódica (2,3-Dihidro-3-oxobenzisulfonazol) de Sigma Chem. Co.; cloruro de sodio (NaCl), y cloruro de litio (LiCl) ambos de Baker Analyzed.

Para la tarea de prevención pasiva se utilizó una caja de acrílico de 25X25X70 cm, dividida en dos compartimentos por una puerta corrediza. Un compartimento (el claro) fue iluminado de manera indirecta por un foco de 60W, el otro compartimento (el oscuro) no contó con ninguna fuente de iluminación, y el piso de esta última estaba compuesto por dos bases metálicas conectadas a un simulador eléctrico.

Para la tarea del laberinto de agua, se utilizó una tina de metal galvanizado (90cm de altura X 120 de diámetro) pintada de negro, dividida en cuatro secciones o cuadrantes. En uno de los cuadrantes se colocó una plataforma de acrílico transparente (10 cm X 10 cm de área X 30 cm de altura desde el piso del laberinto). El laberinto se llenó de agua 2 centímetros por arriba de la plataforma.

El agua se reguló a una temperatura de aproximadamente 22 °C y la ejecución del laberinto fue filmada con una cámara ubicada por arriba del estanque. La señal se llevó a un convertidor analógico digital conectado a una computadora Lanix 386. Los datos se procesaron a través de un analizador de imágenes CROMOTRACK (San Diego Ins).

Vc.Lesiones

Para producir las lesiones se anestesiaron a los animales con una dosis de 70 mg/kg. de pentobarbital sódico, se fijó la cabeza del animal al aparato estereotáxico y se le practicó una incisión longitudinal de aproximadamente 2.5 cm, se separó el tejido para descubrir el cráneo y permitir la localización de Bregma como el punto de referencia para referirse entonces a las coordenadas estereotáxicas en que se halla el Núcleo Basal Magnocelular las cuales son (Paxinos, et al., 1982):

- 7.0mm. en el plano Dorsoventral (DV),
- ±2.8mm. en el plano Lateral (L) y,
- 0.8mm. en el plano Anteroposterior (AP).

Con el fin de reducir el índice de mortandad en los sujetos lesionados, ya que en experimentos preliminares se había observado que las inyecciones bilaterales en el mismodía provocan una reducción importante en el peso del animal y la sucesiva muerte del mismo: se llevó a cabo primero en todos los casos la lesión en el NBM izquierdo, y siete días después (permitiendo así la recuperación), la lesión en el NBM derecho.

La lesión fue inducida mediante la inyección de 0.5µl de una solución de 10.0µg/µl de NMDA a través de una aguja dental estereotóxicamente colocada en las coordenadas correspondientes.

Las lesiones inducidas por NMDA tienen la propiedad de lesionar preferencialmente los cuerpos celulares dejando la mayoría de las fibras de paso

intactas (Jonson, 1980), lo que permite que los efectos observados puedan ser atribuidos con mayor seguridad a funciones específicas del área lesionada.

Adicionalmente estudios de lesiones en el NBM con NMDA a partir de los 10 días postoperación, han reportado una ejecución normal en una serie de pruebas conductuales sensoriomotoras, cuando con otros métodos de lesión no se observa la misma recuperación, (para discusión ver Olton, et al.,1987; Wenk, et al., 1987).

VI. EXPERIMENTO 1

En este primer experimento se estudiaron las tareas de condicionamiento aversivo a los sabores, tanto para el grupo de memoria como para el de aprendizaje; y la tarea de prevención pasiva solo para el grupo de memoria.

VIa. Procedimiento

Para la tarea de CAS los animales fueron divididos en dos grupos, con 20 animales cada uno al inicio del experimento, el primer grupo fue para estudiar el papel que estaba jugando el sistema colinérgico y el NBM en tareas de memoria, el segundo grupo fue para estudiar el papel en tareas de aprendizaje.

Para la tarea de Prevención Pasiva, todos los animales fueron considerados para el grupo de memoria.

VIb. CONDICIONAMIENTO AVERSIVO A LOS SABORES

Grupo Memoria

Una descripción esquemática del procedimiento experimental, se muestra en la Fig. 5.

Los animales intactos fueron sometidos a un régimen restringido de agua, que consiste en el retiro de los bebederos y la presentación dos veces al día de las probetas graduadas con 50 ml. de agua destilada. La primera presentación se realizó por las mañanas y la segunda por las tardes. Ambas eran llevadas a cabo en la caja-habitación de los animales por un periodo de 10 min. cada una, y al final de la primera presentación (la de la mañana) se tomó el registro del consumo con una precisión de ± 0.5 ml. Este procedimiento se repitió por 7 días obteniéndose así un valor de línea base de consumo de agua. El octavo día fue el día del entrenamiento, que consiste en la sustitución del agua destilada por una solución

al 0.1% de sacarina durante 10 min., y registrando el consumo. Veinte minutos después los animales fueron inyectados intraperitonealmente con una solución 0.15 molar de LiCl en una dosis de 7.5 ml/kg de peso. La inyección de la solución del LiCl produce en los animales una irritación gástrica, confirmada por una respuesta emética y una contracción abdominal inmediatamente después de la inyección (Braun, et al., 1982). Siete horas después de la inyección se regresó a condiciones ad libitum de agua. (Fig. 6).

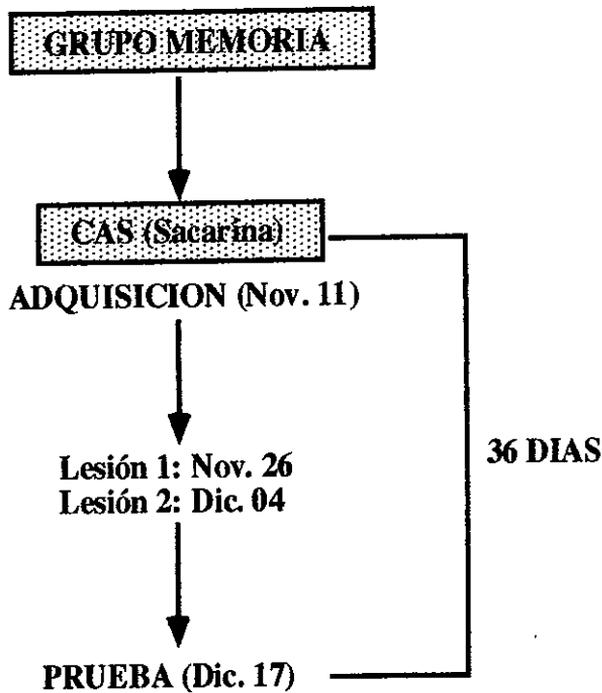


Fig. 5. Esquema del procedimiento del Condicionamiento Aversivo a los Sabores para el grupo de memoria

CONDICIONAMIENTO AVERSIVO A LOS SABORES

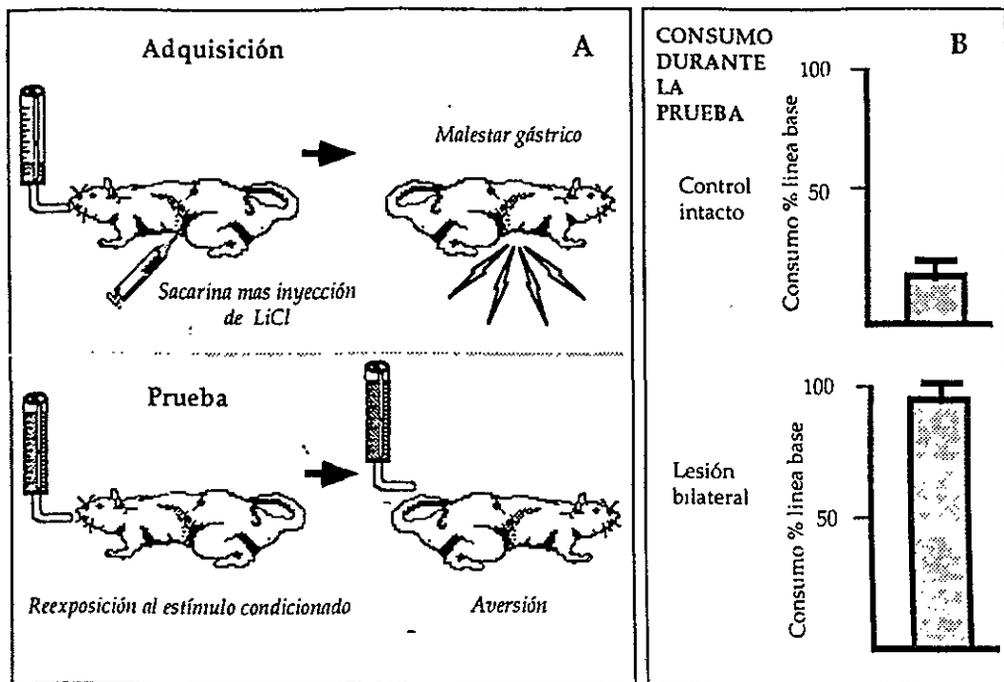


Fig. 6. Esquema del procedimiento del condicionamiento aversivo a los sabores. La parte superior de la figura A muestra la fase de adquisición y en la parte inferior la de evocación. La figura B describe un ejemplo de los resultados esperados entre animales lesionados y controles.

Con el fin de realizar la prueba de retención del condicionamiento aversivo al sabor que consiste en la presentación a los animales en la sesión matutina, de las probetas graduadas con la solución de sacarina; todos los animales fueron sometidos cinco días antes de la prueba al régimen restringido de agua destilada en las dos presentaciones diarias registrándose su consumo.

Vic. Grupo Aprendizaje

En este caso el procedimiento fue básicamente el mismo con tres diferencias principales: (Fig. 7)

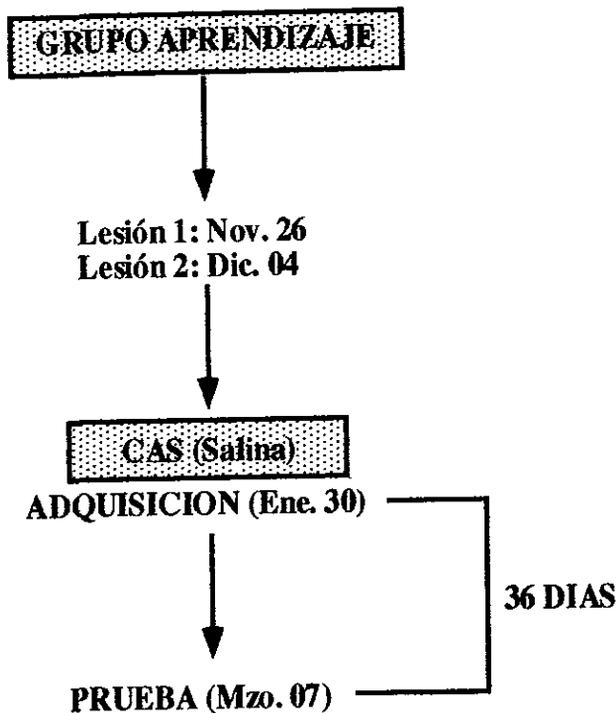


Fig. 7. Esquema del procedimiento del Condicionamiento Aversivo a los Sabores para el grupo de aprendizaje.

- Los animales habían recibido previamente las lesiones en el NBM.
- El día del entrenamiento la sustitución del agua destilada fue por una solución al 0.15 molar de Cloruro de Sodio (NaCl) la cual se ha reportado produce un incremento en el consumo de ratas intactas y sin experiencia a tal sabor (Braun, et al., 1982).
- El día de la prueba la solución de agua destilada fue sustituida también por la solución salina.

VI. PREVENCIÓN PASIVA

Grupo Memoria

Una esquematización del protocolo experimental está representado en la Fig 8. La tarea fue modificada de su versión original (McGaugh, et al., 1988), para este experimento. En esta tarea se empezó colocando al animal intacto en el compartimento claro por 20 seg. con la compuerta divisoria cerrada, transcurridos los 20 seg. se abrió la puerta permitiendo que el animal cruzara al lado oscuro, registrando el tiempo que tardaba en cruzar. En el momento en que la rata posó las cuatro patas en el interior del compartimento oscuro, se cerró la compuerta y se le administró un choque eléctrico de 0.7 mA durante 3 seg. abriendo después la compuerta para permitir el paso del animal al lado claro. En caso de que el animal no escapara de inmediato, se le aplicaría un segundo choque. Cuando éste regresaba al lado claro la compuerta se cerraba dejando al animal por otros 20 segundos; al término de este tiempo, la compuerta se abría nuevamente, repitiendo la operación descrita las veces que fuera necesario (típicamente basta solo un ensayo) para que el animal no cruzara al lado oscuro durante un periodo de 80 seg. , tras los cuales se cerraba la compuerta y se retiraba al animal. (Fig. 9).

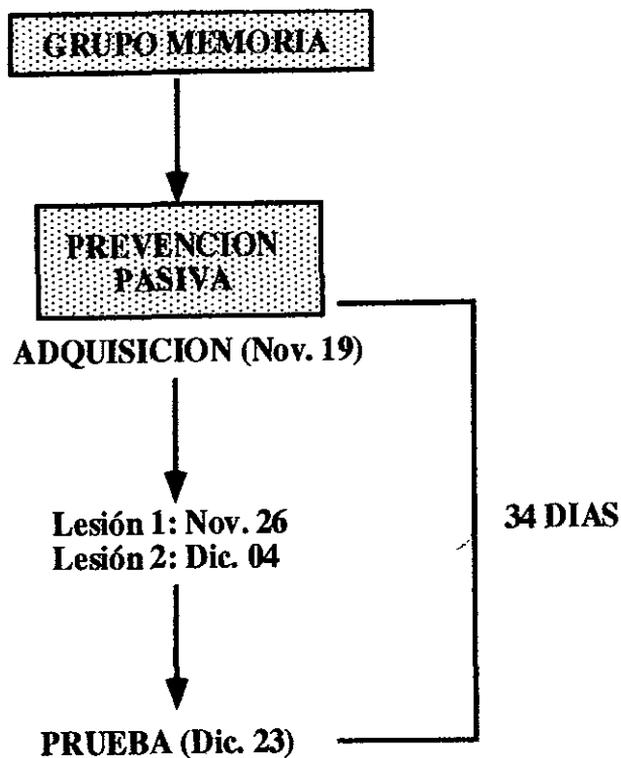


Fig. 8. Esquema del procedimiento de la Prevención Pasiva para el grupo de memoria.

Vle. Histologías

Al término de los experimentos, todos los animales fueron divididos en dos grupos:

1. Régimen farmacohistoquímico diisopropylfluorophosphato colinesterasa: (DFP-Colinesterasa):

- 1.8 mg de DFP por kilogramo de peso administrada intramuscularmente, dos horas antes de perfundir al animal.

Perfusión:

Los animales fueron anestesiados con una dosis letal de pentobarbital sódico, abriéndoseles la cavidad torácica inmediatamente después del paro respiratorio, para exponer el corazón. Se cortó la circulación de la vena cava descendente, se insertó una aguja de perfusión en el ventrículo izquierdo, y se realizó una incisión en la aurícula derecha. Se permitió entonces el flujo de la solución salina hasta sustituir al fluido sanguíneo, cambiando en ese momento, el flujo por la solución fijadora de paraformaldehído. Este último fija la membrana celular para impedir que cambios osmóticos por manipulaciones histológicas destruyan a las células. Una vez hecha la sustitución de salina por paraformaldehído, se removió el cerebro completo manteniéndose en fijador por 24 horas, al término de las cuales se sustituyó por una solución al 30% de sacarosa durante 3 días.

Los cerebros fueron entonces cortados en un microtomo con cortes de 40 micras y procesados normalmente para la técnica de colinesterasa ligeramente modificado de Paxinos y Watson (1980):

Reactivos

Acetato de sodio trihidratado ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), 50mM, pH 5.0

Sulfato cúprico ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), 4mM

Glicina ($\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), 16mM

Acido clorhídrico (HCl), diluido

Acetil-tiocolila yodada

Etopropazina

Sulfuro de Sodio ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$), al 1%

Solución de reserva (Stock)

- pesar 6.8 g de Acetato de sodio
 - 1.0 g de sulfato cúprico
 - 1.2 g de Glicina
- aforar a 1 L con agua bidestilada
- ajustar a pH 5 con HCl diluido

NOTA: Esta solución puede mantenerse en refrigeración hasta dos semanas:

Una vez montados los cortes de tejido en laminillas se procede a incubarlos.

Solución incubadora

- a 100 ml de solución Stock agregar 116 mg de acetil-tio-colina yodada y 3 mg de etopropazina
- incubar el tejido en esta solución durante toda la noche o 7 h como mínimo.

Solución reveladora

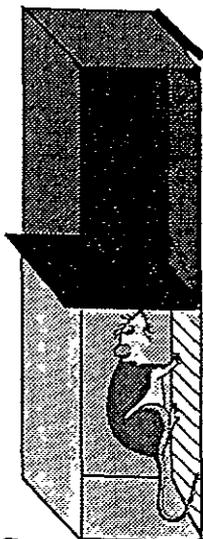
- Cambiar la solución incubadora por la solución al 1% de Sulfuro de sodio
- Revelar durante 10 min o el tiempo requerido para obtener una coloración café oscura en el tejido.

2. Determinación de Actividad de Colina Acetil Transferasa (ChAT):

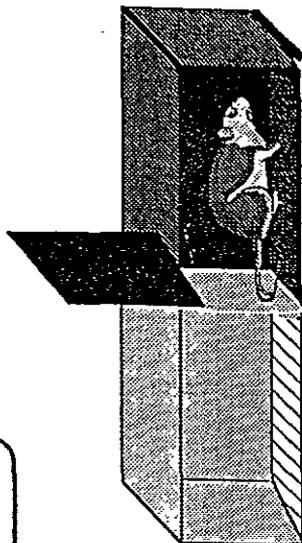
Los animales fueron decapitados y sus cerebros rápidamente extraídos para la disección de la región que corresponde a la corteza insular (CI).

PREVENCIÓN PASIVA

(A)



20 SEG. EN EL COMPARTIMENTO ILUMINADO,
SE ABRE LA COMPUERTA.



AL CRUZAR AL LADO OSCURO SE DA UNA
DESCARGA DE 0,7 mA. POR 3 SEGS.

EL PROCEDIMIENTO SE REPITE HASTA ALCANZAR, UN CRITERIO DE 80 SEGS. EN EL LADO CLARO SIN CRUZAR

(B)

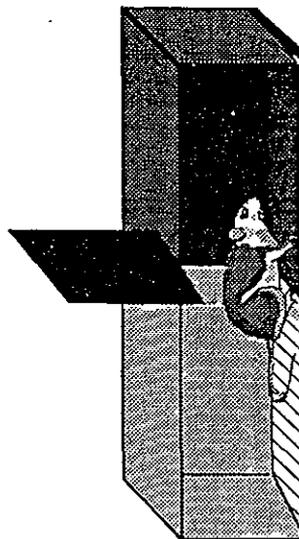


Fig. 9. Esquema del procedimiento de la tarea de prevención pasiva. La figura A muestra la fase de adquisición y la fig. B la de evocación de la prueba

Procedimiento:

- Disecar el tejido cerebral y colocarlo en un eppendorf de 1.5 ml previamente pesado.
- Pesar el tejido e inmediatamente congelar a -70°C , o proceder a homogeneizar.
- Homogeneizar el tejido con $500\ \mu\text{l}$ de la **solución homogenado (en hielo).
- Sonicar 30 segundos, evitar el sobrecalentamiento.
- Centrifugar 15 min. a temperatura ambiente 12.5 r.p.m.
- Separar $200\ \mu\text{l}$ del sobrenadante y agregar $50\ \mu\text{l}$ de la ***solución sustrato.
- Separar los restantes $200\ \mu\text{l}$ para análisis de proteínas.
- El sobrenadante mas el sustrato se incubaba a 37°C durante 20 min. en baño térmico.
- Parar la reacción con $10\ \mu\text{l}$ de HClO_4 1M en hielo.
- Agregar al sobrenadante 1 ml de agua destilada para diluir la muestra 1 a 5.
- Colocar $500\ \mu\text{l}$ en la parte superior del "filtro eppendorf" y centrifugar a 12.5 r.p.m. durante 10 minutos.
- Analizar en HPLC el filtrado.

**Solución para Homogenado de Tejido

En 100 ml de agua:

Tritón X 100 (0.5%) 0.5 ml.

PB 0.2 M (25mM) 12.5 ml.

***SOLUCION SUSTRATO

En 10 ml de agua:

NaCl 3 M	0.3M	1 ml
Neostigmina 1mM	0.2mM	2 ml
Cloruro de Colina 10mM	13.96 mg	
EDTA 20mM	74.40 mg	
PB 0.2M	0.1M	5.0 ml
Acetil CoA	0.4M	3.24 mg

*Ligeramente modificado de Nita et. al.,1993.

VII EXPERIMENTO 2

En este segundo experimento se estudiaron las tareas de laberinto de agua de Morris (Water Maze) tanto para el grupo de memoria como para el de aprendizaje; y la tarea de prevención pasiva solo para el grupo de aprendizaje.

VIIa. Procedimiento

Para la tarea de Prevención Pasiva, todos los animales fueron considerados para el grupo de aprendizaje.

Para la tarea del laberinto de agua los animales fueron divididos en dos grupos, con 16 animales cada uno al inicio del experimento, el primer grupo fue para estudiar el papel que estaba jugando el sistema colinérgico y el NBM en tareas de memoria, el segundo grupo fue para estudiar el papel del NBM en tareas de aprendizaje.

VIIb. PREVENCIÓN PASIVA

Grupo Aprendizaje

En este caso los animales habían recibido las lesiones en el NBM antes de la adquisición de la tarea que fue exactamente igual que la del grupo de memoria del experimento 1. (Fig 10)

VIIc. LABERINTO DE AGUA

Grupo Memoria

Para la adquisición de esta tarea (Fig. 11), los animales intactos fueron sometidos a un entrenamiento que consistió en diez ensayos.

Se determinaron aleatoriamente diez distintos puntos de partida dentro de los cuatro cuadrantes de la tina experimental.

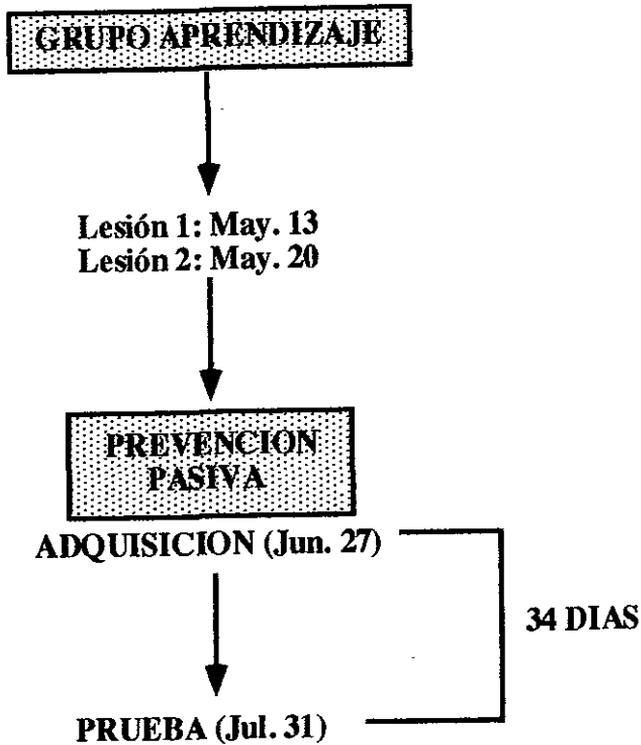


Fig. 10. Esquema del procedimiento de la Prevención Pasiva para el grupo de aprendizaje.

En cada uno de los ensayos, el animal era depositado en las distintas locaciones, acto seguido el experimentador mandaba la señal al convertidor analógico digital para el registro y posterior análisis de las imágenes.

La finalidad de cada ensayo, era que el animal encontrara la plataforma (blanco) ubicada en uno de los cuadrantes de la tina. La duración máxima de cada ensayo fue de 45 segundos, si al término de éste el animal no encontraba el blanco, se le guiaba al mismo, donde permanecía por diez segundos.

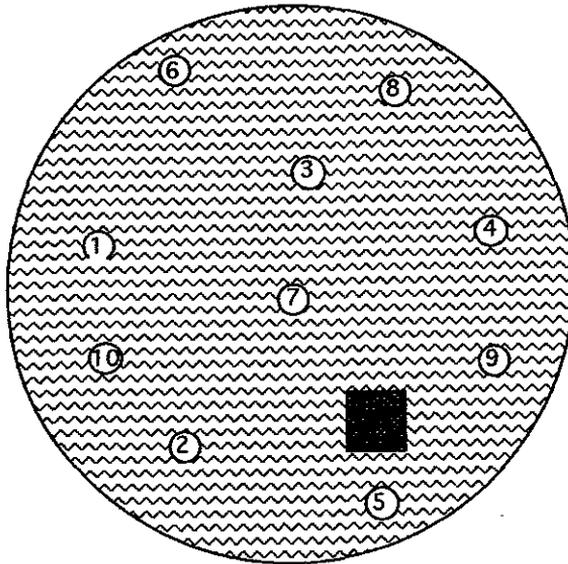


Fig. 11. Esquema de las diez diferentes locaciones desde donde el animal era colocado dentro de la tina experimental del Water Maze.

Los entrenamientos se llevaron a cabo con dos animales simultáneamente, es decir mientras, uno ejecutaba el ensayo, el otro descansaba, la duración máxima del "descanso" era de 45seg, y la mínima de 30 segs, se repitió este protocolo hasta completar diez ensayos, al cabo de los cuales el animal era nuevamente colocado en su caja-habitación (Fig.12).La tarea se repitió de la misma manera al día siguiente para estar seguros que los animales habían adquirido la tarea.

El procedimiento típico utilizado en el laboratorio, es una sola adquisición, y la prueba al día siguiente. En este caso el protocolo experimental no permitió que la prueba se hiciera al otro día sino hasta 20 días después (Fig. 13) de aquí la importancia de dos entrenamientos.

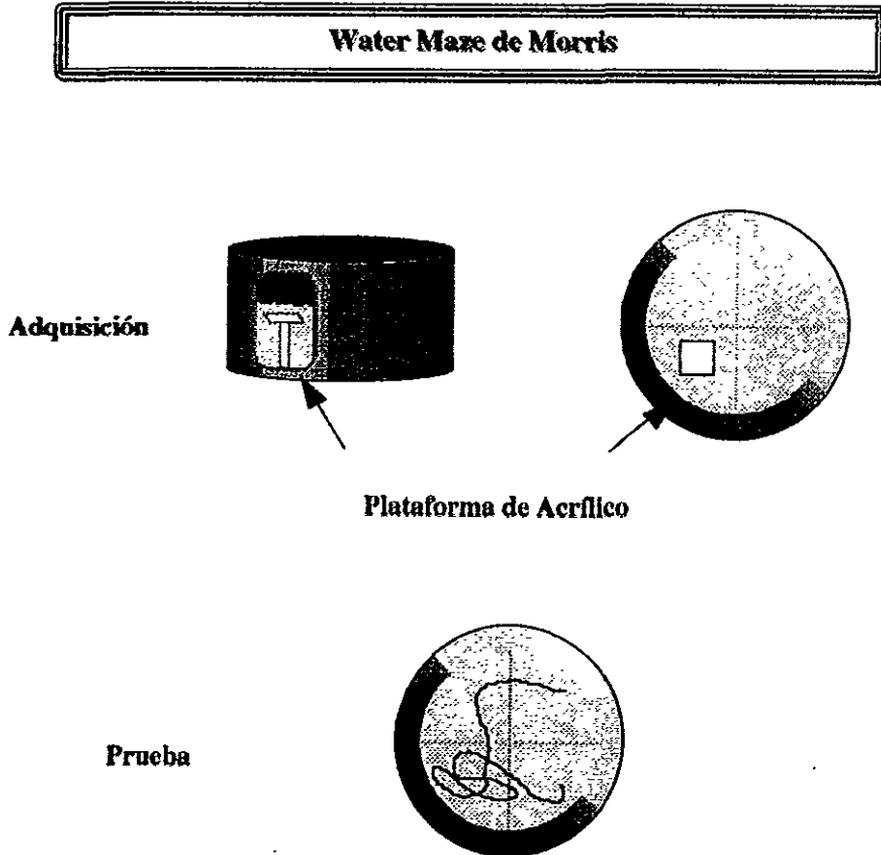


Fig. 12. La figura muestra un esquema del laberinto de agua (modificado) de Morris. Se observa la fase de adquisición y la fase de prueba con la ejecución ficticia de un animal control.

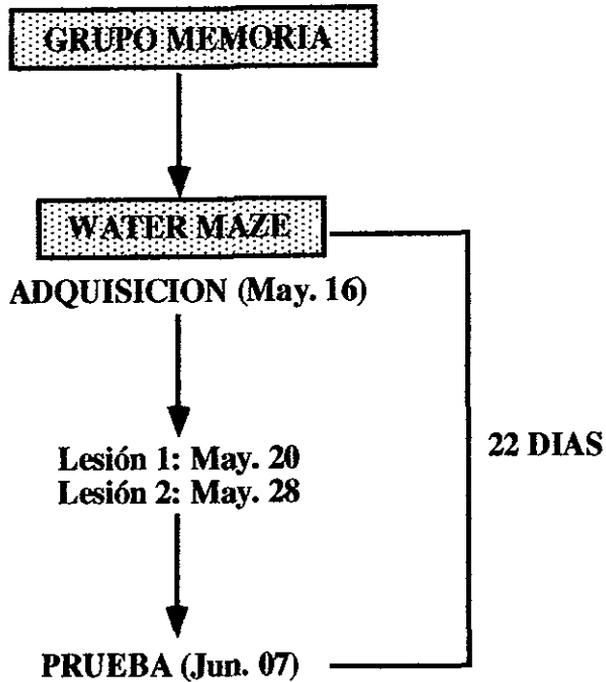


Fig. 13. Esquema del procedimiento del laberinto de agua para el grupo de memoria.

VIII.d. Grupo Aprendizaje

En este caso el procedimiento fue básicamente el mismo con la única diferencia de que los animales habían recibido previamente las lesiones en el NBM. (Fig. 14).

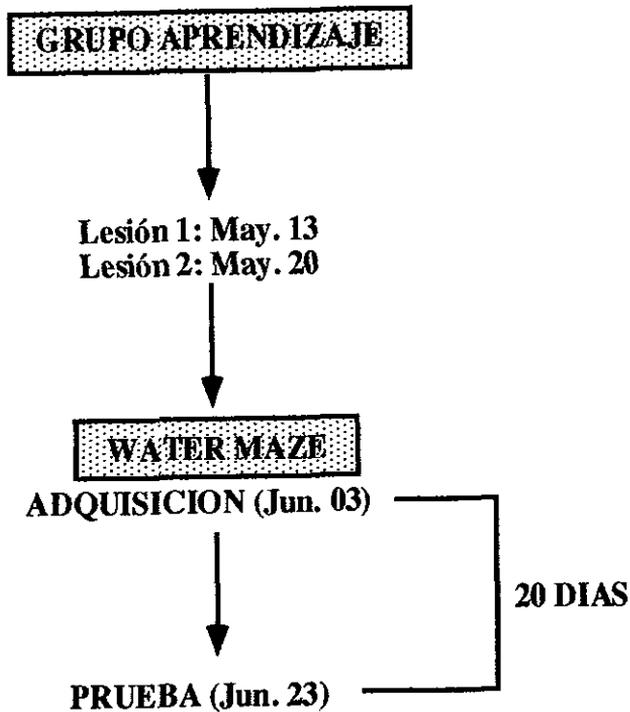


Fig. 14. Esquema del procedimiento del laberinto de agua para el grupo de aprendizaje.

VIIe. Histologías

Al término de los experimentos, todos los animales fueron divididos en dos grupos:

1. DFP-Colinesterasa (exactamente igual que en el Experimento 1)
2. Inmunohistoquímica Anti-colinacetiltransferasa:

***Procedimiento:**

PBS pH 7.4 [Buffer fosfatos 0.1M y NaCl 0.15M = 0.9%] (1000 ml.)

Pesar: 2.298 g. de Fosfato monobásico de Sodio (NaH_2PO_4) P.M. 137.99

22.345 g. de Fosfato dibásico de Sodio ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) P.M. 268.07

8.765 h. de Cloruro de Sodio (NaCl) P.M. 58.44

Agregar 900 ml de H_2O desionizada

Ajustar el pH a 7.4 con solución NaOH o HCl concentrado en agitación conitua.

Aforar a 1000 ml. con H_2O desionizada

Solución Salina 0.9% = 0.15M (1000 ml.)

Pesar 8.765 g. de NaCl

Aforar a 1000 ml. con H_2O desionizada

Fijador (1000 ml.)

Pesar 40 g. de paraformaldehído

Agregar a 900 ml de PBS

Calentar (50-60 °C) agitar , hasta que la solución se aclare

Filtrar la solución

Esperar a que la temperatura disminuya hasta 30 °C y agregar 4 ml. de

Glutaraldehído al 25%

Aforar a 1000 ml con PBS

Sacarosa 15 y 30% (100 ml)

Pesar 15 ó 30 g. de Sacarosa

Agregar 100 ml. de PBS y agitar

Perfusión

Todos los animales se sometieron al siguiente procedimiento de perfusión igual que el descrito para la DFP-Colinesterasa con la infusión de solución salina al 0.9%, sustitufda después por una solución de paraformaldehído 4%

y Glutaraldehído 0.1% (fijador). La perfusión debe hacerse a una velocidad de 1-1.5 empleándose 250 ml/animal. Los cerebros se dejan en fijador durante 3 horas, después de las cuales se cambian a una solución de sacarosa al 15%, cuando el cerebro se precipita se cambia a una solución de sacarosa 30%.

Cortes

Se hicieron cortes de 40 micras en un microtomo, se colocaron en cajas con 12 pozos acomodándose de 4 a 5 cortes en cada uno, cada pozo contenía alrededor de 400 μ l de PBS.

Primera Incubación

Los cortes se flotan en PBS-Tritón 0.3% (3 μ l tritón/ 1000 μ l PBS) durante 30 minutos en agitación moderada a temperatura ambiente. Se realizan tres lavados en PBS de 10 minutos cada uno.

Segunda Incubación

Los cortes se flotan en 400 μ l PBS con 2% de suero de caballo y 2% de BSA durante 30 minutos a temperatura ambiente en agitación moderada. Se realizan tres lavados en PBS de 10 minutos cada uno.

Tercera Incubación (Primer Anticuerpo) Vector KIT PK-6102

Los cortes se flotan en el primer anticuerpo (anti-ChAT) con una dilución de 1:100 durante 72 horas en agitación moderada a 4°C. Se realizan tres lavados en PBS de 10 minutos cada uno.

Cuarta Incubación (Segundo Anticuerpo) Vector KIT PK-6102

Los cortes se flotan en el segundo anticuerpo con una dilución 1:200 durante 2 horas en agitación moderada a temperatura ambiente.

5 μ l anticuerpo/ 1000 μ l PBS

Importante: Preparar el complejo Avidina Biotina (A+B) media hora después de iniciar la tercera incubación.

Se realizan tres lavados en PBS de 10 minutos cada uno.

Quinta Incubación

Los cortes se flotan en el complejo A+B durante dos horas en agitación moderada a temperatura ambiente.

Se mezclan 9 μ l de A y 9 μ l de B, dejando la mezcla por una hora y media en agitación moderada a temperatura ambiente, agregando 982 μ l de PBS hasta que se vaya a utilizar.

Se realizan tres lavados en PBS de diez minutos cada uno.

Revelado con KIT (Vector) SK 4100

En 5 ml. de agua bidestilada agregar 2 gotas de buffer stock solution. Mezclar muy bien.

Añadir 4 gotas de diaminobenzidina (DAB) stock solution a la solución anterior y mezclar bien.

Añadir 2 gotas de solución de peróxido de hidrógeno, y mezclar bien.

Para una tinción oscura agregar 2 gotas de solución de nickel intensificador (enhancer) y mezclar bien.

Flotar los cortes durante 10 minutos o hasta que se tornen cafés.

Proceder a montar los cortes normalmente.

*(Ligeramente modificado de Plaschke et. al.,1997)

VIII RESULTADOS

VIIIa. EXPERIMENTO 1

CAS

Para la prueba del condicionamiento aversivo a los sabores, el valor del consumo de la solución de sacarina fue transformado a un valor de porcentaje de consumo de la línea base, es decir los valores de consumo de agua en las dos mañanas precedentes fueron promediados aritméticamente para cada animal y este valor considerado como 100% y comparado con el consumo de la solución de sacarina el día de la prueba. Esta transformación se realiza dado que se ha reportado que en algunos casos, los animales con lesión pueden presentar una pequeña pero significativa reducción del volumen de consumo general, y de ésta manera se elimina la posibilidad de que las diferencias que se pudieran observar entre controles y experimentales fueran debidas a éste fenómeno (Dugas de Villard, et al., 1981).

VIIIb. Grupo Memoria

Los resultados de la transformación antes descrita fueron analizados mediante una prueba estadística de ANOVA simple con comparaciones individuales post hoc de Fisher. El consumo de sacarina el día de la adquisición fue similar en los tres grupos (control=21.11 ml. $s=+1.68$, lesión falsa=20.37 ml. $s=+1.52$, y lesionado=20.11 ml. $s=+0.98$) y similar a su vez con el consumo de línea base de agua.

El día de la prueba (Fig. 15) los tres grupos, tanto el control (Con), el de lesión falsa, y el lesionado (Les), mostraron un porcentaje reducido de consumo de sacarina, indicando una aversión condicionada (Con= 25.91%, $s=\pm 4.43$; lesión falsa=22.19%, $s=\pm 4.0$; Les=29.94%, $s=\pm 4.22$), el análisis estadístico no mostró diferencias significativas en ninguno de los tres grupos.

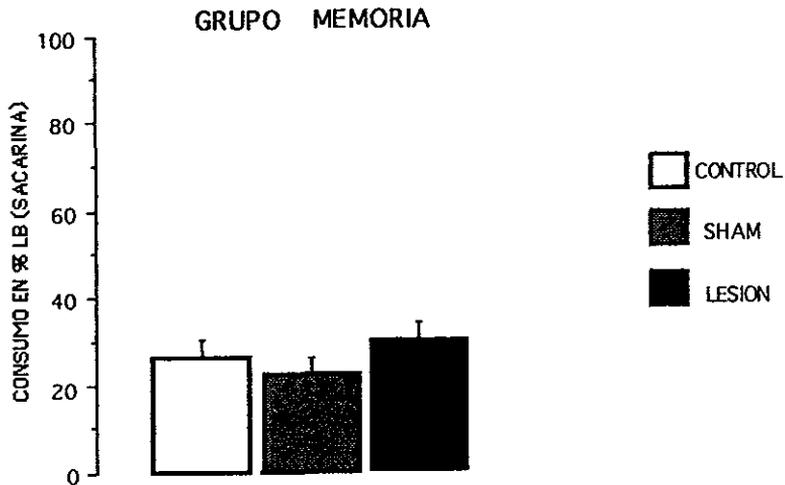


Fig. 15. Resultados de la prueba de condicionamiento aversivo a los sabores para el grupo de memoria. El porcentaje de línea base se obtuvo tomando como 100% la media aritmética del consumo de las dos mañanas precedentes a la presentación del sabor.

VIIIc. Grupo Aprendizaje

Los resultados en este caso fueron analizados de la misma manera.

El día de la prueba (Fig. 16) el grupo control y el de lesión falsa mostraron un porcentaje reducido de consumo de salina, indicando una aversión condicionada (Con=27.45%, $s=\pm 6.32$, lesión falsa=28.87%, $s=\pm 7.71$), en cambio el grupo de lesión en el NBM presentó un consumo de salina similar al consumo de agua previo (les=69.21%, $s=\pm 7.78$) indicando una aversión disminuída. Se encontró una diferencia significativa en el efecto de grupo del ANOVA ($F=9$, $p<0.01$) y análisis de Fisher posteriores mostraron que el efecto era debido a una diferencia significativa (DMS=41, $p<0.01$) entre el grupo lesionado y el control, y (DMS=40, $p<0.01$) entre el lesionado y el de lesión falsa, pero sin diferencias entre el grupo

control y el sham, lo que indica que los animales lesionados presentan una deficiencia significativa en la respuesta de aversión condicionada al sabor.

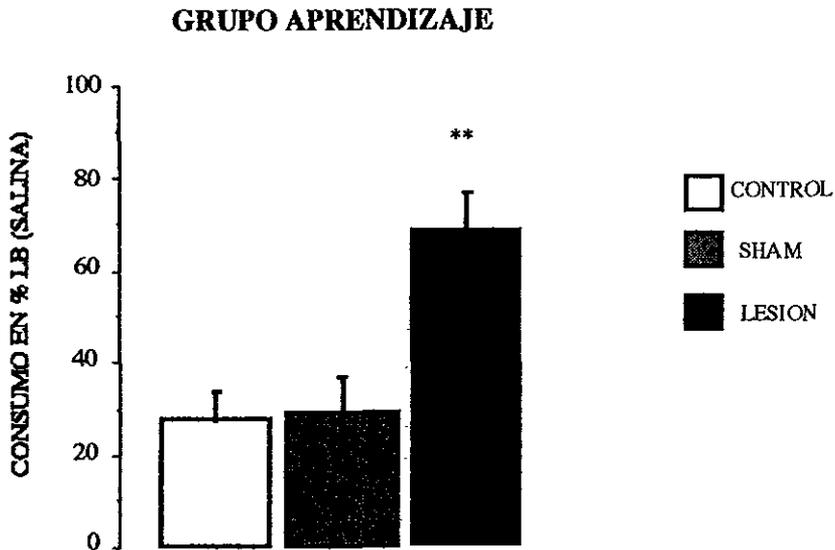


Fig. 16. Resultados de la prueba de condicionamiento aversivo a los sabores para el grupo de aprendizaje. El porcentaje de línea base se obtuvo tomando como 100% la media aritmética del consumo de las dos mañanas precedentes a la presentación del sabor.
** $p < 0.01$ con respecto al control.

El día de la presentación de la solución salina se observó un incremento en el consumo de todos los grupos con respecto a los valores de línea base de agua en los tres grupos (Con=39%, lesión falsa=22% y Les=33%), lo cual coincide con reportes previos que demuestran un incremento en el consumo de agua con NaCl, en ratas intactas y sin experiencia a ese sabor (Braun, et al., 1982).

VIII d. PREVENCIÓN PASIVA

Grupo Memoria

En la prueba de prevención pasiva, se utilizó un análisis estadístico de tipo no paramétrico, dado que la latencia y la estancia máxima que pudiera tener un animal fue cortado arbitrariamente en 600 segundos, lo cual convierte a éstos datos en ordinales, ya que los datos de 600 seg. no corresponden a un intervalo definido, sino que representan en realidad "mas de 600". Las características de este diseño permiten un análisis por medio de la prueba Kruskal-Wallis para efectos de grupo en la condición, y comparaciones *post hoc* entre grupos utilizando la prueba estadística de la U de Mann-Whitney (Siegel, et al., 1988).

Para fines del análisis estadístico solo se tomó en cuenta el valor de la estancia en el lado claro (ELC), sin embargo si el análisis se hubiese realizado sobre la estancia en el lado oscuro (ELO) las diferencias estadísticas encontradas hubiesen sido idénticas dado que $ELO = 600 - ELC$; y $ELC = 600 - ELO$, por lo que las diferencias entre grupos se hubiesen mantenido.

En la Fig. 17 se muestran los resultados de la estancia en ambos lados de la caja de prevención pasiva. En esta medición no se encontraron diferencias significativas entre los grupos, es decir los tres grupos mantuvieron estancias similares en el lado claro.

VIII e. HISTOLOGÍAS

La revisión histológica para DFP-Colinesterasa mostró que las lesiones provocaron una pérdida masiva de células colinérgicas en la mayor parte de la región correspondiente al Núcleo Basal Magnocelular, (Fig. 18).

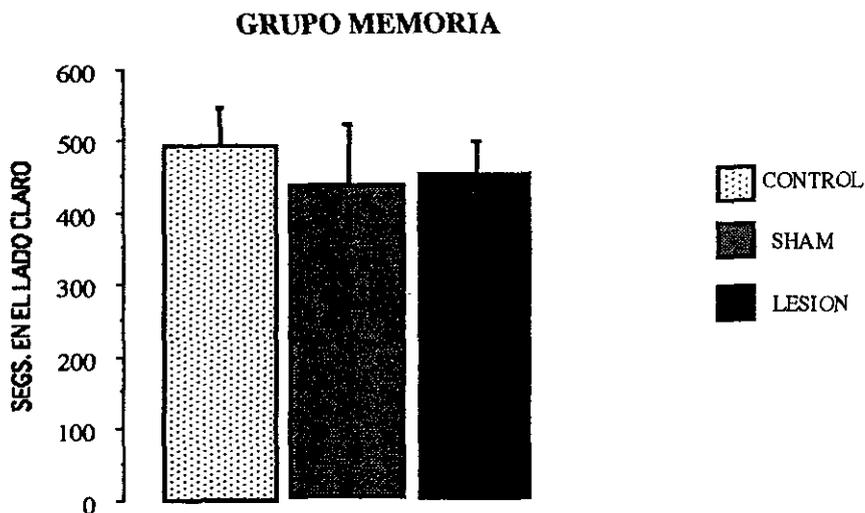


Fig. 17. Resultados de la prueba de prevención pasiva para el grupo de memoria. Para fines estadísticos solo se utilizó la estancia en el lado claro.

Los resultados en la determinación de Actividad de Colina Acetil Transferasa (ChAT) obtenida por HPLC (Fig. 19), fueron evaluados comparando las diferentes concentraciones del neurotransmisor entre los diferentes grupos y analizados mediante una prueba estadística de ANOVA simple con comparaciones individuales *post hoc* de Fisher. Se encontró una diferencia significativa en el efecto de grupo del ANOVA ($F(2,9) = 5.86$ $p < 0.05$) y análisis de Fisher posteriores mostraron que el efecto era debido a una diferencia significativa entre el grupo lesionado y el control, ($p < 0.01$).

GRUPO	ACH/PROT	±SEM
Control	4449.54	1181.42
Sham	3086.41	388.38
Lesión	1627.61*	167.25

Fig. 19. Actividad de colina acetiltransferasa en la corteza insular como resultado de lesiones excitotóxicas en el NBM. La actividad se registró en picomoles de acetilcolina por minuto, por miligramo de proteína. * $p < 0.05$ con respecto al control.

EXPERIMENTO 2

VIII. PREVENCIÓN PASIVA

Grupo Aprendizaje

Las mediciones se llevaron a cabo del mismo modo que en el grupo de memoria del experimento 1, y se encontró que el grupo control y el de lesión falsa tuvieron una estancia absoluta en el lado claro (Con=600 seg., lesión falsa=600 seg.) mientras que el grupo lesionado no mostró preferencia por ninguno (Les, X=408.38).

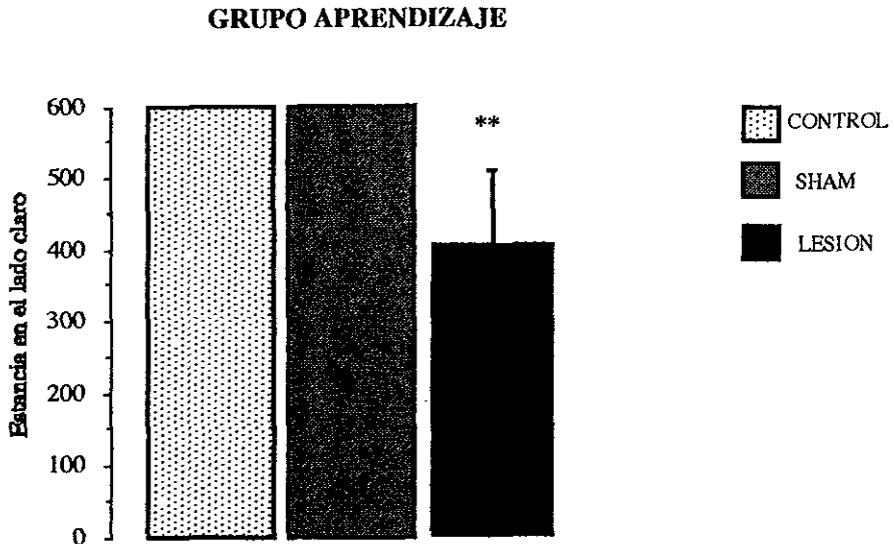


Fig. 20. Resultados de la prueba de prevención pasiva para el grupo de aprendizaje. Para fines estadísticos solo se utilizó la estancia en el lado claro. ** $p < 0.05$.

El análisis estadístico mostró un efecto significativo de diferencia entre grupos ($H(2,15) = 6.15, p < 0.04$) la cual fue producida por una diferencia significativa entre el grupo control y el lesionado ($Con Vs. Les, U(10) = 5, '5, p < 0.05$). Fig. 20.

VIIIg.LABERINTO DE AGUA

Grupo Memoria

Adquisición 1: Durante los ensayos de adquisición del Laberinto de agua del primer día (Fig. 21) no se encontraron diferencias entre los grupos. En general todos los animales aprendieron a encontrar la plataforma a partir del quinto ensayo.

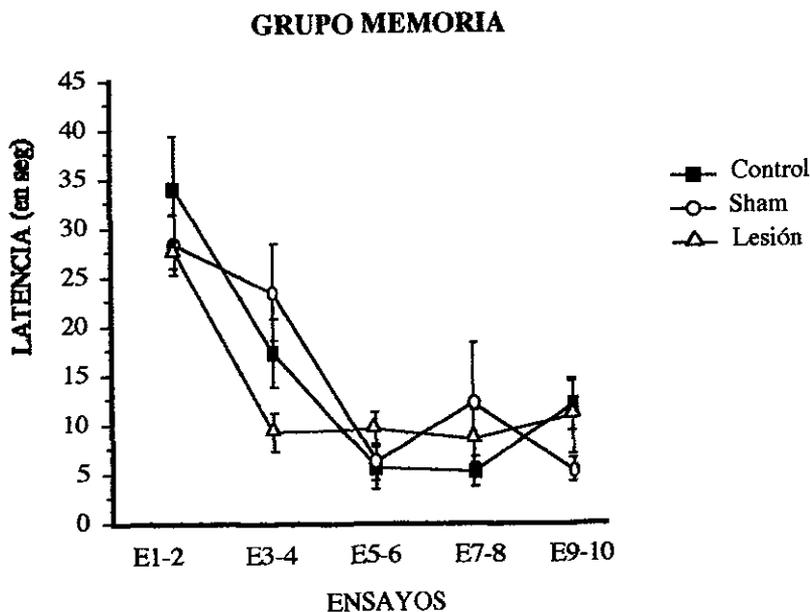


Fig. 21. Resultados de la primera adquisición de la tarea del laberinto de agua, para el grupo de memoria. Los ensayos fueron agrupados en diadas.

Adquisición 2: Durante la segunda adquisición del Laberinto de agua (Fig. 22) no se encontró ninguna diferencia entre los grupos, y puesto que ya habían recibido un entrenamiento previo, los animales encontraron la plataforma desde el primer y segundo ensayo.

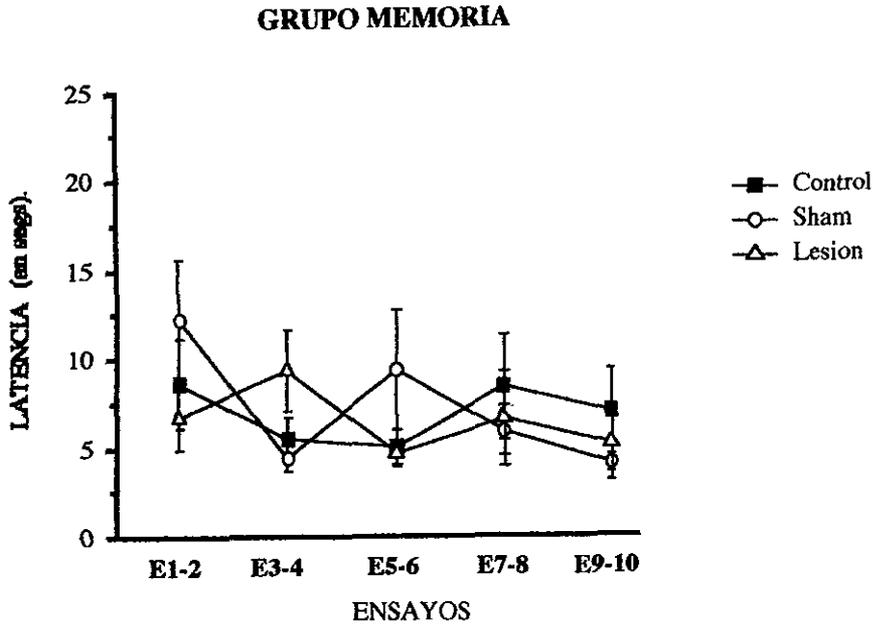


Fig. 22. Resultados de la segunda adquisición de la tarea de laberinto de agua, para el grupo de memoria. Los ensayos fueron agrupados en diadas.

VIIIh.Prueba

Para el análisis del laberinto de agua (Fig. 23) el día de la prueba se utilizaron dos criterios:

- a) Latencia, que es el tiempo en que los animales tardan en acudir al lugar donde se encontraba la plataforma el día de la adquisición;
- b) Entradas o cruces, que es el número de veces que el animal pasa por donde se encontraba la plataforma.

GRUPO MEMORIA

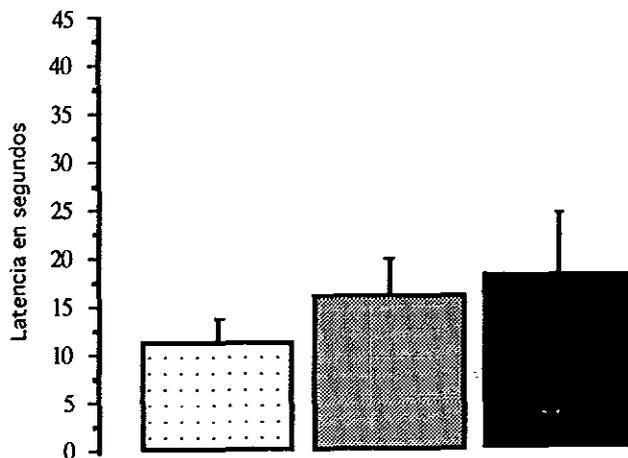


Fig. 23 a.

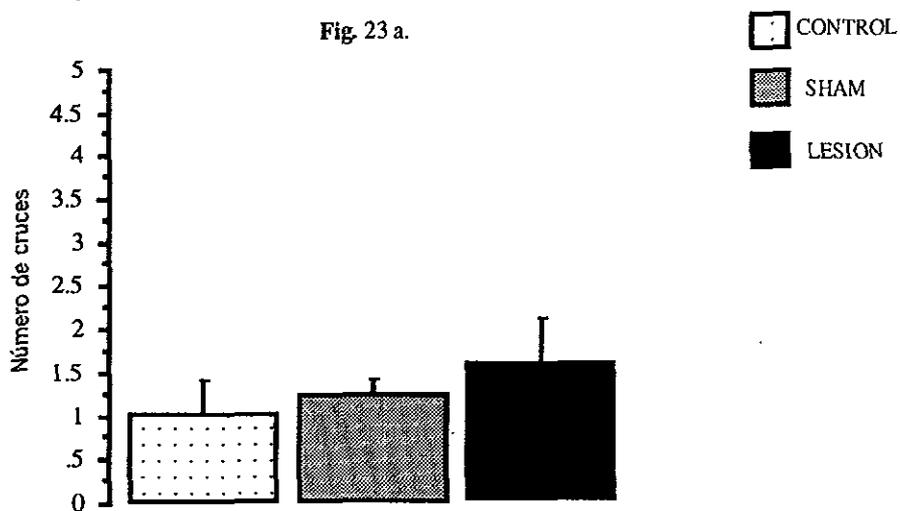


Fig. 23 b

Fig. 23a y 23b Resultados de la prueba de laberinto de agua del grupo de memoria para el criterio de latencia (a) y el de entradas o cruces (b). No se encontraron diferencias significativas.

VIII. Grupo Aprendizaje

Adquisición 1: Durante los ensayos de adquisición del laberinto de agua del primer día (Fig. 24) se encontraron diferencias en el cuarto ensayo y séptimo cuando fueron analizados individualmente, y en la diada 7-8 ($F(2,11) = 4.57$, $p < 0.04$) cuando fueron agrupados en pares. El análisis *post hoc*, mostró que esta diferencia es solo en el grupo de lesión Vs. control ($p < 0.05$).

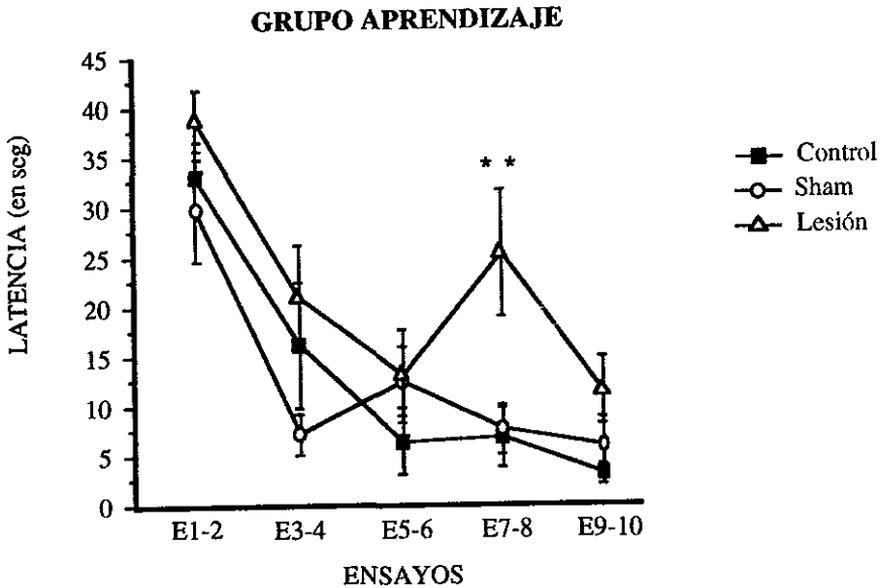


Fig. 24. Resultados de la primera adquisición de la tarea del laberinto de agua, para el grupo de aprendizaje. Los ensayos fueron agrupados en diadas. ** $p < 0.05$.

Adquisición 2: Durante la segunda adquisición del laberinto de agua (Fig. 25) se encontraron diferencias en el primer ensayo, en el cuarto, quinto, noveno y décimo, cuando el análisis fue individual, y en las diadas 1-2, 5-6 y 9-10, ($F(2,11) = 4.79$, $p < 0.02$; $F(2,11) = 5.72$, $p < 0.02$; $F(2,11) = 7.14$, $p < 0.02$) respectivamente. El análisis *post hoc* mostró que estas diferencias fueron también solo en el grupo de lesión Vs. control ($p < 0.05$). Observamos pues,

que los animales lesionados tienen problemas para encontrar la plataforma, es decir les cuesta mucho mas trabajo aprender la tarea.

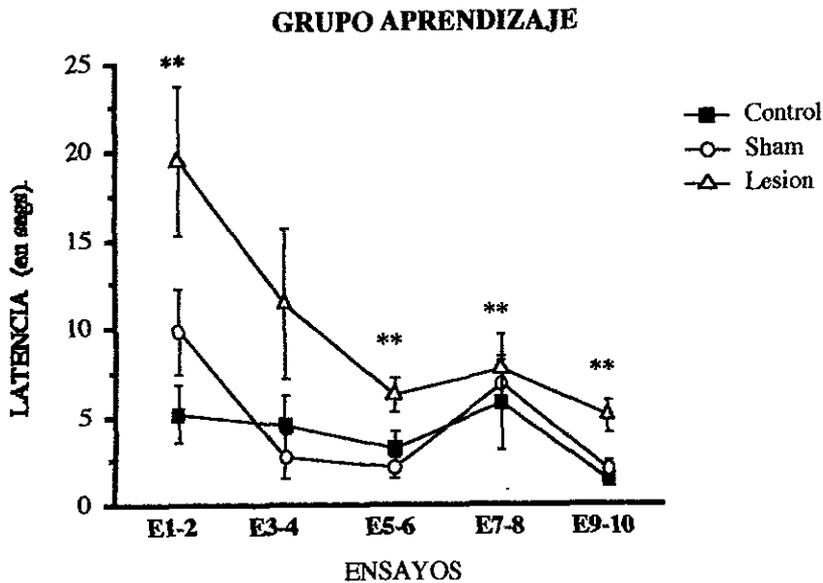


Fig. 25. Resultados de la segunda adquisición de la tarea del laberinto de agua, para el grupo de aprendizaje. Los ensayos fueron agrupados en diadas. ** $p < 0.05$.

VIIIj. Prueba

En la fig. 26 se muestran los resultados de la prueba para el grupo de aprendizaje en donde al igual que para el grupo de memoria se utilizaron dos criterios:

a) Latencia, en donde se encontraron diferencias significativas por un efecto de grupo lesión Vs. control ($F(2,11) = 2.95, p < 0.05$).

b) El número de cruces donde se encontraba la plataforma, donde también se encontró un efecto de grupo lesión Vs. control ($F(2,11) = 2.97, p < 0.05$).

GRUPO APRENDIZAJE

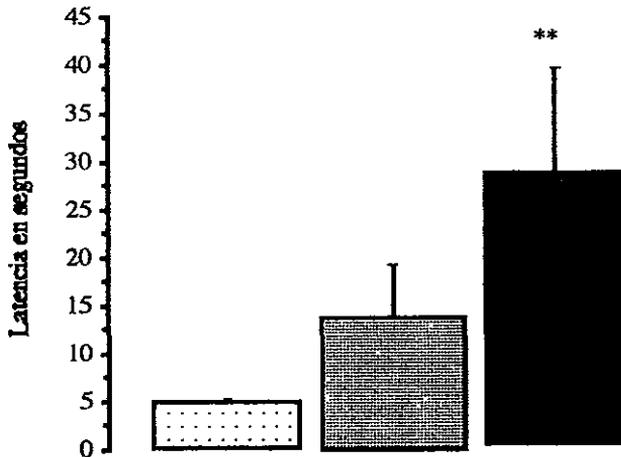


Fig. 26 a

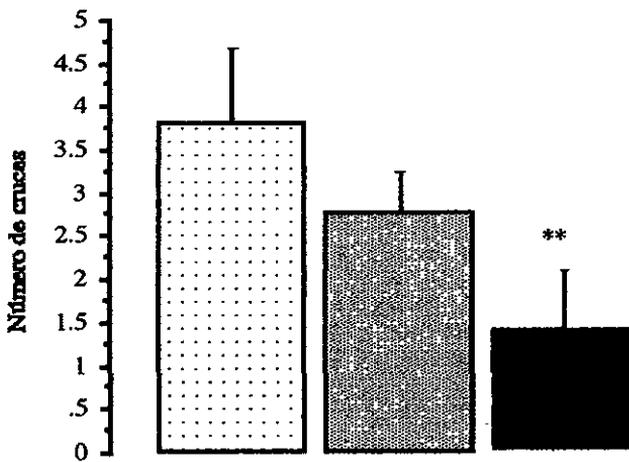


Fig. 26 b

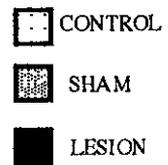


Fig. 26a y 26b. Resultados de la prueba del laberinto de agua del grupo de aprendizaje para el criterio de latencia (a) y el de entradas o cruces (b). ** $p < 0.05$.

VIII. Histologías

Al igual que en el experimento 1, la revisión histológica para la DFP-colinesterasa, mostró que las lesiones abarcaron la mayor parte del Núcleo Basal Magnocelular, (Fig. 18). La figura 27 muestra las fotos de los animales perfundidos para la técnica DFP-colinesterasa.

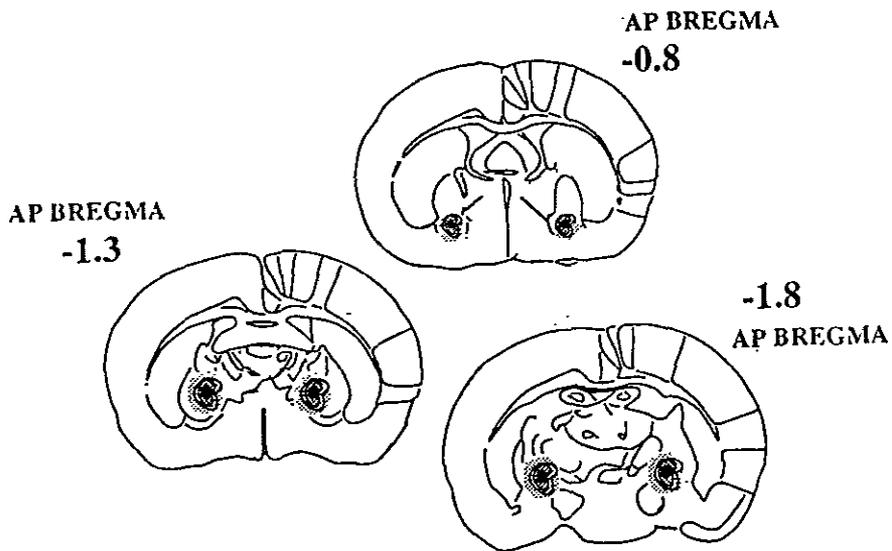


Fig. 18. Diagrama de la ubicación de las lesiones en cortes coronales que incluyen el área que corresponde al Núcleo Basal Magnocelular. El área mas oscura representa el mayor daño las áreas ashuradas, las de menor.

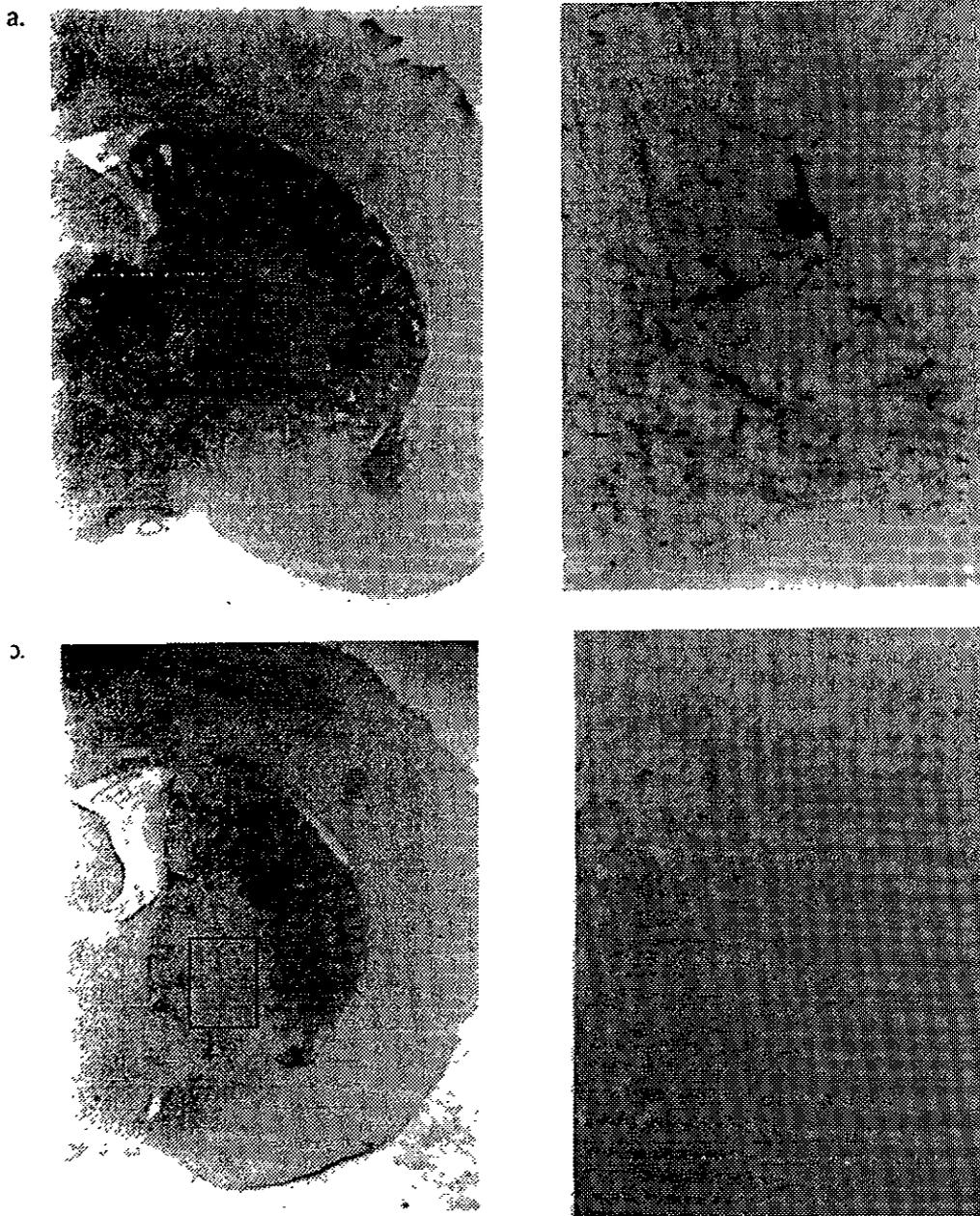
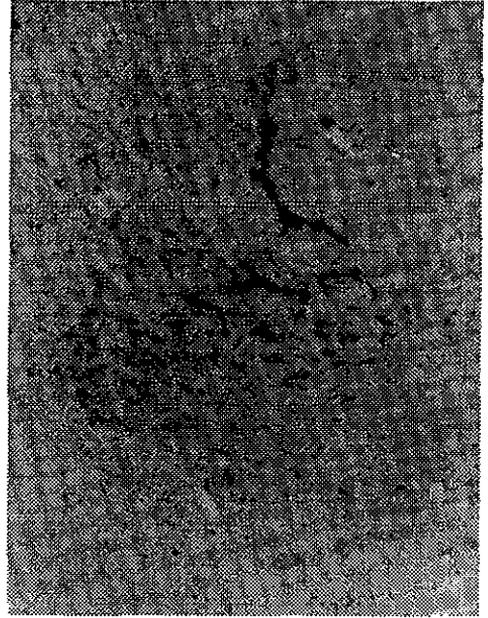


Fig. 27a y 27b. Resultados histológicos para DFP-Colinesterasa en un animal control (a) en donde alcanzamos a ver células en la región correspondiente al Núcleo Basal Magnocelular; y para un animal lesionado (b) donde son prácticamente inexistentes.

En las figuras 28 y 29, se muestran los resultados inmunohistoquímicos anti-colinacetiltransferasa, no se juzgó necesario hacer un conteo y análisis estadísticos, pues la ausencia prácticamente total de células inmunopositivas a ChAT en el área correspondiente al NBM en los animales lesionados, con respecto al control, resultó evidente a simple vista.



b.

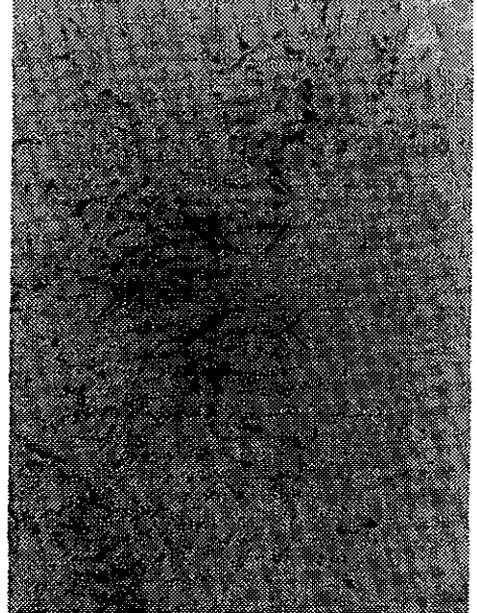
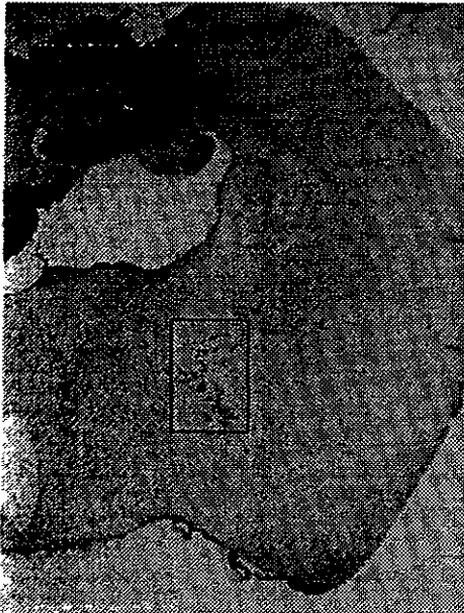


Fig. 28a. y 28b. Resultados inmunohistoquímicos anticolinacetiltransferasa para un animal control (a) y uno de lesión falsa (b). El encuadre representa la figura adyacente.

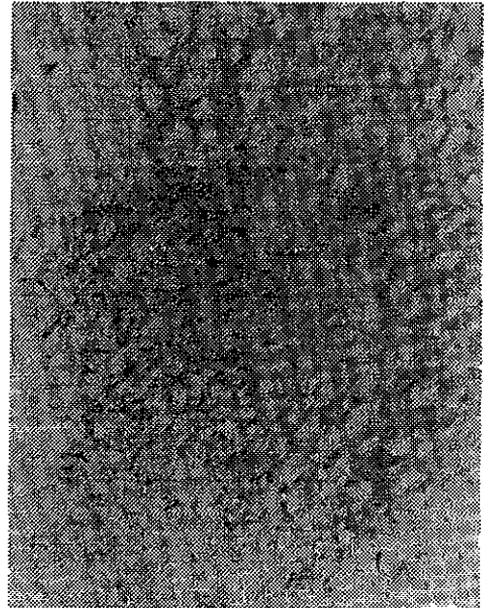
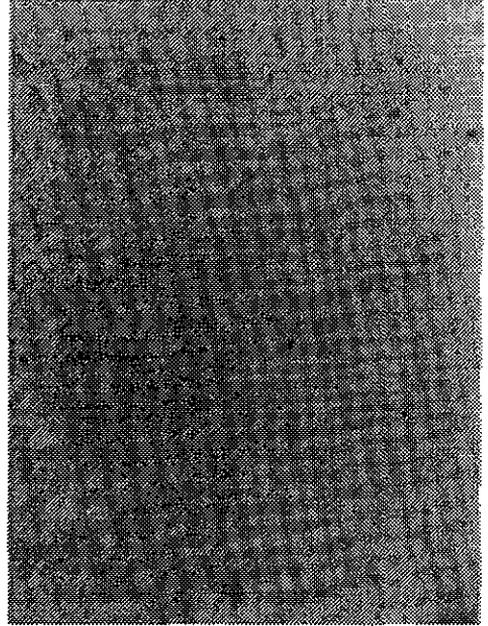
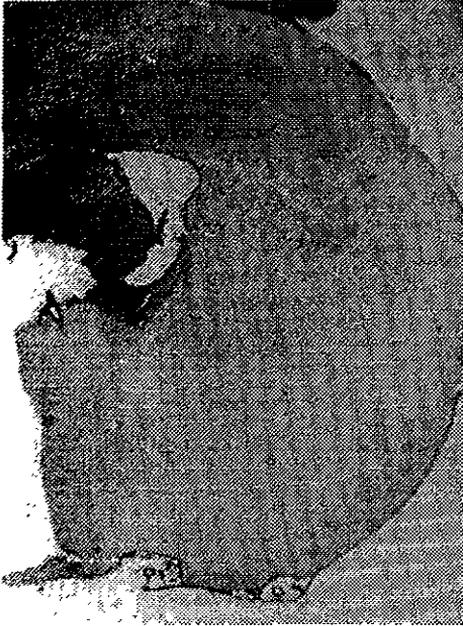


FIG. 29. Resultados inmunohistoquímicos anticolinacetiltransferasa para dos animales lesionados. No se visualizan células en ninguno de los dos animales.

IX DISCUSION Y CONCLUSION

Un gran número de evidencia ha generado la aceptación de que el sistema colinérgico está jugando un papel medular en funciones cognitivas superiores como el aprendizaje y la memoria (Hegan, et al., 1986; Spangler, et al., 1986; Spignoli et al., 1987; Rush, 1988; Lamberty et al., 1991). Asimismo se ha reportado la reducción de la actividad colinérgica cortical relacionada con el daño de las neuronas del sistema colinérgico del cerebro anterior basal en particular del núcleo basal magnocelular o de Meynert.

Los estudios de lesiones en el NBM han arrojado una diversidad de datos que demuestran una disminución significativa en la actividad colinérgica en diferentes zonas corticales después de la lesión (Sangstock et. al; 1992; Bronzetti et. al.; 1993; Dekker et al., 1993; Lapchak et. al.; 1993; Moyses et. al.; 1993).

Esta evidencia ha originado la hipótesis de que el daño de las aferencias del sistema colinérgico del CAB juega un papel de suma importancia en las deficiencias cognoscitivas humanas dentro de una serie de enfermedades neurodegenerativas (Sinden, et al., 1995). Esta hipótesis ha dado como resultado la posibilidad de que al reintegrar la transmisión colinérgica del CAB, pudieran mejorar algunas de las propiedades del aprendizaje y la memoria que se ven afectadas en enfermedades como el Alzheimer. Sin embargo, a pesar de los indicios obtenidos en investigaciones con animales de laboratorio, realizadas con precursores de ACh que han logrado incrementar los niveles de este neurotransmisor, aun no han mostrado ninguna mejoría en los ensayos con enfermos de Alzheimer (Nitsch et al., 1994 b).

Toda esta evidencia provee las bases para sustentar el papel del sistema colinérgico cortical en los mecanismos de adquisición en diversas tareas de aprendizaje, pero el papel que está jugando en la retención o evocación es menos conocido.

Los trabajos de nuestro laboratorio sugieren un proceso independiente de la actividad colinérgica cortical involucrado en los mecanismos de memoria o evocación. Con respecto a esto, recientemente se ha propuesto que la proyección basolocortical podría jugar un papel importante en los estadios iniciales del proceso de aprendizaje (Durkin et al., 1992). A favor de esta posibilidad se ha observado que la duración de la activación colinérgica cortical disminuye progresivamente a medida que aumenta el número de entrenamientos y el correspondiente aumento en el desempeño de la prueba en modelos de laberinto radial. La extensión lógica de este proceso implicaría la existencia de un momento en el que la intervención del sistema colinérgico podría no ser funcionalmente requerido durante el proceso de evocación (Durkin, 1994; Durkin et al., 1992). Observaciones análogas se han reportado con experimentos de administración sistémica de escopolamina, en los cuales se ha observado un efecto decreciente dependiendo de si el tratamiento se lleva a cabo en las etapas iniciales o finales del programa de entrenamiento en el laberinto radial (Toumane et al., 1993). Esta sensibilidad diferencial al bloqueador muscarínico sugiere que el sistema colinérgico deja de participar una vez que se ha aprendido la tarea en cuestión.

Experimentos con trasplantes heterotópicos muestran una clara correlación entre la recuperación colinérgica del aprendizaje, no siendo el caso para la recuperación de la memoria, que parece ocurrir independientemente de la función colinérgica del trasplante (Ormsby et al., 1995).

Recientes estudios de microdialisis en libre movimiento llevados a cabo en nuestro laboratorio muestran una fuerte correlación entre la activación colinérgica en la corteza y la presentación de un estímulo gustativo novedoso. Esta activación no correlaciona del mismo modo con el solo hecho de que los animales beban agua mientras se monitorean sus niveles de acetilcolina en la corteza insular. En cambio al presentarse una solución de sabor novedoso (sacarina o salina), se registra una fuerte elevación en los niveles extracelulares de acetilcolina inmediata a la presentación del nuevo estímulo, (Miranda et. al. en preparación).

Ahora bien, resulta muy interesante que esta activación disminuya durante subsecuentes presentaciones. Esto sugiere fuertemente una participación del sistema colinérgico en la corteza en el contexto de la presentación de un estímulo novedoso. Esta interpretación sería consistente con estudios reportados en la literatura según los cuales se observa una actividad decreciente del sistema de proyección colinérgica a medida que los animales avanzan en el proceso de entrenamiento, de modo que una vez que los sujetos han aprendido por completo la tarea en subsecuentes pruebas de memoria no se observa más la participación de este sistema (Toumane et al., 1993).

Más evidencia proveniente de nuestro laboratorio demuestra que durante el consumo de un sabor novedoso, es decir, en la fase de adquisición del CAS, hay una liberación elevada de acetilcolina en la corteza insular en animales controles en libre movimiento, mientras que en animales a los que se les administró TTX (bloqueador reversible) en el NBM treinta minutos antes de la fase de adquisición, se encuentra una clara inhibición de dicha liberación. Estos datos van acompañados de la contraparte conductual en donde los animales controles aprenden normalmente la tarea mientras que los animales tratados con TTX son incapaces de hacerlo.

En este mismo trabajo fueron estudiadas también las fases de memoria, una vez el condicionamiento adquirido, se realizó la fase de la evocación o prueba, en donde los niveles de acetilcolina en la corteza insular no manifestaron cambios ni en los animales controles ni en los animales tratados con TTX. En conclusión estos datos sugieren nuevamente el papel colinérgico-dependiente durante los procesos de adquisición (aprendizaje), pero no durante los de evocación (memoria). (Miranda et al., en preparación).

Los datos obtenidos en este trabajo proponen que al menos en el condicionamiento aversivo a los sabores el NBM y el sistema colinérgico están jugando un papel diferencial en los procesos de aprendizaje y de memoria, siendo indispensable para el primero, pero no así para el segundo.

Con respecto a los resultados obtenidos en las pruebas de prevención pasiva y del laberinto de agua, la interpretación resulta un poco mas compleja. Para el grupo de aprendizaje, la adquisición de ambos paradigmas resulta afectada de manera muy importante. Con este respecto podemos concluir que la integridad colinérgica del CAB y el NBM, están jugando un papel medular en el aprendizaje de estas tareas. Sin embargo para el grupo de memoria se observó un fenómeno curioso, tal parece que los animales hubieran aprendido las tareas deficientemente, o las hayan mal recordado. Este fenómeno no se puede explicar en términos de la adquisición, pues todos los animales al exponerlos por primera vez a ambas tareas estaban intactos y sabemos que animales íntegros adquieren cualquiera de estos paradigmas; tampoco se puede explicar en términos de evocación pues hubiésemos encontrado un efecto de grupo. El hecho de que no se hayan encontrado diferencias significativas entre los grupos (control, lesión falsa y lesionado) desgraciadamente no se pueden atribuir a la hipótesis que le dió forma a este trabajo. Es decir el papel que está jugando el NBM y el sistema colinérgico en el proceso de memoria en las tareas de prevención pasiva y laberinto de agua, no queda claro.

La determinación en la corteza insular de Actividad de Colina Acetil Transferasa (ChAT) se realizó por dos razones principales:

1. Sabemos que las lesiones tanto reversibles como irreversibles de la corteza insular producen severos impedimentos en la adquisición del CAS, la prevención pasiva y el laberinto de agua (Bermúdez-Rattoni, et al., 1991a; Bermúdez-Rattoni et al., 1991b).
2. En nuestro laboratorio encontramos que la ubicación de las aferencias provenientes del CAB en la corteza insular, se originan principalmente en el NBM, así también, resultados preliminares obtenidos mediante microdiálisis in vivo en nuestro laboratorio, muestran una significativa activación colinérgica en la corteza insular como respuesta a la presentación de un estímulo gustativo durante el CAS.

La disminución significativa de ChAT en la corteza insular en los resultados obtenidos en el presente trabajo, confirman estos hallazgos, sugiriendo fuertemente que la irrigación colinérgica a dicha corteza es proveniente del NBM.

Es todavía prematura cualquier aceptación categórica de que dos sistemas independientes estén modulando fenómenos cognitivos superiores como lo son el aprendizaje y la memoria, hay evidencia contradictoria.

Diversos estudios coinciden en que la adquisición de la prevención pasiva se ve impedida por la depleción colinérgica (Lo Conte et al. 1982; Miyamoto et al. 1985; Hepler et al. 1985; Miyamoto et al. 1987; Dunnett et al. 1987; Miyamoto et al. 1989), sin embargo otros estudios afirman que es la retención la que se ve afectada (Altman et al. 1985; Harountunian et al. 1985; Thal et al. 1988; Berman et al. 1988). Incluso propios experimentos efectuados en el laboratorio contradicen los hallazgos encontrados en el presente trabajo (López García et al. 1993). En este caso se realizaron lesiones excitotóxicas en el NBM y se estudiaron las conductas de CAS para memoria y para aprendizaje, y de Prevención Pasiva solo para el grupo de aprendizaje. Los resultados obtenidos muestran que para todos los casos los animales con lesiones en el NBM se ven impedidos tanto para adquirir la tarea como para recordarla. Estos resultados en lo que respecta a los grupos de aprendizaje, coinciden con los aquí presentados, sin embargo contradicen los hallazgos del CAS para el grupo de memoria. Este fenómeno lo podemos explicar debido al tipo de lesión efectuada.

Existe un amplio debate con respecto a que los efectos conductuales son debidos a la región del sistema colinérgico lesionada y al tipo de excitotoxina empleada para dicha lesión, i.e. quisquálico, iboténico, NMDA. En este trabajo las coordenadas utilizadas para la lesión del NBM fueron como sigue:

-7.0 mm. en el plano Dorsoventral (DV), ± 2.8 mm. en el plano Lateral (L) y, -0.8 mm. en el plano Anteroposterior (AP); mientras que en el trabajo anterior las coordenadas fueron: -6.8 mm. (DV), ± 3.2 mm. (L), y -1.8 mm. (AP).

Adicionalmente la lesión en este trabajo fue realizada con NMDA y en el trabajo anterior con ácido quiscuálico. Para una discusión de este problema ver Dekker et. al. 1991.

En lo que respecta al laberinto de agua, también hay evidencia contradictoria que apunta a impedimentos en la adquisición (Dunett et al. 1985; Dokla et al. 1988; Mandel et al. 1988, 1989, 1989) o en la ejecución y retención (Whishaw et al., 1985; Hagan et al., 1988, Mundi, et al., 1988).

Es preciso mencionar que estas diferencias o contradicciones pueden ser producto del lugar, el tamaño de la lesión, o incluso del método utilizado para producirlas.

Tal vez las lesiones del NBM no representen en un modelo en sí de la enfermedad de Alzheimer, en donde no solo el sistema colinérgico o el NBM se encuentran afectados, pero sí han provisto de la información necesaria para abordar déficits muy claros en procesos de aprendizaje. Es posible que en combinación con lesiones de otros sistemas de neurotransmisión (p.e. noradrenérgico), y lesiones mas específicas de los núcleos colinérgicos del NBM, lleguemos a una aproximación mas fina para la evaluación y tratamiento de enfermedades de orden neurodegenerativo.

Como quiera que sea, el efecto de aparente disociación entre la adquisición de un condicionamiento (aprendizaje) y la retención y/o evocación de uno previamente adquirido, por la deficiencia de acetilcolina de uno de los núcleos colinérgicos mas importantes, extiende la posibilidad de estudiar dos fenómenos íntimamente relacionados: el aprendizaje y la memoria.

La figura 30 resume los resultados del presente trabajo:

CONDICION CAS PP LA GRUPO	CONTROL	LESION FALSA	LESION
MEMORIA	✓	✓	✓
APRENDIZAJE	✓	✓	✗

Fig. 30. Resumen de los resultados obtenidos en este trabajo. La figura ilustra que los animales tanto controles, lesionados y de lesión falsa para el grupo de memoria no tienen problemas en las pruebas de condicionamiento aversivo a los sabores (CAS), prevención pasiva (PP) y laberinto de agua (LA). Sin embargo los animales lesionados para el grupo de aprendizaje se ven impedidos en las tres tareas.

Tomando en conjunto los resultados obtenidos en el presente trabajo se puede concluir:

- Las lesiones del NBM con NMDA afectan la adquisición (aprendizaje) del condicionamiento aversivo a los sabores, más no la evocación (memoria) del mismo.
- Las lesiones del NBM con NMDA afectan la adquisición (aprendizaje) de la prevención pasiva.
- Las lesiones del NBM con NMDA afectan la adquisición (aprendizaje) del laberinto de agua.
- El papel que está desempeñando el NBM en las funciones de evocación de al menos las tareas de prevención pasiva y del laberinto de agua no están claros.
- La irrigación colinérgica a la Corteza Insular es proveniente de los núcleos del NBM.
- No se puede excluir la posibilidad de que otras estructuras cerebrales como la amígdala y el tálamo, o bien otros sistemas de transmisión como el noradrenérgico, estén jugando un papel importante en la recuperación conductual.

REFERENCIAS

Abdulla, F. A., Abu-Bakra, M. A. J., Calamicini, M. R., Stephenson, J. D., & Sinden, J. D. (1995). Importance of forebrain cholinergic and GABAergic systems to the age-related deficits in water maze performance of rats. *Neurobiology of Aging*, *16*, 41-52.

Aigner, T. G., Mitchell, S. J., Aggleton, J. P., DeLong, M. R., Struble, R. G., Price, D. L., Wenk, G. L., Mishkin, M. (1987). Effects of scopolamine and physostigmine on recognition memory in monkeys with ibotenic acid lesions of the nucleus basalis of Meynert. *Psychopharmacology-Berl.* *92* 292-300.

Aigner, T. G., Walker, D. L., Mishkin, M. (1991). *Behavioral Neural Biology*, *55*, 61-67.

Allen, G., Buxton, R. B., Wong, E. C., Courchesne, E. (1997). *Science*, *275*, 1940-1943.

Altman, H. J., Crosland, R. D., Jenden, D. J. (1985). Further characterizations of the nature of the behavioral and neurochemical effects of lesions to the nucleus basalis of Meynert in the rat. *Neurobiology of Aging*, *6*, 125-130.

Ambrogi-Lorenzini, C., Baldi, E., Bucherelli, C., Tassoni, G. (1994). Post-Training nucleus basalis magnocellularis functional tetrodotoxin blockade effects of passive avoidance consolidation in the rat. *Behavioral Brain Research*, *18* 191-6.

Bartus, R. T., Dean, R. L., Beer, B., & Lippa, A. S. (1982). The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science*, *217*, 408-417.

Berman, R. F., Crosland, R. D., Jenden, D. J., Altman, H. J. (1988). Persisting behavioral and neurochemical deficits in rats following lesions of the basal forebrain. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *29* 581-586.

Bermúdez-Rattoni, F., Mujica-González, Prado-Alcalá, R. A. (1985). Is cholinergic activity of the striatum involved in the acquisition of positively motivated behaviors? *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. *24*, 715-719.

Bermúdez-Rattoni, F., Introini-Collinson, I. B., & McGaugh, J. L. (1991). Reversible inactivation of the insular cortex by tetrodotoxin produces retrograde and anterograde amnesia for inhibitory avoidance and spatial learning. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, *88*, 5379-5382.

Bermúdez-Rattoni, F., & McGaugh, J. L. (1991). Insular cortex and amygdala lesions differentially affect acquisition on inhibitory avoidance and conditioning taste aversion. *Brain Research*, *49*, 165-170.

Björklund, A., Dunnett, S.B. (1995). Cognitive function. Acetylcholine revisited. *Nature*, *375*, 446.

Brandeis-R., Brandys-Y., Yehuda-S. (1989). The use of the Morris water maze in the study of Memory and Learning. *International Journal of Neuroscience*, *48*, 29-69.

Braun, J. J., Lasiter, P. S., & Kiefer, S. W. (1982). The gustatory neocortex of the rat. *Physiological Psychology*, *10*, 13-45.

Bronzetti, E., Caporali, M. G., Felici, L., Niglio, T., Scotti-de-Carolis, A., & Amenta, F. (1993). Muscarinic cholinergic receptor subtypes in the rat frontoparietal cortex after ipsilateral lesions of the nucleus mesencephalicus profundus. *Pharmacology*, *46*, 301-307.

Butcher, L. L., Oh, J. D., Woolf, N. J., Edwards, R. H., & Roghani, A. (1992). Organization of central cholinergic neurons revealed by combined in situ hybridization histochemistry and choline-O-acetyltransferase immunocytochemistry. *Neurochemical International*, *21*, 429-445.

Björklund, A., & Dunnett, S. B. (1995). Acetylcholine revisited. *Nature*, *375*, 446.

Chambers, K. C. (1990). A neural model for conditioned taste aversions. *Annual Review of Neuroscience*, *13*, 373-385.

Christensen-H., Maltby-N., Jormk-AF., Creaseg-H., Broe-GA. (1992). Cholinergic "blockade" as a model of the cognitive deficits in Alzheimer's disease. *Brain*, *115*, 1681-99.

Coyle, J. T., Price, D. L., & DeLong, M. T. (1983). Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. *Science*, *219*, 1184-1190.

Dekker, A. J., Connor, D. J., Thal, L. J. (1990). The role of cholinergic projections from the nucleus basalis in memory. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *15*, 299-317.

Dekker, A. J., & Thal, L. J. (1993). Independent effects of cholinergic and serotonergic lesions on acetylcholine and serotonin release in the cortex of the rat. *Neurochemistry Research*, *18*, 277-283.

Dokla, C. P., Thal, L. J. (1988). Effect of cholinesterase inhibitors on Morris water task behavior following lesions of the nucleus basalis magnocellularis. *Behavioral Neuroscience*, 102, 861-871.

Dugas-du-Villard, X., Her, C., & MacLeod, P. (1981). Qualitative discrimination of sweet stimuli: behavioral study on rats. *Chemical Senses*, 6, 143-148.

Dunnett, S. B. (1985). Transplantation of embryonic ventral forebrain neurons to the neocortex of the rats with lesions of nucleus basalis magnocellularis- II. Sensorimotor and learning impairments. *Neuroscience*, 16, 787-797.

Dunnett, S. B., & Bjorklund, A. (1987). Mechanisms of function of neural grafts in the adult mammalian brain. *Journal of Experimental Biology*, 132, 256-289.

Dunnett, S. B., Ryan, C. N., Levin, P. D., Reynolds, M., & Bunch, S. T. (1987). Functional consequences of embryonic neocortex transplanted rats with prefrontal cortex lesions. *Behavioral Neuroscience*, 101, 489-503.

Dunnett, S. B., Wishaw, I. Q., & Jones, G. H. (1987). Behavioural, biochemical and histochemical effects of different neurotoxic amino acid injected into nucleus basalis magnocellularis of rats. *Neuroscience*, 20, 653-669.

Durkin, T. P., & Toumane, A. (1992). Septo-hippocampal and nBM-cortical cholinergic neurons exhibits differential time-courses of activation as a function of both type and duration of spatial memory testing in mice. *Behavioural Brain Research*, 50, 43-52.

Durkin, T. P. (1994). Spatial working memory over long retention intervals: dependence on sustained cholinergic activation in the septohippocampal or nucleus basalis magnocellularis- cortical pathways? *Neuroscience*, 62, 681-693.

Everitt, B. J., Sirkia, T. E., Roberts, A. C., Jones, G. H., & Robbins, T. W. (1988). Distribution and some projections of cholinergic neurons in the brain of common marmoset, *Callithrix jacchus*. *Journal of Comparative Neurology*, 271, 533-538.

Froster, M. Naumann T. (1992). septohippocampal cholinergic neurons: Synaptic connections and survival following axotomy. *Reviews in the Neuroscience*, 3 233-248.

Gao, H. H., Parsons, L. M., Bower, J. M., Xiong, J., Li, J., Fox, P. T. (1996). *Science*, 272, 545-547.

García, J., Kimeldorf, D. J., & Koelling, R. A. (1955). Conditioned aversion to saccharin resulting from exposure to gamma radiation. *Science*, *122*, 157-158.

García, J., & Koelling, R. A. (1966). Relation of the cue to consequence in avoidance learning. *Psychonomic Science*, *5*, 123-124.

García, J., McGowan, B. K., & Green, K. (1972). Biological constraints on conditioning. In M. E. P. Seligman & J. L. Hager (Eds.), *Biological Boundaries of Learning*. New York: Meredith.

García, J. (1990). Learning without memory. *Journal of Cognitive Neuroscience*, *2*(4), 287-305.

Gardner, Howard. La nueva ciencia de la mente. Historia de la revolución cognitiva. 1987. Buenos Aires, Argentina. Ed. Paidós (pp. 305).

Grill, H. J., & Norgren, R. (1978). The taste reactivity test: mimetic responses to gustatory stimuli in neurologically normal rats. *Brain Research*, *143*, 263-279.

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

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

Haroutunian, V., Kanof, P.D., Davis, K. L. (1985). Pharmacological alleviation of cholinergic lesion induced memory deficits in rats. *Life Sciences*, *37* 945-952.

Hebb, D. O. (1949). *The organization of behavior: A neuropsychological theory*. New York: Wiley.

Hepler, D. J., Wenk, G. L., Cribbs, B. L., Olton, D. S., & Coyle, J. T. (1985). Memory impairments following basal forebrain lesions. *Brain Research*, *346*, 8-14.

Kimble, G. H. (1967). *Foundations of conditioning and learning*. New York. Appleton-Century Crofts.

Jonson, G. (1980). Chemical neurotoxins as denervation tools in neurobiology. *Annual Review of Neuroscience*, *3*, 169-187.

Kandel, E. R. (1987). The long and short of memory in *Aplysia*: A molecular perspective. En E. Costa (ed) Fidia Research Foundation Neuroscience Awards Lectures 1986. (pp. 7-47). Padova: Liviana Press.

Kimble, G. H. (1967). *Foundations of conditioning and Learning*. Appleton-Century Crofts. New York, N. Y.

Kolb, B., Whishaw, I. *Fundamentals of Human Neuropsychology*. Third edition. Ed. Freeman. New York, N.Y. 1990. (pp. 525).

Lamberty, Y., & Gower, A. J. (1991). Cholinergic modulation of spatial learning in mice in a Morris-type water-maze. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de therapie*, 305, 5-19.

Lapchak, P. A., Araujo, D. M., Pasinetti, G., Hefti, F. (1993). Differential alterations of cortical cholinergic and neurotensin markers following ibotenic acid lesions of the nucleus basalis magnocellularis. *Brain Research.*, 613, 239-246.

Lashley, K. S. (1929). *Brain mechanisms and intelligence*, (pp.3). Chicago, University of Chicago Press.

Lashley, K. S. (1950). In search of the engram. In T. C. o. B. Ltd. (Ed.), *Society of Experimental Biology Symposium No. 4: Physiological Mechanisms in Animal Behavior*, (pp. 287-313). Cambridge: Cambridge University Press.

Leiner, H. C., Leiner, A. L., Dow, R. S. (1993). Cognitive and language functions of the human cerebellum. *Trends in Neuroscience*, 16, 444-447.

Lo Conte, G., Bartolini, L., Casamenti, F., Marconini-Pepeu, I., Pepeu, G. (1982). Lesions of cholinergic forebrain nuclei: Changes in avoidance behavior and scopolamine actions. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 17, 933-937.

López-García, J. C., Fernández-Ruiz, J., Escobar, M. L., Bermúdez-Rattoni, F., & Tapia, R. (1993). Effects of excitotoxic lesions of the Nucleus Basalis Magnocellularis on conditioned taste aversion and inhibitory avoidance in the rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 45, 147-152.

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

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

McGaugh, J. L., Introini-Collison, I. B., & Nagahara, A. H. (1988). Memory enhancement with intra-amygdala posttraining naloxone is blocked by concurrent administration of propranolol. *Brain Research*, 466, 37-49.

Meck, G., Church, R. M., Wenkl, G. L., Olton, D. S. (1987). Nucleus Basalis Magnocellularis and medial septal area lesions differentially impair temporal memory. *Journal of Neuroscience*, 7, 3505-11.

Miyamoto, M., Shintani, M., Nagaoka, A., & Nagawa, Y. (1985). Lesioning of the rat basal forebrain leads to memory impairments in passive and active avoidance tasks. *Brain Research*, 328, 97-104.

Miyamoto, M., Kato, J., Narumi, S., Nagaoka, A. (1987). Characteristics of memory impairment following lesioning of the basal forebrain and medial septal nucleus in rats. *Brain Research*, 419, 19-31.

Miyamoto, M., Narumi, S., Nagaoka, A., Coyle, J. T. (1989). Effects of continuous infusion of cholinergic drugs on memory impairment in rat with basal forebrain lesions. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 248, 825-834.

Morris-R. (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of Neuroscience Methods* 11, 47-60.

Moyse, E., Szigethy, E., Danger, J. M., Vaudry, H., Wenk, G. L., Beaudet, A., & Epelbaum, J. (1993). Short and Long term effects of nucleus basalis magnocellularis lesions on cortical levels of somatostatin and its receptors in the rat. *Brain Research.*, 607, 154-160.

Mundy, W. R., Tolson, H. A. (1988). Behavioral impairment in the rat after colchicine lesions of the hippocampus and nucleus basalis. *Neurotoxicology*, 9, 511-520.

Murray, C. L., & Fibiger, H. C. (1985). Learning and memory deficits after lesions of the nucleus basalis magnocellularis: Reversal by physostigmine. *Neuroscience*, 14, 1025-1032.

Myers, D. G. (1988). Psychology 5th. Editon. Worth Publishers, New York, N.Y. (pp.3-12).

Nita, A., Murase, M., Furukawa, Y., Hayashi, K., Hasegawa, T., & Nabeshima, T. (1993). Memory impairment and neural dysfunction after continuous infusion of anti-nerve growth factor antibody into the septum in adult rats. *Neuroscience*, 57, 495-499.

Nitsch, R. M., Growdon, J. H., Corkin, S., & Wortman, R. J. (1994a). *Alzheimer Disease*. (Vol. 1). New York: Annals of the New York Academy of Science.

Nitsch, R. M., Growdon, J. H., Corkin, S., & Wortman, R. J. (1994b). *Alzheimer Disease*. (Vol. 1). New York: Annals of the New York Academy of Science.

Olton-DS., Meck-WH., Church-RM., Wenk-GL. (1987). Nucleus Basalis Magnocellularis and medial septal area lesions differentially impair temporal memory. *Journal of Neuroscience*, 7, 3505-11.

Ormsby, C. (1994). Efectos de los implantes cerebrales sobre la evocación de respuestas condicionadas. *Tesis de licenciatura. Facultad de Psicología*.

Ormsby, C., & Bermúdez-Rattoni, F. (1995). Induced remembrance of taste aversions by cortical implants. *Society for Neuroscience Abstracts*, 20, 1211.

Pavlov, I. P. (1927, 1994). *Reflejos condicionados e inhibiciones*. (Vol. 17). Barcelona: Planeta.

Paxinos, G., & Watson, C. (1982). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Sydney: Academic Press.

Plaschke, M., Naumann, T., Kasper, E., Bender, R., Frotscher, M. (1997). Development of cholinergic and GABAergic neurons in the rat medial septum: effect of target removal in early postnatal development. *Journal of Comparative Neurology*, 379, 467-81.

Prado-Alcalá, R. A., Bermúdez-Rattoni, F., Velázquez-Martínez, D. N., Bacha, M. G. (1978). Cholinergic blockade of the caudate nucleus and spatial alternation performance in rats: overtraining induced protection against behavioral deficits. *Life Science*. 23 889-99.

Rescorla, R. A., Holland, P. C. (1982). Behavioral studies of associative learning in animals. *Annual Review of Psychology*, 64, 237-242.

Rescorla, R. A. (1988). Pavlovian conditioning: It's not what you think it is. *American Psychologist*, 43, 151-160.

Robinson, D. M. (1976). *An Intellectual history of psychology*, (pp.339). Nueva York, Macmillan.

Rozin, P. (1967). Specific aversions as a component of specific hungers. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 64, 237-242.

Rush, D. K. (1988). Scopolamine amnesia of passive avoidance: a deficit of information acquisition. *Behavioral and neural biology*, 50, 255-278.

Sangsttock, G. J., Johnson, K. B., Jantzen, P. T., Meyer, E. M., Dunn, A. J., & Arendash, G. W. (1992). Nucleus basalis lesions in neonate rats induce a selective cortical cholinergic hypofunction and cognitive deficits during adulthood. *Exp. Brain Research*, *90*, 163-174.

Siegel, S., Castellan, N. J. Jr. (1988). *Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences*. Singapur: McGraw-Hill.

Sinden, J. D., Hodges, H., & Gray, J. A. (1995). Neural transplantation and recovery of cognitive function. *Behavioral and brain science*, *18*, 10-35.

Skinner, B. F. (1989). The origins of cognitive thought. *American Psychologist*, *44*, 13-18.

Spangler, E. L., Rigby, P., & Ingram, D. K. (1986). Scopolamine impairs learning performance of rats in a 14-unit T-maze. *Pharmacology, biochemistry and behavior*, *25*, 673-679.

Spear, N. E., Miller, J. S., & Jagielo, J. A. (1990). Animal memory and learning. *Annual Review of Psychology*, *41*, 169-211.

Spignoli, G., Magnani, M., Giovannini, M. G., & Papeu, G. (1987). Effect of pyroglutamic acid stereoisomers on ECS and scopolamine induced memory disruption and brain acetylcholine levels in the rat. *Pharmacology Research Communications*, *19*, 901-912.

Tang, Y., Aigner, T. G. (1996). *NeuroReport* *7*, 2231-2235.

Tang, Y., Mishkin, M., Aigner, T. G. (1997). *Proceedings of the National Academy of Science USA*, *94*, 12667-12669.

Thal, L. J., Dokla, C. P. J., Armstrong, D. M. (1988). Nucleus basalis magnocellularis lesions: lack of biochemical and immunocytochemical recovery effect of cholinesterase inhibitors on passive avoidance. *Behavioral Neuroscience*, *102*, 852-860.

Tolman, E. C. (1948). Cognitive maps in rats and in men. *Psychological Review*, *55*, 189-208.

Toumane, A., & Durkin, T. P. (1993). Time Gradient for Post-test vulnerability to scopolamina-induced amnesia following the initial acquisition session of a spatial reference memory task in mice. *Behavioral and Neural Biology*, *60*, 139-151.

Wainer, B. H., & Mesulam, M. M. (1990). Ascending cholinergic pathways in the rat brain. In E. M. Steriade and D. Biesold (Ed.), *Brain Cholinergic Systems*, (pp. 65-119). Oxford: Oxford University Press.

Wenk, G., Hughey, D., Boundy, V., Kim, A., Walker, L., Olton, D. (1987). Neurotransmitters and memory: role of cholinergic serotonergic and noradrenergic systems. *Behavioral Neuroscience*, 101, 325-32.

Whishaw, I. Q., O'Connor, W. T., & Dunnett, S. B. (1985). Disruptions of central cholinergic systems in the rat by basal forebrain lesions or atropine: Effects on feeding, sensorimotor behavior, locomotor activity and spatial navigation. *Behavioral Brain Research*, 17, 103-115.

Wolf, N. J. (1991). Cholinergic systems in mammalian brain and spinal cord. *Progress in Neurobiology*, 37, 475-524.