

**Jéssica Ruiz Medina**

**FACILITACIÓN DEL APRENDIZAJE Y LA MEMORIA DE UNA  
TAREA DE REFERENCIA ESPACIAL EN EL LABERINTO  
ACUÁTICO DE MORRIS POR AUTOESTIMULACIÓN  
ELÉCTRICA INTRACRANEAL, EN RATAS WISTAR**

Tesis doctoral dirigida por:

Dr. Ignacio Morgado Bernal

Dra. Pilar Segura Torres

Departament de Psicobiologia i de Metodologia de les Ciències de la Salut  
Facultat de Psicologia  
Institut de Neurociències  
Universitat Autònoma de Barcelona

Bellaterra (Barcelona), 2007

Este trabajo ha sido posible gracias a:

- una beca FPI del subprograma de Formación de Personal Docente e Investigador de la Generalitat de Catalunya (20002SGR-00080, 2004FI-00845),
- una ayuda del Ministerio de Ciencia y Tecnología (proyecto I + D: BSO 2002 01908),

## ABREVIATURAS

<b>5-HT</b>	Serotonina
<b>Acc</b>	Núcleo accumbens
<b>Ach</b>	Acetilcolina
<b>AchE</b>	Acetilcolinesterasa
<b>AEIC</b>	Autoestimulación eléctrica intracraneal
<b>AMPA</b>	Alfa-amino-3-hidroxy-5-metil-4-isoxazole propiónico ácido
<b>AP</b>	Área preóptica del hipotálamo
<b>APM</b>	Área preóptica medial
<b>ATV</b>	Área tegmental ventral
<b>BDB</b>	Banda diagonal de Broca
<b>BIO</b>	Búsqueda de la intensidad óptima de estimulación
<b>BO</b>	Bulbo olfatorio
<b>BST</b>	Lecho de la estría terminal
<b>CPF</b>	Corteza prefrontal
<b>D</b>	Receptor dopaminérgico
<b>DA</b>	Dopamina
<b>EICr</b>	Estimulación eléctrica intracraneal reforzante
<b>EV2</b>	Evitación activa de dos sentidos
<b>HL</b>	Hipotálamo lateral
<b>HPM</b>	Haz prosencefálico medial
<b>IEE</b>	Intervalo entre ensayos
<b>IO</b>	Intensidad óptima de estimulación
<b>LAM</b>	Laberinto acuático de Morris
<b>LC</b>	Locus coeruleus
<b>LDTg</b>	Núcleo laterodorsal tegmental
<b>LEA</b>	Córtex entorrinal lateral
<b>MEA</b>	Córtex entorrinal medial
<b>NA</b>	Noradrenalina
<b>NMDA</b>	N-methyl-D-aspartato
<b>NTS</b>	Núcleo del tracto solitario
<b>PB</b>	Prosencéfalo basal
<b>PER</b>	Córtex perirrinal
<b>PF</b>	Núcleo parafascicular del tálamo
<b>PLP</b>	Potenciación a largo plazo
<b>POR</b>	Córtex parahipocampal
<b>PPTg</b>	Núcleo pedunculopónticotegmental
<b>SI</b>	Sustancia innominata
<b>SN</b>	Sustancia negra
<b>SNR</b>	Sustrato nervioso del refuerzo
<b>VIP</b>	Péptido intestinal vasoactivo

# ÍNDICE

<b>I. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVO GENERAL</b>	<b>1</b>
<b>II. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES EXPERIMENTALES</b>	<b>7</b>
1. SISTEMAS CEREBRALES DEL REFUERZO	9
1.1 Introducción	9
1.2 Neuroanatomía del refuerzo	12
1.2.1 Haz prosencefálico medial (HPM)	12
1.2.2 Otros sistemas del refuerzo	14
1.3 Neuroquímica del refuerzo: papel de la dopamina	18
2. SISTEMA CEREBRAL DE REFERENCIA ESPACIAL	23
2.1 Introducción	23
2.2 Sistema de la memoria declarativa: anatomía del lóbulo temporal medial	24
2.3 Subdivisiones anatómico-funcionales de la memoria episódica	27
2.3.1 Implicación del hipocampo en el aprendizaje espacial	32
2.3.2 Otras estructuras implicadas en el aprendizaje espacial	35
2.4 Sistemas de neurotransmisión y aprendizaje espacial	36
3. AUTOESTIMULACIÓN ELÉCTRICA INTRACRANEAL Y CONSOLIDACIÓN DE LA MEMORIA	40
3.1 Introducción	40
3.2 Modulación de la consolidación de la memoria por AEIC en el HPM	41
3.2.1 Efectos de la AEIC post-entrenamiento	41
3.2.1.1 Parámetros experimentales que afectan a la AEIC	42
3.2.1.2 Diferencias individuales: nivel de aprendizaje y edad	44
3.2.2 Efectos de la AEIC pre-entrenamiento	44
3.3 Hipótesis explicativas del efecto modulador de la AEIC	47
4. EL LABERINTO ACUÁTICO DE MORRIS	51
4.1 Introducción	51
4.2 Consideraciones metodológicas	56

4.2.1	Sujetos experimentales	56
4.2.1.1	Diferencias por sexo	56
4.2.1.2	Diferencias entre especies y cepas	57
4.2.1.3	Edad	58
4.2.1.4	Nutrición	59
4.2.1.5	Estrés e infección	59
4.2.1.6	Experiencia previa	61
4.2.2	Protocolos de entrenamiento, estrategias de nado y parámetros analizados	61
4.3.	Consideraciones generales	64
<b>III. TRABAJO EXPERIMENTAL</b>		65
1.	PLANTEAMIENTO	67
2.	EXPERIMENTOS	68
2.1	Experimento 1	68
2.1.1	Introducción	68
2.1.2	Material y procedimiento	68
2.1.2.1	Bienestar animal	68
2.1.2.2	Sujetos	69
2.1.2.3	Cirugía estereotáxica	69
2.1.2.4	Adquisición de la conducta de AEIC	71
2.1.2.5	Laberinto Acuático de Morris	73
2.1.2.6	Resumen del diseño experimental	76
2.1.2.7	Análisis estadístico	78
2.1.2.8	Histología	78
2.1.3.	Resultados	79
2.1.3.1	Sujetos	79
2.1.3.2	Aprendizaje	79
2.1.3.3	Ensayo de prueba	81
2.1.3.4	Parámetros de AEIC e Histología	82

2.2 Experimento 2	83
2.2.1 Introducción	83
2.2.2 Material y procedimiento	83
2.2.3 Resultados	84
2.2.3.1 Sujetos	84
2.2.3.2 Aprendizaje	84
2.2.3.3 Ensayo de prueba	85
2.2.3.4 Parámetros de AEIC e Histología	86
2.3 Experimento 3	87
2.3.1 Introducción	87
2.3.2 Material y procedimiento	87
2.3.3 Resultados	88
2.3.3.1 Sujetos	88
2.3.3.2 Aprendizaje	88
2.3.3.3 Ensayo de prueba	90
2.3.3.4 Parámetros de AEIC e Histología	91
2.4 Experimento 4	92
2.4.1 Introducción	92
2.4.2 Material y procedimiento	92
2.4.3 Resultados	93
2.4.3.1 Sujetos	93
2.4.3.2 Aprendizaje	93
2.4.3.3 Ensayo de prueba	95
2.4.3.4 Parámetros de AEIC e Histología	96
<b>IV. DISCUSIÓN GENERAL</b>	<b>99</b>
<b>V. REFERENCIAS</b>	<b>105</b>
<b>ANEXO</b>	

# **I. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVO GENERAL**

## **I. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVO GENERAL**

Los procesos neurales de aprendizaje y memoria, esenciales para la adaptación del individuo al medio, pueden ser modulados por diferentes sistemas endógenos, neurales o endocrinos, aumentando la probabilidad de interacción flexible entre el individuo y su entorno (McGaugh, 2000). Uno de los sistemas biológicos moduladores capaz de facilitar los procesos cognitivos de aprendizaje y memoria es el Sustrato Nervioso del Refuerzo (SNR). En especial, la estimulación del Haz Prosencefálico Medial (HPM), a nivel del Hipotálamo Lateral (HL), autoadministrada por el propio sujeto experimental (autoestimulación eléctrica intracraneal, AEIC), es uno de los tratamientos que con mayor consistencia ha demostrado facilitar el aprendizaje y consolidación de la memoria en una gran variedad de paradigmas de memoria implícita, tales como el condicionamiento clásico aversivo y apetitivo (Coulombe y White, 1980; 1982a), el condicionamiento operante apetitivo (Major y White, 1978) y el precondicionamiento sensorial (Coulombe y White, 1982b), etc.

En nuestro laboratorio hace tiempo que hemos establecido y verificado un modelo conductual de facilitación de una tarea de memoria implícita, el condicionamiento de evitación activa de dos sentidos (EV2), mediante la administración post-entrenamiento de AEIC en el HL. Los experimentos que hemos realizado han puesto de manifiesto que:

1. En la EV2, la AEIC post-entrenamiento en el HL facilita tanto el proceso de adquisición (Massanés-Rotger y col., 1998; Redolar-Ripoll y col., 2003; Segura-Torres y col., 1988, 1991) como el de retención a corto (24 horas) (Aldavert-Vera y col., 1996; Redolar-Ripoll y col., 2002) y a largo plazo (11 y 30 días) (Segura-Torres y col., 1991).



2. El efecto de la AEIC post-entrenamiento se puede sumar al producido por la reactivación de una memoria causando una mayor facilitación a largo plazo de la recuperación de esa memoria (Soriano-Mas y col., 2007).
3. Los efectos de la AEIC son más potentes y efectivos que la repetición de la experiencia (Redolar-Ripoll y col., 2002).
4. La AEIC afecta especialmente a los sujetos con menores capacidades iniciales de aprendizaje (Aldavert-Vera y col., 1996). Los sujetos Control, no tratados, pueden llegar a igualar el nivel de aprendizaje y/o memoria de los sujetos tratados, pero necesitan más entrenamiento y tiempo para ello (Aldavert-Vera y col., 1996). Por ello, el principal efecto de la AEIC post-entrenamiento podría consistir en una aceleración del proceso de consolidación de la memoria.
5. En la EV2, el tratamiento de AEIC post-entrenamiento ha sido capaz de facilitar consistentemente la consolidación de la memoria incluso en animales con muy poco entrenamiento de adquisición (5 ensayos durante una única sesión de condicionamiento) (Ruiz-Medina y col., 2007).
6. La AEIC se ha mostrado capaz de revertir amnesias experimentalmente inducidas. Así, este tratamiento ha revertido el déficit de aprendizaje y memoria causado por la lesión del núcleo Parafascicular (PF) del tálamo en ratas jóvenes y viejas y les ha permitido alcanzar niveles de aprendizaje y memoria significativamente superiores a los que hubieran conseguido sin tratamiento Redolar-Ripoll y col., 2003).

Por todo ello, creemos importante poder generalizar este efecto a otros tipos de memoria dependientes de diferentes sustratos neurales como la memoria explícita. En esta línea, realizamos un experimento en el que tras el entrenamiento en una tarea de alternancia espacial demorada administramos el tratamiento de AEIC y comprobamos sus efectos en 3 fases consecutivas de aprendizaje que intentaban dificultar progresivamente la adquisición de la tarea: fase D10 (10 s demora), fase D30 (30 s demora) y fase INV (se invertía la posición de inicio del animal para hacer su respuesta más dependiente de claves alocéntricas). Cada fase finalizaba cuando las ratas alcanzaban un criterio fijo de aprendizaje. Observamos que cuando la posición inicial de los animales se invertía aleatoriamente (fase INV) sólo las ratas que habían recibido el tratamiento de AEIC post-entrenamiento mantenían el nivel de ejecución adquirido en las fases previas de adquisición. De ese modo, el tratamiento de AEIC post-entrenamiento facilitó la expresión flexible de la respuesta aprendida (Soriano-Mas y col., 2005). Aunque este hallazgo podría considerarse como una prueba de la capacidad de la AEIC para facilitar también la memoria explícita, relacional o hipocampo-dependiente, en el presente trabajo pretendemos contrastar esa hipótesis usando un paradigma de aprendizaje espacial en el Laberinto Acuático de Morris (LAM).

El LAM fue diseñado en 1981 por Richard G. Morris para estudiar y evaluar el aprendizaje y la memoria espacial en ratas de laboratorio. En el paradigma clásico, se introduce al sujeto experimental en una pequeña piscina circular que contiene, sumergida unos pocos centímetros por debajo del nivel del agua, una plataforma en la que la rata puede situarse para evitar tener que nadar continuamente. Una serie de claves o señales visuales ayudan al animal a localizar la plataforma. En cada ensayo de entrenamiento se registran los valores de varios parámetros como el tiempo que el animal tarda en alcanzar la plataforma (latencia de escape), el tiempo que pasa en cada zona o cuadrante de la piscina, la trayectoria de nado y la distancia total recorrida. En los sucesivos ensayos, el animal tarda cada vez menos en encontrar la plataforma porque ha

aprendido a localizarla estableciendo una relación espacial entre las claves visuales distales del entorno.

El LAM ha sido especialmente usado para valorar el rol del hipocampo en la formación de memorias espaciales dado el papel crítico que esta estructura tiene en paradigmas de aprendizaje en los que es necesario memorizar relaciones complejas entre estímulos ambientales (Eichenbaun, 1996; Squire, Knowlton y Musen, 1993). En concreto, se ha sugerido que el hecho de tener que establecer relaciones entre los diferentes objetos o claves visuales externos al laberinto y a la plataforma hace al LAM sensible a disfunciones hipocampales (Morris, 1984, 1990). En apoyo de esta hipótesis, se ha observado que las lesiones excitotóxicas del hipocampo deterioran el aprendizaje espacial en el LAM, en ratones (Gerlai y col., 2002; Logue y col., 1997) y ratas (Moser y col., 1995). También se ha observado que pacientes humanos con lesiones en el hipocampo presentan serias dificultades para encontrar la plataforma en un test virtual del LAM (Astur y col., 2002).

**Por todo ello, el presente trabajo pretende estudiar si la AEIC post-entrenamiento, además de facilitar el aprendizaje y la formación de la memoria en paradigmas como los ya estudiados de memoria implícita, puede facilitar también el aprendizaje y la formación de la memoria en un paradigma de memoria espacial explícita o relacional, hipocampo-dependiente, en el Laberinto Acuático de Morris, en ratas Wistar.**

Dado que nuestra investigación previa ha puesto de manifiesto que el efecto de la AEIC para facilitar el aprendizaje y la memoria podría ser sensible a la capacidad básica o inicial de los sujetos para aprender las tareas (Aldavert-Vera y col., 1996), los 4 experimentos que hemos realizado fueron diseñados para dificultar progresivamente el aprendizaje en el LAM reduciendo en cada siguiente experimento la cantidad de ensayos de entrenamiento administrados a los sujetos.

**II. MARCO TEÓRICO Y  
ANTECEDENTES  
EXPERIMENTALES**

## II. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES EXPERIMENTALES

### 1. SISTEMAS CEREBRALES DEL REFUERZO

#### 1.1 INTRODUCCIÓN

El cerebro puede utilizar la información reforzante para modular el aprendizaje y mantener, controlar y evitar la extinción de conductas. Para ello, los sujetos deben ser capaces de extraer la información reforzante de una gran variedad de estímulos y situaciones. Así, las neuronas que detectan la aparición de un refuerzo procesan la información sobre su valor motivacional y su identidad. Esta información podría ayudar a crear representaciones neurales que permitan a los sujetos esperar refuerzos futuros acordes a la experiencia previa y a adaptar su conducta a los cambios en las contingencias del propio refuerzo (Schultz, 2000). La complejidad de las relaciones existentes entre los procesos de percepción, predicción y valoración de los estímulos con propiedades motivacionales parece requerir la existencia de múltiples estructuras cerebrales (Schultz, 2000). En los últimos años se ha generado un creciente interés por el estudio del procesamiento neuronal del refuerzo. Diferentes aproximaciones experimentales, ya sean la lesión de determinadas estructuras cerebrales, la administración de fármacos y sustancias adictivas, las técnicas de neuroimagen e incluso la utilización de métodos fisiológicos como la microdiálisis *in vivo*, la voltametría y la estimulación eléctrica del cerebro, han intentado determinar cómo se lleva a cabo este procesamiento y cuáles son las estructuras implicadas (Elliott y col., 2000; Fiorino y col., 1997; Robbins y Everitt, 1996; Robinson y Berridge, 1993; Wise y Hoffman, 1992; Young y col., 1992).

El descubrimiento, llevado a cabo por J. Olds y P. M. Milner en 1954, de que las ratas podían aprender a realizar diferentes tipos de conducta (como por ejemplo, apretar una palanca) para autoadministrarse corriente eléctrica del orden de  $\mu\text{A}$ , estimulante y reforzante, en zonas del SNR a través de electrodos crónicamente implantados en las mismas, se convirtió en el punto de partida

experimental de los estudios sobre la neurofisiología del refuerzo (para una revisión ver Olds, 1958). El fenómeno de la AEIC se ha observado en todos los vertebrados estudiados: ratas, perros, palomas, peces y primates (Rolls, 1975, 1999), incluido el ser humano (Heath, 1963), y se ha obtenido en una gran variedad de localizaciones encefálicas. En el caso de la rata, la AEIC se puede obtener en estructuras que conforman la quinta parte del volumen total de su cerebro, incluyendo localizaciones tan rostrales como el córtex prefrontal (CPF) y el bulbo olfatorio (BO) y tan caudales como el bulbo y el cerebelo (Yeomans, 1990). En la figura 1 se muestran las diferentes áreas del sistema nervioso central de la rata donde se ha observado conducta de AEIC.

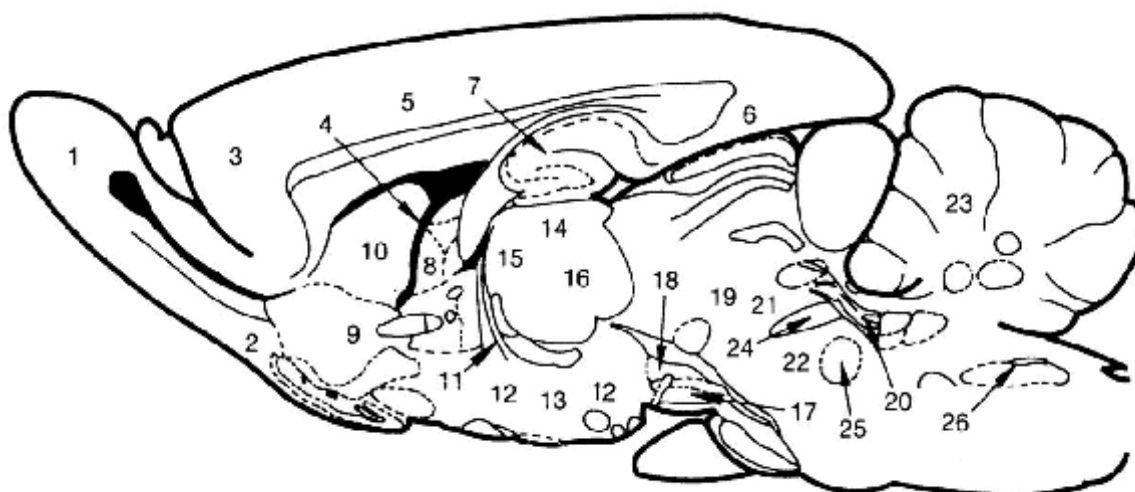


Fig. 1. Resumen de las principales áreas en el cerebro de rata donde se puede obtener la conducta de autoestimulación a través de la estimulación eléctrica. TELENCEFALO: 1. Bulbo olfatorio, 2. Córtex prepiriforme, 3. Córtex prefrontal medial, 4. Órgano subfornical, 5. Córtex cingulado, 6. Córtex entorrinal, 7. Hipocampo, 8. Séptum, 9. Núcleo accumbens, 10. Caudado-Putamen. DIENCEFALO: 11. Fórnix, 12. Hipotálamo lateral (haz prosencefálico medial), 13. Hipotálamo ventromedial, 14. Núcleo mediodorsal del tálamo, 15. Núcleo paratenial del tálamo, 16. Núcleo central del tálamo. MESENCEFALO: 17. Sustancia negra, 18. Área tegmental ventral, 19. Sustancia gris periacueductal, 20. Núcleo mesencefálico del nervio trigémino, 21. Rafe dorsal, 22. Rafe medial. METENCEFALO: 23. Cerebelo, 24. Pendúnculos cerebelosos superiores, 25. Núcleo motor del nervio trigémino. MIELENCEFALO: 26. Núcleo del tracto solitario. Estructuras no mostradas: Córtex prefrontal sulcal, Globo pálido, amígdala y habénula. (Phillips y Fibiger, 1989).

La AEIC es un método empírico útil, no únicamente para estudiar el SNR sino también para analizar diversos procesos emocionales y cognitivos (Easterling y col., 2000; Ikeda y col., 2001; Nielsen y col., 2000; Phillips y Fibiger, 1989). En el paradigma experimental de la AEIC, los animales deben aprender la asociación entre una tarea operante y los efectos reforzantes de la administración de la estimulación eléctrica contingente a la respuesta. Asimismo, deben recordar esta asociación para guiar su propia conducta y realizar respuestas selectivas hacia la palanca asociada con la AEIC, suprimiendo otras conductas.

Con el descubrimiento del fenómeno de la AEIC surgió la idea de que la estimulación eléctrica cerebral reforzante podría activar los mismos circuitos que activaban los incentivos naturales, como la comida y el sexo (Wise, 1996b). A partir de este punto de vista, fueron surgiendo evidencias experimentales que mostraban la posible existencia de múltiples estructuras neurales subyacentes tanto al reforzamiento natural como a la estimulación eléctrica cerebral (Olds y col., 1971). La duda radicaba en si estas localizaciones anatómicas se organizaban en paralelo a través de múltiples circuitos de refuerzo (Phillips, 1984), o bien formaban un sistema único que interconectaría dichas localizaciones anatómicas de una forma seriada (Wise, 1996b; Wise y Bozarth, 1984). Inicialmente, se supuso que la AEIC era un fenómeno unitario localizado en algún sistema neural, y que sus propiedades eran las mismas con independencia del punto de estimulación. No obstante, resultados posteriores pusieron de manifiesto que la estimulación reforzante del cerebro era un fenómeno extremadamente complejo que implicaba diferentes sistemas independientes (Milner, 1991; Phillips, 1984; Phillips y Fibiger, 1989; Robertson, 1989). Clásicamente se han identificado 4 sistemas que podrían considerarse como substratos independientes del refuerzo: el sistema del HPM, un circuito originado en la Corteza Prefrontal (CPF), el sistema locomotor mesolímbico-estriatopalidal-mesencefálico, y un circuito del cerebro posterior relacionado con la conducta refleja oral gustativa.

## 1.2 NEUROANATOMÍA DEL REFUERZO

Un buen número de trabajos y resultados experimentales han puesto de manifiesto la existencia de diferentes circuitos o sistemas neurales implicados en el refuerzo cognitivo y conductual. Los más importantes y estudiados hasta el momento son los relacionados con el haz prosencefálico medial, la corteza cerebral y los núcleos estriados. A ellos nos referiremos a continuación.

### 1.2.1 Haz prosencefálico medial

El HPM está compuesto por un conjunto de axones dispuestos en un eje caudal-rostral, desde el mesencéfalo hasta el prosencéfalo basal (PB). Este haz relaciona anatómicamente y funcionalmente diversas regiones del sistema nervioso donde puede obtenerse la conducta de AEIC (Rolls, 1999), y es donde esta conducta presenta tasas de respuestas más altas y con mayor estabilidad a lo largo del tiempo (Ikemoto y Panksepp, 1999). Su estimulación provoca la aparición de vigorosas conductas de AEIC, como en el caso de la rata que adquiere rápidamente tasas de 100 respuestas por minuto que se mantienen de manera sostenida durante horas hasta la extenuación física (Ikemoto y Panksepp, 1999). El HPM está formado por axones largos ascendentes y descendentes, que interconectan entre sí estructuras prosencefálicas y mesencefálicas, y por axones cortos que conectan regiones adyacentes. Mediante técnicas de histofluorescencia se ha comprobado que, en su trayectoria desde el tronco del encéfalo hasta sus proyecciones diencefálicas y telencefálicas, este haz contiene axones ascendentes dopaminérgicos, noradrenérgicos y serotoninérgicos (Nieuwenhuys y col., 1982). Las neuronas noradrenérgicas conectan mayoritariamente estructuras del hemisferio contralateral mientras que las neuronas dopaminérgicas mantienen una posición mayoritariamente ipsilateral (Fuxe y col, 1985)

Las proyecciones descendentes son básicamente de naturaleza dopaminérgica (Bielajew y col., 1987), y parecen muy relacionadas con la producción del propio efecto reforzante (Wise, 1980, 1996b). Los axones descendentes se originan en su



mayor proporción en el área septal, el hipocampo, la banda diagonal de Broca (BDB) y las células circundantes de los islotes de Calleja (Phillips y Fibiger, 1989); aunque en menor proporción, también proceden del neostriado, del núcleo accumbens (Acc), de la corteza piriforme, de la corteza olfatoria, de la corteza orbitofrontal, del núcleo del lecho de la estría terminal (BST), de la sustancia innominata (SI), del núcleo dorsomedial del hipotálamo y de los núcleos dorsomedial y paraventricular del tálamo (Gallistel y col., 1989; Glimcher y Gallistel, 1989; Nieuwenhuys y col., 1982; Rompré y Milliaresis, 1985; Stellar y Stellar, 1985). La mayoría de los fascículos descendentes convergen en el área preóptica del hipotálamo (AP) y en el HL (Phillips y Fibiger, 1989), proyectando en mayor medida sobre el área tegmental ventral (ATV) (Fuxe y col., 1985) y, de forma más reducida, sobre el núcleo interpeduncular, la sustancia gris central, la sustancia gris central mesencefálica, el núcleo mesencefálico del nervio trigémino, el núcleo cuneiforme, el locus coeruleus (LC), el núcleo *ambiguus*, el núcleo reticular lateral, el núcleo del tracto solitario (NTS) y sobre los centros autónomos preganglionares del bulbo y de la médula espinal.

La estimulación del HL y del ATV a lo largo del HPM resulta altamente reforzante (Rolls 1975, 1999). Algunos autores han sugerido que el circuito anatómico crítico responsable de los efectos reforzantes de la AEIC del HPM es el constituido por el HL, el ATV y el estriado ventral (ver figura 2).

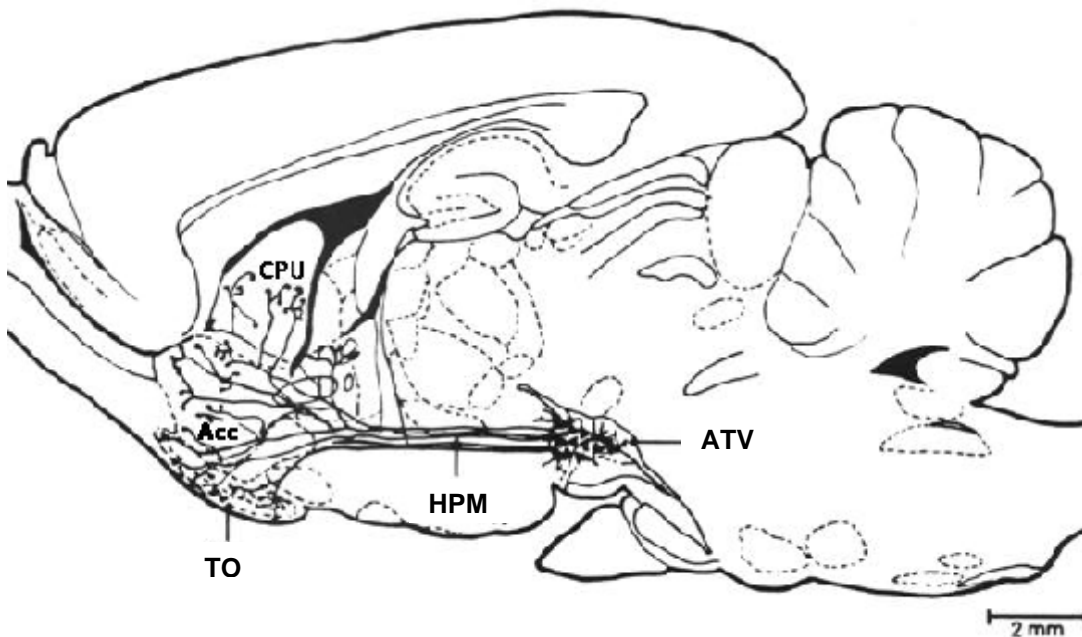


Fig. 2. Sistema dopaminérgico mesolímbico. Acc: núcleo accumbens; ATV: área tegmental ventral; CPU: complejo caudado-putamen; HPM: haz prosencefálico medial; TO: tubérculo olfatorio. Adaptado de Yeomans (1990).

Parece ser que este circuito crítico se origina en el área preóptica medial (APM) y en el HL, lugar de convergencia de las aferencias descendentes de este haz. Desde aquí, los axones sinaptan con estructuras dopaminérgicas mesencefálicas, entre las que destaca el ATV. Los axones eferentes del sistema dopaminérgico mesolímbico conectan el mesencéfalo con el Acc, estructura considerada como el destino final de este circuito (Yeomans, 1990).

### 1.2.2 Otros sistemas del refuerzo.

#### *A. Circuito cortico-límbico*

Se trata de un circuito originado en la CPF con proyecciones caudales, a través del cíngulo, al área entorrinal. Estas proyecciones recíprocas entre la CPF y el área entorrinal, junto con otras conexiones entre el córtex entorrinal y regiones límbicas, como el hipocampo, amígdala y Acc, constituyen circuitos claves a través de los cuales se puede modular la formación de memorias multimodales

y la actividad locomotora exploratoria (Swanson, 2000; Swanson y Kohler, 1986). Anatómicamente, la CPF, en mamíferos, está formada por las áreas corticales cercanas a los polos frontales que reciben proyecciones del núcleo dorsomedial del tálamo (Fuster, 1991, 1995), aunque también reciben proyecciones del núcleo ventral anterior, del pulvinar medial y del complejo nuclear suprageniculado-limitante (Estévez-González, y col., 2000). La CPF recibe importantes proyecciones dopaminérgicas provenientes del mesencéfalo a través del sistema mesocortical (Carr y Sesack, 2000; Garris, y col., 1993; Hedou y col., 1999; Ihalaenen y col., 1999). En cualquier caso, y como veremos más adelante, la DA de la CPF pudiera no ser tanto una señal de refuerzo *per se* sino más bien una señal asociada con la novedad y con la expectación de un refuerzo (Feenstra, y col., 1999; Feenstra y Botterblom, 1996; Rebec y col., 1997; Richardson y Gratton, 1998; Schultz, 2000; Yee, 2000). La CPF carece de conexiones especiales con las áreas motoras y sensoriales primarias, y tampoco envía proyecciones a la médula espinal (Preuss, 1995).

Las neuronas de la CPF muestran una predisposición para el aprendizaje de asociaciones entre claves sensoriales, acciones voluntarias y refuerzos (Asaad y col., 1998; Eacott, y Gaffan, 1992; Fuster y col., 2000; Miller, 2000; Rainer y col., 1998; Romo y col., 1999; Parker y Gaffan, 1998) y a menudo responden ante reglas complejas susceptibles de servir como guías de la conducta (Gehring y Willoughby, 2002). Se ha podido comprobar que la información reforzante tiene una influencia generalizada sobre la actividad de la CPF lateral (CPF<sub>L</sub>) y ventromedial, actividad que transmite la identidad y magnitud de los refuerzos esperados (Leon y Shadlen, 1999; Tremblay y Schultz, 1999; Watanabe, 1990, 1992, 1996).

Entre las numerosas pruebas que implican a las neuronas de la CPF en los mecanismos de refuerzo cerebral (Gehring y Willoughby, 2002; Tzschentke, 2000), quizás la principal sea la observación de que en esta zona cortical se puede inducir y mantener la conducta de AEIC (Karreman y Moghaddam,

1996; McGregor y col., 1992; Mora y col., 1980; Mora, 1978; Mora y Cobo, 1990; Phillips y col., 1981; Routtenberg y Sloan, 1972; Taber y Fibiger, 1995). No obstante, dado que el efecto principal de la AEIC en la CPF parece ser la activación de los axones glutamatérgicos aferentes al ATV, estructura que, por su parte, incrementa la liberación subcortical de DA (Fiorino y col., 1993; Lada y col., 1998; Rossetti y col., 1998; Taber y col., 1995; Tzschentke y col., 1997; You y col., 1998), los mecanismos críticos para los efectos reforzantes de la AEIC en la CPF podrían no involucrar a los inputs dopaminérgicos sino a las células piramidales y sus proyecciones glutamatérgicas al mesencéfalo (Tzschentke, 2001). En ese sentido, hay resultados experimentales que dan soporte a la idea de una interacción funcional entre los sistemas de neurotransmisión dopaminérgico y glutamatérgico en la CPF (Bacon y col., 1996; Bao y col., 2001; DeFelipe y Farinas, 1992; Gionani y col., 1999; Kuroda y col., 1996; Miller, 2000; Pirot y col., 1994, 1995; Williams y Goldman-Rakic, 1995).

La AEIC en la CPF se caracteriza por tasas de respuesta bajas, intensidades de corriente estimulante altas y adquisición lenta de respuestas estables (Mora y Cobo, 1990). A nivel anatómico, diferentes trabajos sugirieron que los efectos reforzantes de la estimulación eléctrica del HPM y de la CPF no involucraban la activación de los mismos circuitos neurales (Colle y Wise, 1987; Gallistel y col., 1981; Huston y col., 1982; Phillips y Fibiger, 1989; Robertson, 1989; Schenk y col., 1985; Schenk y Shizgal, 1982, 1985; Stellar y col., 1982; Yadin y col., 1983). No obstante, datos más actuales han mostrado que las señales de refuerzo de la CPF pueden sumarse a las señales provenientes del HPM, sugiriendo cierto tipo de solapamiento subyacente a la respuesta fisiológica de estos dos circuitos neurales (Arvanitogiannis y col., 1996; 1997, 2000; Conover y Shizgal, 1992; Flores y col., 1997; Hunt y McGregor, 1998; Trzcinska y Bielajew, 1998).

#### *B. Circuito corticolímbico-estriadopalidal*

El estriado ventral recibe aferencias de diferentes estructuras corticolímbicas, como la amígdala basolateral, el hipocampo o la CPF y, entre muchas otras

estructuras, proyecta al pálido ventral. Las eferencias de este núcleo incluyen regiones motoras del tronco del encéfalo (sustancia negra, núcleo subtalámico o núcleos pedúnculo-pónticos tegmentales), por lo que este circuito límbico-estriatal-palidal proporciona el mecanismo neural a través del cual la motivación puede transformarse en acción (Mogenson y col., 1980; Robbins y Everitt, 1996). La información sobre la posible aparición de los reforzadores, codificada por estructuras cortico-límbicas como la amígdala o el hipocampo, llega al estriado ventral en forma de aferencias glutamatérgicas. En este nivel, la interacción con el sistema dopaminérgico mesolímbico proveniente del ATV regula la activación de las neuronas gabaérgicas que transportan la información desde el estriado ventral al palidal ventral, de manera que el núcleo Acc actúa como una *interface* límbica-motora, ya que en él la información sobre las características reforzantes de los estímulos puede afectar la selección de conductas motivadas dirigidas a incentivos.

### *C. Circuito gustatorio-trigeminal*

Este circuito, localizado en el cerebro posterior, se ha relacionado con la conducta refleja oral gustatoria y con el valor reforzante de los estímulos gustativos, de manera que el sistema trigeminal está involucrado tanto en el control sensoriomotor de la alimentación como en su control motivacional (Zeigler, 1975). Este circuito neural procesa estímulos reforzantes independientemente de otros sistemas homeostáticos más complejos (Norgren y Grill, 1982; Phillips y Fibiger, 1989). Se ha podido comprobar que animales con cerebro aislado pueden auto-mantenerse si se les permite el acceso a agua y comida y como esta información tiene características reforzantes (Norgren y Grill, 1982).

En conclusión, podemos decir que la información relacionada con el refuerzo es procesada por estructuras cerebrales de diferentes formas y finalidades y, por tanto, los estímulos reforzantes pueden afectar a la conducta a través de la acción de circuitos neurales claramente dissociables (Robertson, 1989). No

obstante, el control efectivo del comportamiento parece asegurado por la interacción anatómica y funcional de esos diferentes circuitos o sistemas neurales.

### **1.3 NEUROQUÍMICA DEL REFUERZO: PAPEL DE LA DOPAMINA**

Desde que se observó el fenómeno de la AEIC, muchos han sido los trabajos que han intentado caracterizar anatómica y electrofisiológicamente a las neuronas directamente implicadas en el refuerzo mediado por este tipo de conducta. La explicación más defendida hasta nuestros días, apoyada por diferentes aproximaciones experimentales, ha sido la “hipótesis dopaminérgica del refuerzo”. Existen múltiples trabajos que han sugerido la implicación de la DA en los efectos reforzantes producidos por la estimulación eléctrica del HPM (Ikemoto y Panksepp, 1999; Nakahara y col., 2000; Shizgal y Murray, 1989; Wise, 1982, 1996a, 1996b; Wise and Bozarth, 1984) y, en general, las estructuras mesencefálicas donde se ubican los cuerpos celulares dopaminérgicos y sus proyecciones telencefálicas están entre las zonas más importantes donde se pueden obtener tasas estables de AEIC (Corbett y Wise, 1980; Crow, 1972; Phillips 1989).

La estimulación eléctrica reforzante del HPM incrementa los niveles de DA en el Acc tanto si los animales se autoadministran la corriente estimulante (Blaha y Phillips, 1990; Phillips y col., 1992; Rada y col., 1998; Taber y Fibiger, 1995) como si es el experimentador el que la administra (Gratton y col., 1988; Hernández y Hoebel, 1988; Rada y col., 1998). Existen pruebas experimentales que demuestran que la AEIC del HPM puede inducir un incremento de la síntesis intraneuronal de DA en las regiones terminales dopaminérgicas (Fiorino y col., 1993; Nakahara y col., 1992) e incrementar también la actividad metabólica en muchas de las áreas de proyección de esas vías (Esposito y col., 1984; Porrino y col., 1984, 1990). Más aún, se ha podido comprobar que las lesiones selectivas de las neuronas dopaminérgicas disminuyen la conducta de AEIC (Fibiger y

col., 1987; Phillips y Fibiger, 1989) y que la manipulación farmacológica de la neurotransmisión dopaminérgica tiene efectos significativos sobre la misma (Corbett, 1990; Fouriezos y Wise, 1976; Franklin, 1978; Gallistel y Freyd, 1987; Hunt y col., 1994; Stellar y col., 1983). Así, los agonistas y antagonistas dopaminérgicos, respectivamente, facilitan y deterioran la conducta de AEIC del HPM, efectos que parecen estar mediados por el Acc (Colle y Wise, 1988; Mogenson y col., 1979; Stellar y Corbett, 1989; Stellar y col., 1983).

Otros trabajos han estudiado los diferentes subtipos de receptores para la DA y su relación con los sistemas de refuerzo cerebral. Se ha visto que los receptores D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> pueden estar implicados de diferente manera en la AEIC del HL y del ATV. Mientras que la administración de antagonistas D<sub>1</sub> en el Acc facilita la conducta de AEIC del HL y del ATV, la activación de los receptores D<sub>2</sub> tiene efectos opuestos (Singh y col., 1997b). En general, parece existir una relación positiva entre la transmisión dopaminérgica, en especial la relacionada con los receptores D<sub>1</sub> y el efecto reforzante.

El circuito crítico en la producción del efecto reforzante de la AEIC del HPM parece involucrar a las fibras descendentes provenientes del HL que llegan hasta el ATV, donde sinaptan con neuronas que, a su vez, liberan DA en el Acc. Un hecho que respalda estas consideraciones es que diferentes estudios farmacológicos han mostrado que la autoadministración de drogas psicoestimulantes como la anfetamina y la cocaína incrementa la liberación de DA en el Acc (Di Chiara y col., 1995; Koob y LeMoal, 1997; Koob y Nestler, 1997; Wise, 1996a) y de forma paralela aumentan la tasa de AEIC (Blaha y Phillips, 1990; Colle y Wise, 1988; Milner, 1991; Rolls, 1999). Otros trabajos experimentales apoyan también la idea de que las neuronas directamente estimuladas por la AEIC de HPM se integran, en algún nivel del circuito, con las proyecciones dopaminérgicas ascendentes originando una vía común para todo tipo de refuerzos (Brown y col., 1992; Graybiel y col., 1990; Hope y col., 1992; Koob y Bloom, 1988; Nguyen y col., 1992; Norman y col., 1993; Persico y

col., 1993).

No obstante, existen también resultados que han cuestionado el papel crítico de la DA en los efectos reforzantes de la AEIC del HPM. Por ejemplo, se ha obtenido conducta de AEIC con estímulos eléctricos que no activan axones dopaminérgicos (Murray y Shizgal, 1994) o en condiciones en las que no se ha observado una liberación continua de DA (Garris y col., 1999; Hernández y col., 2006). En esta línea, trabajos de microdiálisis *in vivo* (Garris y col., 1999; Kilpatrick y col., 2000) han mostrado que la liberación de DA se produce durante los ensayos iniciales de AEIC, atenuándose de forma progresiva con la estimulación continua. Los autores de estos trabajos han postulado que la DA sería el sustrato neural de la novedad y la expectación del refuerzo más que el sustrato neural del refuerzo propiamente dicho. Ello además corrobora los resultados mostrados por Rebec y colaboradores que observaron una liberación de DA en el Acc en ratas expuestas de forma transitoria a ambientes nuevos (Rebec y col., 1997).

En otros experimentos se ha observado asimismo que las neuronas dopaminérgicas del HPM se activan ante estímulos salientes y no específicamente ante reforzadores (Berridge y Robinson, 1998; McClure y col., 2003; Montague y col., 1996; Schultz y col., 1997; Schultz, 1998, 2002). En concreto, se ha puesto de manifiesto que: 1. los estímulos sensoriales salientes como tonos y luces (los cuales no son reforzantes) incrementan la actividad de las neuronas dopaminérgicas (Feenstra y Botterblom, 1996; Horvitz y col., 1997; Ljungberg y col., 1992), 2. los estímulos aversivos incrementan la tasa de respuesta de una minoría (3-49 %) de neuronas putativas dopaminérgicas (Guarraci y Kapp, 1999; Mantz y col., 1989; Schultz y Romo, 1987) y 3. la liberación de DA aumenta lentamente tras la presentación de estímulos aversivos (Horger y Roth, 1996). Un trabajo de Neill y colaboradores (2002) puso también de manifiesto que la transmisión dopaminérgica en el Acc está relacionada con el coste de la respuesta hipotalámica de autoestimulación más



que con su efecto reforzante. Con todo, más recientemente, estos hallazgos vuelven a ser rebatidos en el contexto de la teoría dopaminérgica del refuerzo que, como ya hemos dicho, defiende que las neuronas dopaminérgicas se activan específicamente ante estímulos con valor reforzante (ver trabajo Ungless, M., 2004).

En los últimos años, otros trabajos experimentales han intentado relacionar el efecto reforzante producido por la AEIC con otros sistemas de neurotransmisión. Entre ellos están los que relacionan al glutamato con los procesos de refuerzo cerebral (Bespalov y Zvartau, 1997; Cervo y Samanin, 1995; Segal y col., 1995; Tzschentke y Schmidt, 1995; You y col., 2001). En este sentido, se ha comprobado que la administración de MK-801, un antagonista no competitivo del receptor NMDA, es capaz de potenciar la conducta de AEIC (Carlezon y Wise, 1993; Herberg y Rose, 1989), y que el pretratamiento con antagonistas dopaminérgicos bloquea este efecto facilitador sin suprimir la conducta de AEIC del HL. Además, el tratamiento combinado de MK-801 y anfetamina produce una facilitación de AEIC superior a la obtenida con cada tratamiento por separado. Por otro lado, Herberg y Rose (1990) han mostrado que la infusión en el ATV de un antagonista específico del receptor NMDA, el 2-AP5, no modifica la AEIC del HL, sin embargo las microinyecciones de NMDA en esta misma área disminuyen la AEIC de forma significativa. De este modo y como ya dijimos anteriormente, podría existir una cooperación entre el sistema glutamatérgico y el dopaminérgico en la regulación de la función reforzante de la AEIC del HPM.

Por otro lado, en el HPM se ha podido caracterizar una población homogénea de neuronas gabaérgicas que poseen períodos refractarios que entran dentro del rango determinado para las fibras directamente estimuladas por la AEIC en ese haz (Lassen y col., 2007; Steffensen y col., 1998). La tasa de respuesta de esa población celular correlaciona con la generación de arousal cortical, sugiriendo que tales neuronas gabaérgicas estarían relacionadas con los procesos

atencionales del animal hacia estímulos potencialmente reforzantes o hacia estímulos que predicen la aparición del refuerzo (Lee y col., 1997, 2001). Otros resultados han puesto de manifiesto que la tasa de respuesta de dichas neuronas gabaérgicas aumenta con la AEIC en el HPM (Steffensen y col., 2001; Lassen y col., 2007). Además, se ha podido comprobar que: 1. la autoadministración de heroína también incrementa la actividad de estas neuronas (Kiyatkin y Rebec, 2001; Lee y col., 2000), mostrando un perfil de respuesta cualitativamente similar al de la AEIC del HPM (Steffensen y col., 2001), 2. la administración de antagonistas gabaérgicos disminuye las tasas de respuesta de AEIC del HPM y aumenta los umbrales de la misma (Macey y col., 2001; Singh y col., 1997a; Willick y Kokkinidis, 1995) y 3. la AEIC del HPM incrementa la expresión de la proteína *Fos* en las células gabaérgicas del PPTg y del LDTg (Nakahara y col., 2001) e induce la expresión diferencial de la proteína *Fos* en las neuronas gabaérgicas de los núcleos monoaminérgicos del tronco del encéfalo (Ishida y col., 2001). Por tanto, las neuronas gabaérgicas del HPM se localizarían en una posición crítica para modular la actividad de las células dopaminérgicas implicadas en el refuerzo (Steffensen y col., 1998).

En conclusión, aunque la idea de que la DA es el neurotransmisor crítico para los efectos reforzantes de la AEIC ha sido ampliamente confirmada por multitud de trabajos experimentales, no podemos descartar la participación de otros sistemas de neurotransmisión, como el glutamatérgico y el gabaérgico, en los efectos hedónicos de este tratamiento.

## 2. SISTEMA CEREBRAL DE REFERENCIA ESPACIAL

### 2.1 INTRODUCCIÓN

Atendiendo a sus características conductuales y a las estructuras cerebrales implicadas, se han establecido tres sistemas de memoria: la implícita (MI), la explícita y la de trabajo. La memoria implícita, también llamada procedimental o no declarativa es la memoria de las cosas que solemos hacer. Su expresión es en gran medida automática, inconsciente y difícil de verbalizar. Se adquiere gradualmente y se perfecciona con la práctica. Suele ser una memoria fiel, rígida y duradera, derivada de tipos de aprendizaje básico y filogenéticamente antiguo, como la habituación y la sensibilización, el aprendizaje perceptivo y motor o los condicionamientos clásico e instrumental (Morgado-Bernal, 2005). Anatómicamente es un sistema heterogéneo. Así, diferentes estructuras han sido relacionadas con aprendizajes procedimentales, como por ejemplo, los ganglios basales con los aprendizajes de hábitos y habilidades (Packard y col., 1989), el cerebelo con los condicionamientos de respuestas motoras (Thompson y Krupa, 1994), o la amígdala con los condicionamientos emocionales (LeDoux, 1995). No obstante, si bien el principal lugar de almacenamiento de la memoria implícita radica en estructuras subcorticales, en casos como en el *priming*, el aprendizaje depende directamente del neocórtex (Milner y col., 1998).

El segundo sistema es el de la memoria declarativa también llamada memoria explícita (ME), relacional o cognitiva. Es el almacenamiento cerebral de hechos (memoria semántica) y eventos (memoria episódica) (Tulving y Markowitsch, 1998). A diferencia de la MI, este tipo de memoria puede adquirirse en uno o pocos ensayos y tiene como destacada particularidad poder expresarse en situaciones y modos diferentes a los del aprendizaje original, es decir, es una memoria de expresión flexible. El hipocampo parece especialmente relacionado con la consolidación de la memoria explícita, es decir, con su transferencia desde la memoria a corto plazo a la memoria a largo plazo (Morgado-Bernal, 2005). Hablamos especialmente de ella en el punto 2.2.

El tercer sistema es el de la memoria de trabajo, también llamada cognición ejecutiva, que consiste en la representación consciente y manipulación temporal de la información necesaria para realizar operaciones cognitivas complejas, como el aprendizaje, la comprensión del lenguaje o el razonamiento (Morgado-Bernal, 2005; Tulving, 2000). La corteza pre-frontal podría ser la sede de la memoria de trabajo, es decir, un lugar para mantener *on line* durante cortos periodos de tiempo representaciones de estímulos ausentes (Golman-Rakic y col., 1998).

## **2.2 SISTEMA DE LA MEMORIA DECLARATIVA: ANATOMÍA DEL LÓBULO TEMPORAL MEDIAL**

El lóbulo temporal medial está críticamente relacionado con la memoria declarativa o relacional. En este lóbulo encontramos diferentes estructuras que, generalmente, se agrupan bajo los nombres de hipocampo o sistema hipocampal (áreas CA1-4, giro dentado y subículo), formación hipocampal (hipocampo y corteza entorrinal) (Mishkin y col., 1997) y región parahipocampal (corteza parahipocampal y corteza perirhinal) (Eichenbaum, 2000). Estas estructuras están organizadas de forma jerárquica. La región parahipocampal recibe aferencias convergentes de áreas de asociación corticales y distribuye estas aferencias hacia la corteza entorrinal que a su vez, proyecta hacia el hipocampo. La corteza de la región parahipocampal, no obstante, no sólo es la principal vía de entrada de aferencias corticales a la formación hipocampal sino también su principal vía de salida, constituyendo así, un importante enlace entre la formación hipocampal y diversas áreas de asociación cortical.

Las aferencias corticales a la región parahipocampal provienen de diferentes áreas neocorticales de asociación unimodal y polimodal. En el caso de los primates, se considera que las cortezas más ventrales, como el área TE y la TEO del lóbulo temporal, proporcionan las 2/3 partes de la entrada cortical a la

corteza perirhinal, que por lo tanto, recibe una importante entrada de información referente a las características y significado de los estímulos, tanto de tipo visual como de otras modalidades sensoriales (Burwell y Eichenbaum, 1999; Suzuki y Amaral, 1994a; Zola y Squire, 1999). Por su parte, la corteza parahipocampal, recibe las entradas corticales de áreas de procesamiento dorsal como la corteza parietal posterior, la corteza retrosplenial, la corteza prefrontal dorsolateral o de la parte dorsal del surco temporal superior (Suzuki y Amaral, 1994a), muy implicadas en codificar la localización espacial de los estímulos (Mishkin y col., 1997). Las cortezas parahipocampal y perirrinal proyectan a diferentes subdivisiones de la corteza entorrinal (Burwell y Eichenbaum, 1999; Suzuki y Amaral, 1994b), que a su vez envía eferencias al hipocampo. La corteza entorrinal también recibe aferencias directas de la corriente de procesamiento dorsal (Brown y Aggleton, 2001), de la misma manera que el hipocampo recibe aferencias directas de las cortezas parahipocampal y perirrinal (Suzuki y Amaral, 1990).

Por su parte, las eferencias hipocampales parten del subículo y se pueden dirigir tanto a áreas corticales como subcorticales. Las eferencias corticales van dirigidas a la corteza entorrinal y posteriormente a las cortezas parahipocampal y perirrinal, y las áreas del neocórtex que reciben aferencias hipocampales son las mismas que envían información. Es decir, el hipocampo envía información de vuelta a las cortezas de la región parahipocampal, que a su vez, envían eferencias a las mismas áreas corticales de donde proviene la información de entrada la sistema (Eichenbaum, 2000).

Las conexiones subcorticales del sistema hipocampal se realizan a través del fórnix, un haz de fibras que conecta el hipocampo con dos importantes estructuras diencefálicas, los cuerpos mamilares del hipotálamo y los núcleos talámicos anteriores. Estos últimos reciben también información del hipocampo de manera indirecta a través del haz mamilotálamico. A su vez, las proyecciones desde los núcleos talámicos anteriores están menos definidas.

Parece que existen proyecciones de vuelta hacia el hipocampo y cortezas temporales adyacentes, principalmente a través del haz cingulado, de manera que las estructuras diencefálicas también pueden afectar al procesamiento de información del lóbulo temporal medial. En cualquier caso, las conexiones entre el lóbulo temporal medial y el diencefalo no se limitan a las proporcionadas por el fórnix. Independientemente del hipocampo, la corteza perirrinal proyecta a estructuras diencefálicas, concretamente al núcleo dorsomedial del tálamo, que a su vez tiene importantes conexiones con la corteza prefrontal. De este modo, se establecen dos circuitos independientes de conexión entre el lóbulo temporal medial y el diencefalo, unidos en todo caso por la corteza entorrinal, que participa en los dos sistemas de conexión (Aggleton y Brown, 1999) (ver figura 3).

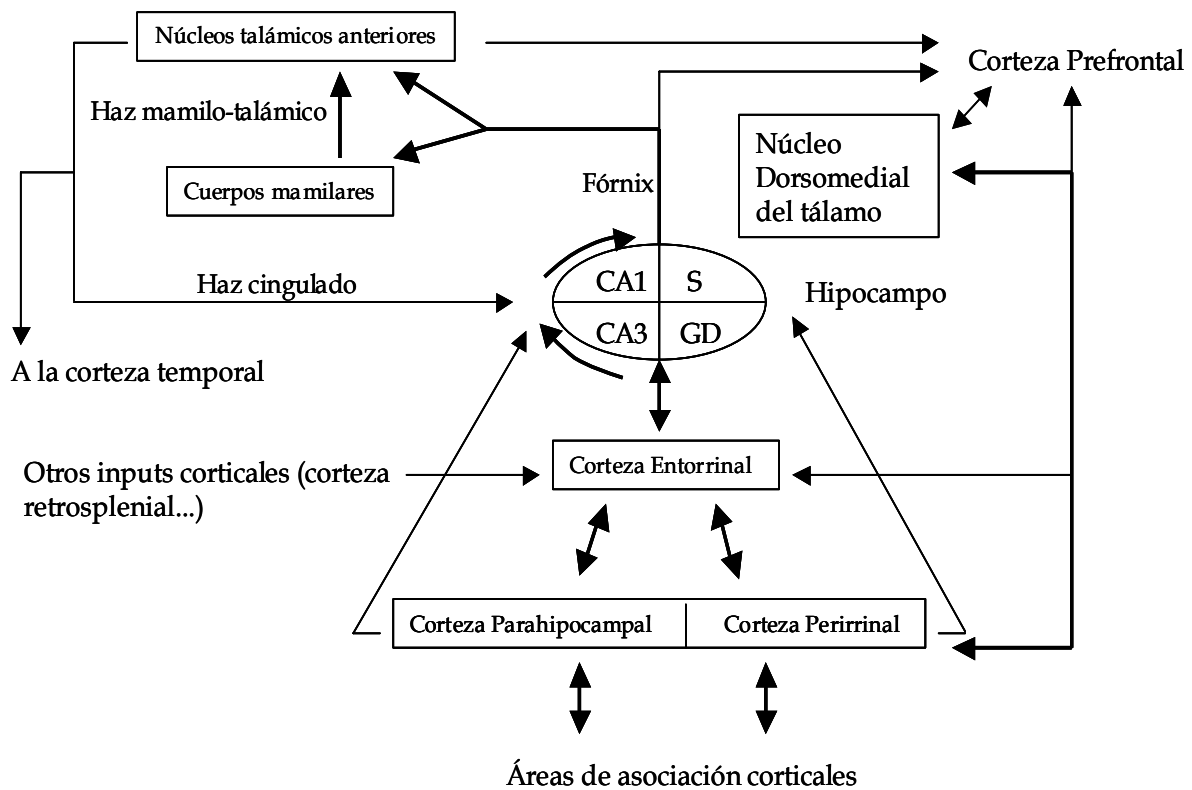


Fig. 3: Representación esquemática de las principales estructuras del lóbulo temporal medial y el diencefalo relacionadas con el sistema de memoria declarativa. El grueso de las líneas está en relación con la importancia de las conexiones. GD: Giro Dentado, S: Subículo. Adaptado de Aggleton y Brown (1999).

Además de este último subsistema de procesamiento de la información independiente del hipocampo formado por las conexiones entre la corteza perirhinal y el núcleo dorsal del tálamo, el núcleo del procesamiento de la información declarativa es el llamado circuito trisináptico, ya que el hipocampo es el destino final de todas las aferencias que llegan al lóbulo temporal medial. Este circuito se inicia con la vía perforante, es decir, con los axones que proyectan desde la corteza entorrinal al giro dentado. Los axones de las células granulares del giro dentado (*mossy fibers*) establecen sinapsis excitadoras con las células piramidales del área CA3 que, a su vez, envía sus axones (colaterales de *Schaeffer*) al área CA1. El subículo recibe los axones que provienen de este área y envía de nuevo la información a la corteza entorrinal cerrando así el circuito (Zola-Morgan y col., 1986). El procesamiento de la información por este circuito trisináptico permite que se pongan en relación diferentes aferencias sensoriales correspondientes a múltiples estímulos. Este hecho es debido a que en comparación con otras zonas de la corteza, las células piramidales del hipocampo muestran un alto grado de interconexión, lo que facilita que se establezcan relaciones entre los diferentes inputs de entrada (Eichenbaum y col., 1999; Hasselmo y McClelland, 1999).

### **2.3 SUBDIVISIONES ANATÓMICO-FUNCIONALES DE LA MEMORIA EPISÓDICA**

Un tipo de memoria declarativa es la memoria episódica, referida a hechos que tuvieron lugar en un determinado tiempo y espacio. Dado la clase de condicionamiento que hemos utilizado en nuestro trabajo, conviene analizar las características de este tipo de memoria.

Aunque no hay duda de que la memoria declarativa depende del lóbulo temporal medial, aún no está claro el papel o contribución que en ella tienen cada una de las estructuras individuales que lo conforman. Un estudio de neuroimagen de Daselaar y sus colaboradores (2006) ha aportado nuevas pruebas sobre la función que desempeñan las diferentes estructuras del lóbulo

temporal medial. Estos autores escanearon a sujetos humanos mientras realizaban una prueba de reconocimiento de palabras que anteriormente habían estudiado y encontraron que:

1. el hipocampo posterior se activaba de forma selectiva cuando los sujetos recordaban exactamente la palabra estudiada,
2. el córtex parahipocampal y el hipocampo anterior se activaban paralelamente al grado de familiaridad de las palabras y
3. el área rinal (córtex perirrinal y entorrinal) se activaba paralelamente al grado de novedad de éstas. Esta triple disociación en el lóbulo temporal medial apoya consistentemente la visión de que las diferentes áreas que lo conforman desempeñan distintos roles en el sistema de memoria declarativa. No obstante, el modo cómo estas áreas están interconectadas y cómo se organiza la detección de familiaridad, de novedad y el recuerdo en el sistema de memoria declarativa aún no está claro. Algunos estudios de neuroanatomía y neuroimagen funcional han aportado luz al asunto pudiéndose establecer un hipotético esquema de la organización funcional del sistema de memoria episódica del lóbulo temporal medial tal como el de la figura 4.



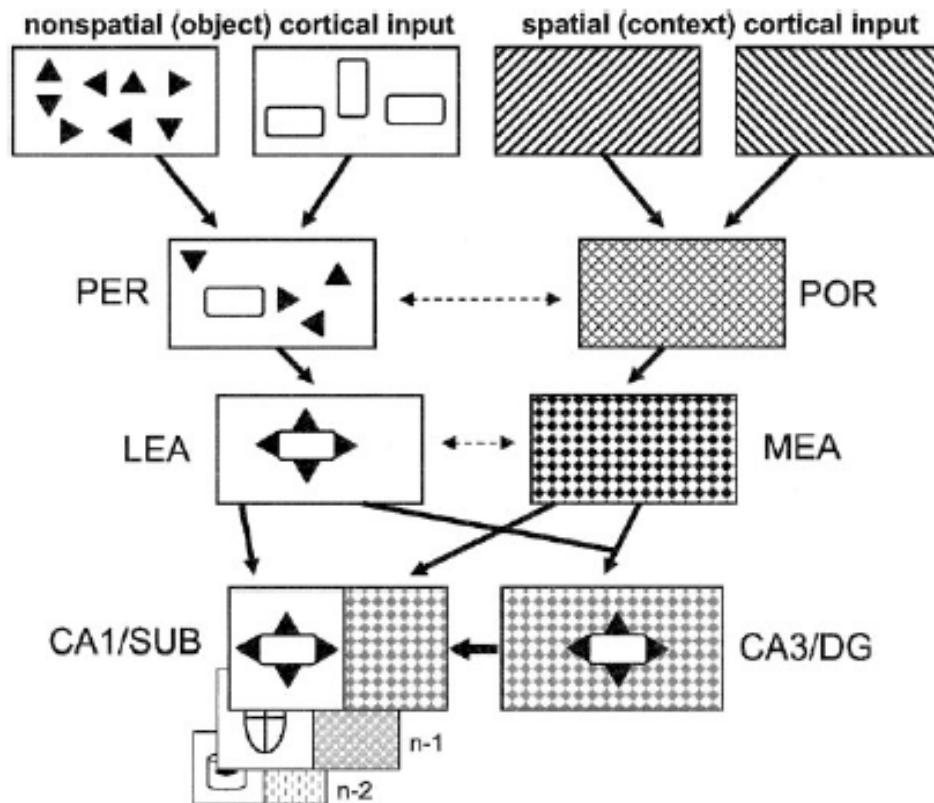


Fig. 4. Esquema de la codificación de la memoria episódica en el cerebro mamífero. La información espacial o contextual alcanza la región hipocampal tras ser procesada y reconstruida en el córtex postrinal/parahipocampal (POR) y en el área entorrinal medial (MEA). La información no espacial sobre los estímulos individuales u objetos llega a la región hipocampal tras ser refinada y elaborada en el córtex peririnal (PER) y en el área entorrinal lateral (LEA). Estas dos corrientes de información se combinan en el área CA3 y en el giro dentado (DG) pero se mantienen separadas en el área CA1 y en el subículo (SB). Así, el área CA3 y el DG serían importantes para las asociaciones entre el objeto y su contexto mientras el área CA1 y el SB mantendrían una representación más verídica que permitiría a la información entrante ser codificada en su orden temporal. Las proyecciones desde la región CA3 a la CA1 apoyarían la habilidad para combinar asociaciones entre el objeto y su contexto con la información sobre su orden temporal al servicio de una rápida formación de una nueva memoria para un incidente particular (Figura extraída de Manns y Eichenbaum, 2006)

Según este hipotético esquema anatómico, las áreas de asociación unimodales del neocórtex enviarían información sobre los rasgos o las características de un objeto (información sobre el qué) hacia el córtex perirrinal, mientras que las áreas neocorticales de asociación polimodal llevarían información espacio-contextual (información sobre el dónde y el cuándo) hacia el córtex parahipocampal. Ambas corrientes de información permanecerían segregadas en el siguiente estadio (región parahipocampal); así el córtex perirrinal proyectaría principalmente al córtex entorrinal lateral mientras que el córtex parahipocampal proyectaría principalmente al área entorrinal medial. Finalmente, las dos corrientes convergerían en el hipocampo cuyas salidas proyectarían sucesivamente a áreas entorrinales, de aquí a áreas perirrinales y parahipocampales y de éstas a las áreas corticales en las que se habían originado inicialmente los inputs (*feed-back*).

Este esquema anatómico supone, por tanto, una nueva hipótesis sobre la organización funcional del sistema del lóbulo temporal medial (Eichenbaum y col., 2007), según la cual durante una experiencia de aprendizaje los diferentes ítems o estímulos son inicialmente representados en el córtex perirrinal (PER) y en el córtex entorrinal lateral (LEA). Las eferencias del neocórtex contendrían información sobre la familiaridad o novedad de estos ítems. Adicionalmente, la información espacial o contextual de los estímulos en cuestión se procesaría en el córtex parahipocampal (POR) y en el córtex entorrinal medial (MEA) para, finalmente, integrarse como un todo (información sobre familiaridad-novedad + características del ítem + información contextual) en el hipocampo. De este modo, se podría considerar al hipocampo como una estructura que codificaría cualquier estímulo o conducta relevante realizada por el sujeto (Eichenbaum y col., 1999) o, más concretamente, cualquier experiencia sobre la que hubiera puesto atención (Morris y Frey, 1997). Diferentes resultados experimentales apoyan esta hipótesis (Brown y Aggleton, 2001; Eichenbaum y col., 1994). En animales, la lesión del hipocampo o del córtex parahipocampal produce déficits selectivos en la memoria relacional mientras que las lesiones del córtex

perirrinal producen déficits graves en el reconocimiento de estímulos individuales. De acuerdo con estos hallazgos se ha comprobado que las neuronas del córtex perirrinal y del córtex entorrinal lateral responden ante estímulos únicos y a señales de familiaridad (Aggleton y Brown, 1999), mientras que las neuronas del córtex parahipocampal y del córtex entorrinal medial responden ante claves espaciales. Las neuronas hipocampales se activan ante conjuntos únicos de estímulos, su significado, el comportamiento animal y los lugares y contextos en los cuales se dan estos estímulos (Eichenbaum, 2004).

Estudios recientes con humanos apoyan también esta distinción paralela, atribuyendo roles diferentes a áreas específicas del lóbulo temporal medial en el recuerdo y la familiaridad de un estímulo (Rugg y Yonelinas, 2003). Estudios sobre amnesia humana han mostrado que las lesiones limitadas al hipocampo y sus conexiones subcorticales producen déficits selectivos en el recuerdo y la memoria relacional, mientras la capacidad para distinguir nuevos y viejos ítems en base a su familiaridad permanece intacta (Manns y col., 2003). También en pacientes amnésicos se observó que el hipocampo permitía la habilidad para asociar ítems en la memoria y recordar asociaciones contextuales en comparación con el recuerdo de ítems únicos en base a su familiaridad (Addis y col., 2004; Davachi y Wagner, 2002; Giovanello y col., 2003; Prince y col., 2005). Por otro lado, estudios de neuroimagen funcional han puesto también de manifiesto que el hipocampo juega un papel selectivo en el recuerdo y en la memoria relacional mientras que el córtex perirrinal se activa durante la presentación de estímulos o ítems noveles decreciendo su actividad a medida que aumenta la familiaridad del estímulo. Otros estudios con humanos han mostrado también que el córtex parahipocampal se activa durante la presentación de escenas espaciales (Epstein y Kanwisher, 1998) o durante el visionado de objetos fuertemente asociados a lugares particulares (Bar y Aminoff, 2003). Esta área también se activa durante el recuerdo de información contextual (Ranganath y col., 2003).

Los mencionados hallazgos de Daselaar y sus colegas (2006) confirman y extienden, por tanto, las pruebas aportadas por los primeros estudios de imagen funcional. Concretamente, confirman que:

1. el hipocampo es crítico en el recuerdo del dónde y cuándo se ha visto un estímulo y juega, por tanto, un importante papel en la integración *estímulo-contexto* durante la fase de recuerdo.
2. el córtex parahipocampal contribuye también al recuerdo posiblemente a través de la representación y recuerdo de información contextual (especialmente espacial) y el córtex perirrinal contribuye y es necesario para la memoria de reconocimiento basada en la sensación de familiaridad de los estímulos presentados.

### 2.3.1 Implicación específica del hipocampo en el aprendizaje espacial

El hipocampo es, por tanto, una estructura crítica para procesar y recordar información espacial y contextual. Su lesión o la de sus vías de salida de información, como el fórnix, afecta al aprendizaje de tareas en los laberintos radiales, los laberintos de agua o el condicionamiento contextual. Estas observaciones conductuales han sido también apoyadas a nivel electrofisiológico con el descubrimiento en el hipocampo de la rata de las llamadas células de lugar (place cells), las cuales se activan cuando el animal se encuentra en una localización concreta de un ambiente particular (Eichenbaum y col., 1999; O'Keefe y Dostrovsky, 1971)

(figura 5). Su hallazgo hizo que, en 1978, O'Keefe y Nadel propusieran la teoría del mapa cognitivo según la cual, el hipocampo podría ser la estructura cerebral a través de la cual se formaría un mapa cognitivo que permitiría a la rata conducirse en su entorno, es decir,

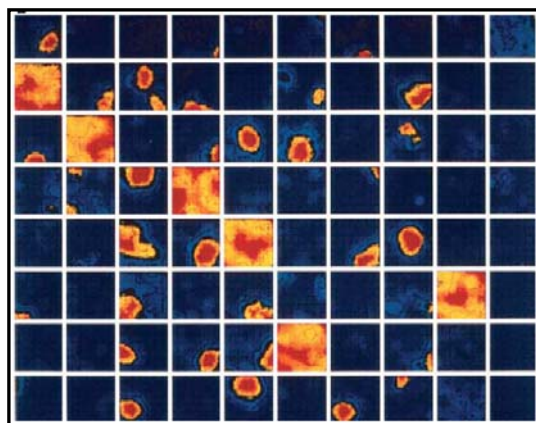


Fig. 5. Campo receptivo espacial. Patrón de actividad de células hipocampales de lugar.

el animal, gracias a su hipocampo podría establecer una representación cerebral de las relaciones espaciales de su entorno apreciando distancias y relaciones entre estímulos.

Experimentos con animales en el LAM apoyarían esta teoría, ya que como se ha comentado anteriormente, las lesiones tanto del propio hipocampo como de otras estructuras de la formación hipocampal causan un grave deterioro en esta tarea. Otros estudios han puesto también de manifiesto que los pacientes con lesiones hipocampales presentan graves dificultades para encontrar la plataforma en un test virtual del laberinto acuático (Astur y col., 2002). Los trabajos realizados en el LAM también sugieren la implicación del sistema hipocampal en la formación de asociaciones o representaciones complejas entre los estímulos (Eichenbaum, 1999; D'Hooge y De Deyn, 2001). Esta idea concuerda con la evidencia neuroanatómica y neurofisiológica que muestra cómo el hipocampo integra múltiples áreas corticales relevantes para la percepción y la memoria e interviene en la codificación de las asociaciones entre las características espaciales y temporales de los estímulos ambientales (Daselaar y col., 2006; Kessels y col., 2001). El hipocampo, por tanto, podría actuar como un «instrumento puente» que permitiría integrar los diferentes rasgos conductuales de la información en sus ambientes (Eichenbaum y col., 1999; Daselaar y col., 2006). Quizás por todo ello, el LAM resulta un instrumento particularmente sensible a los efectos de las lesiones hipocampales, en ratas (Benhamou y Poucet, 1996; Brandeis y col., 1989; Bures y col., 1997; McNaughton y col., 1996; Morris, 1984; Morris y col., 1982; Poucet y col., 2000; Stewart y Morris, 1993). Se ha visto que las ratas con lesión hipocampal presentan déficits en la adquisición y retención de la tarea con plataforma-escondida pero no en la tarea con plataforma-visible del LAM. No obstante, las ratas con lesión hipocampal son capaces de localizar la plataforma escondida si esta se encuentra siempre a la misma distancia y dirección de una clave visible (Pearce y col., 1998), demostrándose que la habilidad para usar un vector director se encuentra preservada en estos animales. El deterioro del aprendizaje

espacial de las ratas con lesión está proporcionalmente relacionado con el volumen de tejido hipocampal dañado. Asimismo, las lesiones del hipocampo dorsal producen mayor deterioro que las del hipocampo ventral (Moser, y col., 1993; Moser y col., 1995). Los déficits en el aprendizaje espacial que presentan las ratas con lesión hipocampal no parecen deberse al deterioro del aprendizaje configuracional general o de discriminación, pues las ratas a las que se les indujo una lesión hipocampal con ácido iboténico presentaron graves dificultades para aprender la tarea plataforma-escondida pero no para adquirir una tarea de discriminación no espacial (Gallagher y Holland, 1992) o una tarea de discriminación basada en la aversión al gusto (Skinner y col., 1994).

Algunos estudios han demostrado también que los animales con lesiones del fórnix pueden resolver una tarea espacial en el LAM guiándose por claves distales (Eichenbaum y col., 1990). Lo que caracteriza la conducta de estos sujetos lesionados es la inflexibilidad de su respuesta, mostrando una ejecución muy inferior a los sujetos control cuando se utilizan múltiples puntos de salida o se eliminan algunas de las claves ambientales, pero una ejecución normal cuando los ensayos reproducen exactamente las condiciones iniciales en las que se adquirió el aprendizaje (Eichenbaum y col., 1990). Podemos considerar pues a los aprendizajes espaciales y, en concreto, al aprendizaje en el LAM como un tipo de aprendizaje flexible en el sentido de que los animales son capaces de navegar por rutas no experimentadas previamente para localizar la plataforma escondida.

Por otro lado, Redish y Touretzky (1998) han propuesto dos funciones hipocampales en la solución de la tarea plataforma-escondida en el LAM: *autolocalización* y *repetición de ruta*. La *autolocalización* hace referencia a la capacidad de los animales para determinar su posición en el ambiente y en relación al objetivo (plataforma escondida) y *la repetición de ruta* es un proceso de memoria que permite al animal hacer y deshacer rutas de forma rápida dentro de ese ambiente. De acuerdo con estos autores, estas capacidades

dependen de la combinación de campos espaciales hipocampales y de los procesos de potenciación a largo plazo (PLP). Algunos autores han sugerido asimismo que la PLP hipocampal sería la base neuronal del aprendizaje hipocampo-dependiente, pero esta visión aún no ha sido probada de forma concluyente (Bliss, 1998). De hecho, otros autores han demostrado que el aprendizaje en el LAM es posible en animales donde se han bloqueado los procesos de PLP y también que la ejecución en el LAM puede afectarse cuando se facilita la PLP (Cain, 1997a).

En resumen, parece ser que el hipocampo y las células hipocampales de lugar son críticos para el aprendizaje espacial. No obstante, otros trabajos han puesto de manifiesto que el mecanismo neurobiológico subyacente a este aprendizaje podría implicar la acción coordinada del hipocampo con otras estructuras cerebrales proponiéndose papeles concretos para éstas. Así, el aprendizaje espacial en general, y la ejecución en el LAM en particular, dependerían de la acción coordinada de diferentes regiones cerebrales que constituirían una red neural funcionalmente integrada. A continuación se repasarán las principales estructuras cerebrales que podrían constituir esta red.

### 2.3.2 Otras estructuras implicadas en el aprendizaje espacial

McNaughton y sus colaboradores (1989) descubrieron unas células en la corteza parietal (células de dirección de la cabeza) con propiedades complementarias a las células de lugar del hipocampo. Su actividad parece relacionarse con la orientación de la cabeza con respecto al entorno, independientemente de su localización, apoyando la hipótesis de que la corteza parietal integra y procesa tanto información visual como relativa al movimiento, ya que su lesión deteriora la ejecución en tareas espaciales. El hipocampo estaría más implicado en el procesamiento de señales distales y la corteza parietal con las proximales (Cressant y col., 1997). La contribución de la corteza parietal al procesamiento de la información espacial podría depender del grado de funcionalidad del hipocampo (Thinus-Blanc y col., 1996), aunque el papel de estas dos estructuras

no puede aislarse de otras áreas cuya actividad está implicada en la integración y procesamiento que se hace del entorno. Se ha observado, asimismo, que las ratas con lesiones en el córtex prefrontal, a diferencia de las que tienen lesiones en el cortex parietal, presentan déficits en la adquisición del aprendizaje en el LAM (Mogensen y col., 1995). Las ratas con lesiones prefrontales parecen capaces de utilizar claves distales para localizar la plataforma escondida pero presentan déficits en los procesos de planificación, impidiéndose así la formación de una adecuada representación de la secuencia de movimientos necesaria para alcanzar la plataforma (Granon y Poucet, 1995; Mogensen y col., 1995).

Por otro lado, se ha visto también que las lesiones del núcleo accumbens, que actúa como una especie de «puente» entre sistema límbico y motor (Ploeger y col., 1994), deterioran la ejecución en el laberinto de Morris. También se ha sugerido que el neocórtex (caudado y putamen) intervendría en la organización espacial de la conducta aunque de forma distinta al hipocampo. Este último sería el sustrato neural de la localización espacial «alocéntrica», relacionada con la formación de los mapas cognitivos, mientras que el núcleo caudado intervendría en la localización «egocéntrica» (basada en la propia situación del cuerpo) (Devan y col., 1996). Las lesiones cerebelosas deterioran también la ejecución en el laberinto de agua, sugiriendo su implicación en los aspectos procedimentales de la tarea (D'Hoodge y De Deyn, 2001). Finalmente, otra región cerebral como el tálamo participaría en el aprendizaje espacial actuando como principal estación de relevo (Conway, 1998).

## **2. 4 SISTEMAS DE NEUROTRANSMISIÓN Y APRENDIZAJE ESPACIAL**

Aunque se han estudiado diversos sistemas de neurotransmisión en relación con el aprendizaje y la memoria espacial, el glutamato y la acetilcolina han sido los más investigados (Myhrer, 2003). A continuación se repasarán los



principales sistemas de neurotransmisión y su implicación en el aprendizaje espacial.

#### A) Acetilcolina

Diferentes estudios experimentales han puesto de manifiesto que las manipulaciones farmacológicas que suprimen la actividad colinérgica afectan la adquisición del aprendizaje espacial en el LAM (McNamara y Skelton, 1993; Morris y Davis, 1994; Rison y Stanton, 1995). Así, por ejemplo, el bloqueo de los receptores centrales muscarínicos de la acetilcolina por atropina o escopolamina deteriora la adquisición en el LAM pero no su recuerdo (Brandeis y col., 1989; McNamara y Skelton, 1993). Por otro, estudios experimentales con ratas han mostrado que la administración aguda de agonistas colinérgicos antes del entrenamiento mejora el aprendizaje en el LAM tanto si los sujetos presentan o no déficits asociados a la edad o a lesión cerebral (Riekkinen y Riekkinen, 1997; Hodges y col., 1995).

#### B) Glutamato

El sistema glutamatérgico también parece intervenir en este aprendizaje, ya que los antagonistas de los receptores NMDA, incluso en dosis pequeñas, deterioran la adquisición del LAM de forma específica (McLamb y col., 1990; Wesierska y col., 1990). Además, la PLP en la mayoría de las sinapsis del hipocampo depende de la actividad de dichos receptores (Cain, 1998). Cain y sus colaboradores a lo largo de diferentes estudios (1996a; 1996b; 1997), mostraron que los antagonistas NMDA deterioran la ejecución en el LAM a través de la inducción de defectos sensomotores e hiperactividad más que a través de déficits en el aprendizaje espacial propiamente dichos. No obstante, otros autores han mostrado pequeñas mejorías en la adquisición y retención del aprendizaje en el LAM en animales tratados con dosis bajas de antagonistas de los receptores NMDA (Mondadori y Weiskrantz, 1993). Por todo ello, hay controversia respecto a la implicación exacta de estos receptores en el aprendizaje espacial (Lalonde y Cote, 1993; Zamanillo y col., 1999) pues podría

ser que los receptores NMDA contribuyesen pero quizá no fueran esenciales para el aprendizaje de lugar.

### C) GABA

La activación del sistema de neurotransmisión gabaérgico interfiere directamente sobre las habilidades de aprendizaje espacial mientras que su supresión potencia éstas y otras funciones (McNamara y Skelton, 1993). Así, por ejemplo, la clorodiazepoxide y la CL 218,872, agonistas selectivos de los receptores GABA<sub>A</sub>, deterioraron el entrenamiento de adquisición en el LAM y la subsiguiente prueba test (McNamara y col., 1993) mientras que el diazepam y el triazolam no afectaron la adquisición pero sí el recuerdo de la información espacial en el LAM (Brioni y Arolfo, 1992; Kant y col., 1996; McNamara y Skelton, 1991). No obstante, estudios experimentales con ratones mostraron que la administración crónica de vigabatrina, una droga gabaérgica, no afectó la ejecución en el LAM de los sujetos (Ylinen y col., 1991) y que ésta tampoco se vio afectada en aquellos que recibieron pentobarbital en dosis que producen importantes disfunciones motoras (Beaudin y Lalonde, 1997).

### D) Aminas biogénicas

En vistas del hecho que la depleción cerebral de noradrenalina, dopamina o serotonina no parece afectar la ejecución del LAM, se hipotetizó que los sistemas aminérgicos no jugarían un rol crítico en el aprendizaje espacial (McNamara y Skelton, 1993). Sin embargo, investigaciones más recientes han atribuido algunas funciones concretas en la formación de la memoria espacial a los diferentes sistemas aminérgicos. Por ejemplo, se ha visto que la infusión de noradrenalina (NA) en la amígdala basolateral mejora la adquisición y la prueba test, en ratas (Hatfield y McGaugh, 1999). Asimismo, al inhibir la transmisión dopaminérgica, mediante la administración de neurolépticos, se impide el aprendizaje espacial (Ploeger y col., 1994). Dado que los antagonistas de la dopamina deterioran tanto la tarea plataforma-escondida como la tarea plataforma-visible en el LAM, se ha sugerido que los déficits sensomotores o motivacionales podrían subyacer a los efectos de estos componentes

(McNamara y Skelton, 1991). Finalmente, un estudio de Levkovitz y sus colaboradores (1994) mostró que la inyección de triptófano, el precursor de la serotonina, alivió los déficits de aprendizaje en el LAM, en ratas viejas. No obstante, el rol concreto del sistema serotoninérgico sobre la adquisición y retención en el LAM no queda aún del todo claro debido a la heterogeneidad de los receptores de la serotonina (5-HT) y la expresión de un gran número de subtipos diferentes en el sistema nervioso central. Así, de los diferentes estudios farmacológicos realizados con ligandos selectivos del receptor 5-HT así como estudios con ratones transgénicos a los que les falta algún subtipo del receptor 5-HT se desprende que algunos subtipos del receptor como el 5-HT<sub>2</sub> y el 5-HT<sub>4</sub> podrían ser necesarios para potenciar el aprendizaje en el LAM mientras que otros subtipos como el 5-HT<sub>1</sub> y el 5-HT<sub>3</sub> podrían deteriorarlo.

#### E) Neuropéptidos

Algunos péptidos actúan como neurotransmisores o neuromoduladores en el sistema nervioso central y algunos de ellos están implicados en los procesos que subyacen al aprendizaje en el LAM. La somatostatina, el péptido intestinal vasoactivo (VIP) y algunos otros péptidos influyen en la adquisición del LAM aunque no están claras sus contribuciones al aprendizaje espacial (Fitzgerald y Dokla, 1989; Itoh y col., 1994). Por otro lado, pruebas experimentales han mostrado que la activación del sistema opioidérgico deteriora el aprendizaje en el LAM (Brandeis y col., 1989; Sprick y col., 1996). Algunos de los efectos de los opioides sobre el aprendizaje espacial podrían deberse a la inhibición que éstos producen sobre la activación noradrenérgica (Introini-Collison y col., 1995).

En resumen, si bien el glutamato y la Ach han sido los neurotransmisores más ampliamente estudiados y relacionados con el aprendizaje y la memoria de referencia espacial en el LAM, no podemos descartar la implicación de otros sistemas de neurotransmisión en estos procesos cognitivos.

### 3. MODULACIÓN DE LA CONSOLIDACIÓN DE LA MEMORIA

#### 3.1 INTRODUCCIÓN

Tras la adquisición de un aprendizaje sigue un periodo de tiempo lábil durante el cual la formación de una traza de memoria en una zona del cerebro puede ser modulada por la acción de otras zonas cerebrales o por influencias hormonales (McGaugh, 1989). Este periodo se conoce como consolidación, y su duración está en relación con el curso temporal que siguen los procesos celulares y moleculares subyacentes al aprendizaje, de modo que una vez estabilizados, no se puede modular la formación de la traza de memoria recientemente adquirida. Según McGaugh (2000), la consolidación podría haber sido seleccionada por la evolución por su función adaptativa, ya que permite a los procesos endógenos activados por una experiencia determinada modular la intensidad del recuerdo de esa experiencia. En los diferentes sistemas que pueden modular la formación de las trazas de memoria, podemos destacar tres características comunes (Cahill y McGaugh, 1996):

1. Su periodo de acción está limitado a una ventana temporal después de la activación de la traza de memoria. Pasado cierto tiempo, estos sistemas pueden ser inactivados sin que se observe ninguna afectación de la posterior recuperación de la información.
2. Estos sistemas pueden facilitar tanto la formación de la memoria como dificultarla en función de las condiciones del aprendizaje y los estímulos intervinientes.
3. Mientras que los diferentes sistemas de memoria sólo pueden almacenar un tipo de información, los sistemas moduladores pueden influir en la formación de diferentes tipos de memorias.

En el presente trabajo, inmediatamente después de las sesiones de adquisición

del aprendizaje en el LAM, se ha estimulado uno de estos posibles sistemas moduladores de la consolidación de la memoria: el sistema del refuerzo del HPM mediante el tratamiento de AEIC.

### **3.2 MODULACIÓN DE LA CONSOLIDACIÓN DE LA MEMORIA POR AEIC EN EL HPM**

Desde que Olds y Milner (1954) descubrieron el fenómeno de AEIC en ratas, este procedimiento experimental ha demostrado ser una manera consistente de facilitar los procesos de aprendizaje y memoria. Routtenberg (1974, 1975, 1979) demostró que tanto la estimulación como la lesión de la mayor parte de las localizaciones donde se puede inducir la conducta de AEIC era capaz de modificar los procesos de adquisición y retención del aprendizaje. Posteriores trabajos han mostrado que la interacción funcional entre el substrato nervioso del refuerzo y los procesos de consolidación de la memoria depende de diferentes variables que pueden modificar el efecto de la AEIC, como el momento de administración de la estimulación, el tipo y los parámetros de estimulación utilizados, el paradigma de aprendizaje evaluado, la contingencia entre estímulos o entre estímulos y respuestas durante el entrenamiento, etc.

#### 3.2.1 Efectos de la AEIC post-entrenamiento

En general, en base a múltiples pruebas experimentales, es posible destacar que la AEIC del HPM a nivel del HL administrada post-entrenamiento facilita la adquisición y retención de múltiples tareas de aprendizaje. El componente de autoadministración del tratamiento no parece ser necesario para observar los efectos facilitativos sobre la consolidación de la memoria, dado que tanto la autoadministración (AEIC) como la administración por parte del experimentador (EICr) de la estimulación eléctrica reforzante del HPM son capaces de inducir dichos efectos. No obstante, el tratamiento autoadministrado parece tener una mayor eficacia.

En referencia a los efectos sobre la adquisición del aprendizaje, hemos podido observar en experimentos realizados en nuestro laboratorio que la AEIC del HPM administrada después de cada sesión de aprendizaje facilita la adquisición de una tarea de evitación activa de dos sentidos (EV2) en un paradigma distribuido (Aldavert-Vera y col., 1997; Massanés-Rotger y col., 1998; Segura-Torres y col., 1988; Segura-Torres y col., 1991). En referencia a la retención, la mayor parte de los trabajos han estudiado los efectos de la AEIC a las 24 horas después del entrenamiento. De esta forma, se ha podido comprobar que tanto la EICr como la AEIC facilitan la retención a las 24 horas de diferentes tareas de aprendizaje. A más largo plazo, se ha podido comprobar que la AEIC facilita a los 7 días la retención de la conducta de presión de la palanca en un paradigma de caja de Skinner (Saitoh e Inokuchi, 2000). La AEIC administrada según un paradigma distribuido ha mostrado también efectos facilitativos sobre la retención del condicionamiento de EV2 a los 10 (Massanés-Rotger y col., 1998; Segura-Torres y col., 1988; Segura-Torres y col., 1991) y a los 30 días (Segura-Torres y col., 1991) y se ha visto que la AEIC post-entrenamiento es capaz de facilitar la EV2 en sujetos que han recibido muy poco entrenamiento (5 ensayos en la EV2) (Ruiz-Medina y col., 2007).

#### 3.2.1.1 Parámetros experimentales que afectan a la AEIC

El efecto de la AEIC post-entrenamiento sobre el aprendizaje y la memoria parece depender de diferentes factores, como la demora en la administración del tratamiento, la contingencia entre estímulos o entre estímulos y respuestas durante el entrenamiento, la intensidad de la corriente estimulante y la cantidad de trenes administrados (Aldavert-Vera, 1993; Massanés-Rotger, 1998; Soriano-Mas, 2002).

##### *A) Demora y contingencia*

En referencia a la demora en la administración del tratamiento, tanto el efecto de la EICr como de la AEIC sobre el aprendizaje se relaciona inversamente con la demora con la que se administra la estimulación en referencia a la sesión de

entrenamiento. Así, por ejemplo, en una tarea operante apetitiva, con una demora de 1 hora se anulan los efectos facilitativos sobre la retención a las 24 horas (Major y White, 1978), mientras que en una tarea de condicionamiento clásico parecen ser necesarias 2 horas para que desaparezca el efecto facilitador (Coulombre y White, 1980), y 4 horas en un paradigma de preconditionamiento sensorial (Coulombre y White, 1982b).

Otra condición necesaria para que el tratamiento de AEIC administrado después del entrenamiento sea efectivo es que realmente se de una contingencia entre estímulos o entre estímulos y respuestas durante el aprendizaje. De esta forma, Coulombe y White (1980, 1982b) comprobaron que la estimulación reforzante del HPM no tenía efectos sobre la retención a las 24 horas de un condicionamiento clásico y de un condicionamiento sensorial, si los estímulos del condicionamiento no se presentaban de forma contingente.

#### *B) Intensidad de la corriente y cantidad de trenes*

La cantidad de trenes administrados y la intensidad de la corriente estimulante también parecen ser parámetros críticos en la facilitación de la adquisición y la retención del aprendizaje mediante la AEIC (Aldavert-Vera, 1993; Massanés-Rotger, 1998; Soriano-Mas, 2002). En general, existe una correlación positiva significativa entre la cantidad de trenes y el nivel de facilitación alcanzado. Concretamente, la facilitación más potente parece observarse en tratamientos de 2500 trenes al 100% de la intensidad óptima de estimulación para cada sujeto, siendo necesario un nivel mínimo de estimulación de 500 trenes para poder obtener efectos facilitativos (Segura-Torres y col., 1991). La intensidad también es un factor importante, ya que se ha comprobado que al 80% de la intensidad óptima del sujeto se necesitan entre 2500 y 4500 trenes para poder obtener efectos facilitativos sobre la adquisición del condicionamiento de EV2 (Segura-Torres y col., 1991).

### 3.2.1.2 Diferencias individuales: nivel de aprendizaje y edad

Resultados previos de nuestro laboratorio han puesto de manifiesto que los efectos facilitativos del tratamiento de AEIC post-entrenamiento parecen ser más fuertes en sujetos experimentales con un bajo nivel de aprendizaje (Aldavert-Vera y col., 1996) o que han recibido poco entrenamiento (Ruiz-Medina y col., 2007), sugiriendo que dicho tratamiento es más o menos efectivo en función de los niveles de aprendizaje inicial.

Otra población que también se ha visto diferencialmente favorecida por el tratamiento de AEIC es la de los animales viejos, que, por su condición fisiológica, generalmente presentan niveles de aprendizaje inferiores al de los animales jóvenes. Un trabajo de nuestro laboratorio (Aldavert-Vera y col., 1997) evaluó los efectos de la AEIC post-entrenamiento sobre la adquisición y retención a largo plazo del condicionamiento de EV2 en ratas viejas. Sus resultados mostraron que la AEIC del HL facilitó la adquisición de la tarea, mostrando que la relación entre la activación del sistema nervioso del refuerzo y la facilitación de la memoria puede observarse también durante el envejecimiento. Otro estudio de nuestro laboratorio puso de manifiesto que la AEIC es capaz de revertir amnesias experimentalmente inducidas. Así, este tratamiento fue capaz de revertir el déficit de aprendizaje y memoria causado por la lesión del núcleo Parafascicular (PF) del tálamo obteniéndose también estos resultados en ratas viejas con lesión diencefálica, en edades que presentan déficit cognitivo para aprender y recordar tareas de aprendizaje (Redolar-Ripoll y col., 2003). El tratamiento de AEIC permitió a los sujetos tratados alcanzar niveles de aprendizaje y memoria significativamente superiores a los que hubieran conseguido sin tratamiento (Redolar-Ripoll y col., 2003).

### 3.2.2 Efectos de la estimulación pre-entrenamiento

Aunque en la mayoría de los experimentos, que han estudiado los efectos de la AEIC sobre el aprendizaje y la memoria, el tratamiento de AEIC se aplicaba post-entrenamiento algunos trabajos han estudiado el efecto del tratamiento.



administrado antes del entrenamiento. Estos estudios han seguido principalmente dos tipos de aproximaciones experimentales: 1) la administración crónica del tratamiento de AEIC, distribuido en varias sesiones, aplicado un tiempo antes del entrenamiento (días o semanas) y 2) la administración del tratamiento de AEIC contingente al entrenamiento:

#### 1. Tratamientos Crónicos.

Los tratamientos crónicos, distribuidos en varias sesiones, aplicados un tiempo antes del entrenamiento (días o semanas) son capaces de facilitar los procesos de aprendizaje y memoria posteriores. Los primeros estudios sobre este tipo de tratamientos fueron realizados con estimulación eléctrica reforzante aplicada por el propio experimentador (EICr), y se estudió el efecto de este tipo de estimulación en los primeros estadios de desarrollo postnatal sobre diferentes condicionamientos en la edad adulta. Dentro de este conjunto de estudios, se observó que la EICr del HL a los 10 (Velley y Cardo, 1979) y 15 días de edad (Velley y Cardo, 1979; Velley y col., 1978) aumentaba claramente la capacidad para adquirir una respuesta operante a las 4 semanas de la estimulación. No obstante, este tipo de estimulación demostró efectos deteriorantes sobre el aprendizaje cuando se utilizaban reforzadores negativos en aprendizajes de evitación (Velley y col., 1978). Una posible explicación que dan los autores es que el sustrato neural que controla las conductas de evitación todavía fuera inmaduro y que, por tanto, la EICr del HL indujera algún tipo de desequilibrio entre los sistemas de aproximación y los de evitación, en detrimento de estos últimos (Velley y col., 1981).

En animales adultos, se ha podido comprobar también que el tratamiento de AEIC del ATV administrado durante 10 días consecutivos es capaz de facilitar la posterior adquisición (a los 10 días) tanto de aprendizajes operantes como espaciales (Yoganarasimha y col., 1998). Estos autores interpretan que esa facilitación podría deberse a mecanismos de plasticidad neural persistentes en el tiempo. Además, Yoganarasimha y Meti (1999) han demostrado que una

exposición al tratamiento de AEIC de las mismas características anteriores revierte los déficits conductuales inducidos por la lesión bilateral del fórnix sobre la adquisición y ejecución de tareas de aprendizaje espacial y operante dependiente del hipocampo. Los mismos autores proponen que la AEIC es capaz de aminorar los efectos de dicha lesión, induciendo plasticidad neural en el hipocampo, la cual podría actuar como un mecanismo compensatorio a la lesión (Yoganasimha y Meti, 1999).

## 2. Tratamientos contingentes al entrenamiento

A diferencia de los tratamientos crónicos, la administración de la AEIC inmediatamente antes del entrenamiento no siempre ha mostrado efectos facilitativos sobre las diferentes tareas de aprendizaje evaluadas. Diversos trabajos de nuestro laboratorio han puesto de manifiesto que la AEIC del HL administrada inmediatamente antes del entrenamiento facilita la adquisición del condicionamiento distribuido de EV2 (Segura-Torres y Capdevila-Ortís, 1986; Segura-Torres y col., 1988), y que dicha facilitación se mantiene a largo plazo (10 días) con la misma eficacia que cuando es administrada post-tratamiento (Segura-Torres y col., 1988). Hay que tener en cuenta que, al tratarse de un paradigma distribuido, es metodológicamente difícil interpretar si el tratamiento de AEIC ha afectado a la consolidación en curso, a la recuperación de la información ya consolidada en sesiones anteriores o si se trata de un mecanismo de plasticidad neural.

De forma contraria, otro estudio ha mostrado que la administración de una única sesión de AEIC inmediatamente antes de la adquisición del aprendizaje no parece facilitar la posterior recuperación de la información de un condicionamiento clásico apetitivo (Coulombe y White, 1980). A la hora de interpretar estos resultados aparentemente contradictorios, hay que tener en cuenta la existencia de diferencias procedimentales entre este trabajo y los anteriores, dado que el paradigma de condicionamiento utilizado es diferente y el número de sesiones de AEIC también varía.

### 3.3 HIPÓTESIS EXPLICATIVAS DEL EFECTO MODULADOR DE LA AEIC

Como se ha comentado en puntos anteriores, la estimulación cerebral reforzante ha demostrado ser un procedimiento capaz de modular positivamente los procesos de aprendizaje y memoria. El hecho de que la AEIC facilite diversas tareas de aprendizaje cuando es aplicada en condiciones diferentes nos lleva a sugerir que este tratamiento podría tener varios modos de acción que pudieran afectar a la conducta tanto a corto como a largo plazo.

A corto plazo, la AEIC parece actuar sobre el proceso de la consolidación en curso de la traza de memoria. Esta hipótesis se apoya en diferentes pruebas experimentales que muestran que la eficacia del tratamiento depende de su continuidad temporal con el entrenamiento y de la contingencia entre los estímulos. Concretamente, los efectos facilitativos de la AEIC del HL podrían deberse principalmente a una aceleración del proceso de consolidación. A favor de esta idea, resultados de nuestro laboratorio que han analizado la retención de un aprendizaje de EV2 en diferentes tiempos tras su adquisición, han puesto de manifiesto que los sujetos que tras la sesión de entrenamiento recibían un tratamiento de AEIC mostraban a las 24 horas un nivel de retención similar al conseguido por los sujetos control en 7 días (Aldavert-Vera y col., 1996). Por otro lado, algunos autores proponen que la AEIC post-entrenamiento podría provocar un fortalecimiento retroactivo de las asociaciones establecidas por el aprendizaje (Coulombe y White, 1980; Major y White, 1978). En este sentido, Coulombe y White (1980) han sugerido que la AEIC podría actuar de forma similar a la repetición de la experiencia dado que para alcanzar un nivel similar de aprendizaje en una tarea de condicionamiento aversivo, el número de emparejamientos entre los estímulos condicionado e incondicionado que requirieron los sujetos tratados con AEIC del HL fue un 80% menor que los requeridos por los sujetos controles.

Diversos trabajos se han centrado en la importancia que podría tener el componente reforzante de la AEIC en sus efectos facilitativos a corto plazo. Así,

se ha sugerido que la AEIC podría actuar sobre la traza de memoria recientemente formada fortaleciéndola, manteniéndola en el curso temporal de los procesos subyacentes a la consolidación o promoviendo la asociación entre las trazas de memorias ya existentes de un estímulo y de una respuesta operante (Huston y Oitzl, 1989). No obstante, existen pruebas de que el efecto facilitador de la AEIC sobre la consolidación de la memoria es independiente de su carácter reforzante. De este modo, se ha observado que la estimulación del HL a intensidades subumbral de refuerzo es capaz también de facilitar la retención de diferentes tareas de condicionamiento (Destrade y Jaffard, 1978). Igualmente, se ha podido demostrar que la administración de anfetamina en el caudado, a pesar de no tener efectos reforzantes, facilita la formación de la memoria de diferentes tareas de aprendizaje, mientras que la administración en el Acc, a pesar de sus potentes efectos reforzantes, no muestra estos efectos facilitativos (White y Milner, 1992).

Partiendo de la idea de que el componente reforzante de la AEIC no parece necesario para facilitar el aprendizaje y considerando que el sustrato nervioso del refuerzo se encuentra anatómica y funcionalmente relacionado con los sistemas de activación general, otros autores sugieren que el factor crítico para la modulación del aprendizaje a través de este tratamiento podría ser el incremento artificial de la activación general del sistema nervioso durante el período crítico del procesamiento de la información (Destrade y Jaffard, 1978). Los sistemas de arousal central promueven la excitabilidad de las neuronas de la corteza y de otras estructuras telencefálicas, como la amígdala, el hipocampo o el estriado, facilitando, de esta manera, el procesamiento de la información (Marrocco y col., 1994). Si este efecto facilitatorio tiene lugar durante la fase crítica de consolidación de la memoria, ésta se podría modular positivamente, de la misma forma que podemos modular positivamente los procesos atencionales cuando la activación de tales sistemas de arousal central coincide con la fase de recogida de información (Corbetta y Shulman, 2002). Muchos resultados experimentales apoyan esta hipótesis, ya que se ha podido

comprobar que diversos sistemas cerebrales y hormonales específicos relacionados con el arousal regulan tanto la formación de nuevas memorias (Cahill y McGaugh, 1998; Nielson y col., 1996), como la reactivación de memorias previamente adquiridas (Przybylski y Sara, 1997; Sara y col., 1999). Del mismo modo, se ha podido comprobar que un estado de arousal determinado puede modular algunos mecanismos de plasticidad cortical a corto plazo (Castro-Alamancos y Connors, 1996). En definitiva, el tratamiento de AEIC podría facilitar la consolidación de la memoria mediante la producción de un incremento de la activación general del sistema nervioso.

La activación generalizada que produce la AEIC del HPM ha mostrado ser una forma consistente de inducción de cambios morfológicos a largo plazo en el tejido nervioso. En ratas adultas, se ha podido observar que el tratamiento de AEIC del HL y del ATV-SN durante un período de 10 días es capaz de inducir aumentos de la longitud (Shankaranarayana Rao y col., 1994) y de la arborización dendrítica (Bindu y Desiraju, 1990; Shankaranarayana Rao y col., 1993) en neuronas del HL, de la SN, de la zona CA3 del hipocampo y de la capa V del córtex motor, un incremento en la densidad numérica de sinapsis, tanto en la región CA3 como en la capa molecular del córtex motor (Shankaranarayana Rao y col., 1997), así como un incremento del número de excrescencias en las dendritas apicales de CA3, posiblemente debido a una facilitación de la transmisión sináptica en la vía de las fibras musgosas hipocampales (Shankaranarayana Rao y col., 1998c). Estos cambios se deben a la experiencia de autoestimulación y no a los efectos de la mera estimulación eléctrica (Shankaranarayana Rao y col., 1993). Además, son duraderos, sostenibles en el tiempo, incluso 60 días después de la finalización del tratamiento de AEIC (Shankaranarayana Rao y col., 1998b). Estos autores sugieren que los cambios encontrados en las neuronas piramidales de CA3 podrían estar relacionados con la experiencia de aprendizaje asociada a la AEIC, pudiendo, de esta manera, aumentar la capacidad cognitiva y atencional de los animales. Así, se ha podido comprobar que un tratamiento de AEIC de

estas características facilita la posterior adquisición de tareas de aprendizaje espacial y operante en ratas (Yoganarasimha y col., 1998). Teniendo en cuenta también que tanto las espinas dendríticas como las excrescencias de las neuronas piramidales de CA3 se han propuesto como el principal sustrato para la modificación sináptica asociada con la plasticidad funcional en el hipocampo (Mahajan y Desiraju, 1988), una hipótesis explicativa de la ocurrencia de los cambios plásticos a largo plazo después del tratamiento de AEIC podría ser que éstos fueran ocasionados a través de la inducción de la PLP consecuente a la estimulación eléctrica reforzante del tejido nervioso. Por otro lado, los cambios encontrados en la corteza motora, probablemente respondan a un incremento en las aferencias a las neuronas piramidales desde vías sensoriomotoras, así como desde otros circuitos implicados en la planificación y ejecución de la actividad motora (Shankaranarayana Rao y col., 1993).

Teniendo en cuenta que los fenómenos de plasticidad neural pueden incluir cambios neuroquímicos (Martin y col., 2000), se ha podido comprobar que la AEIC del HL y del ATV-SN aumenta significativamente los niveles de glutamato, DA, NA y la actividad enzimática de la acetilcolinesterasa (AChE) en el hipocampo y en el córtex motor (Shankaranarayana Rao y col., 1998a) y que es capaz de estimular la expresión de genes de células hipocampales cuya expresión promueve la síntesis de moléculas implicadas en mecanismos de plasticidad y aprendizaje y consolidación de la memoria (Huguet y col., 2007). Así, las diferentes interacciones neuroquímicas inducidas por la AEIC podrían estar implicadas en los mecanismos de sinaptogénesis y ser las responsables de los cambios estructurales producidos (Shankaranarayana Rao y col., 1998a), e incluso del efecto facilitativo mostrado sobre las capacidades cognitivas de los animales (Yoganarasimha y col., 1998; Yoganarasimha y Meti, 1999).

## 4. EL LABERINTO ACUÁTICO DE MORRIS

### 4.1 INTRODUCCIÓN

Como ya se comentó en el planteamiento de este trabajo, el laberinto de agua fue diseñado en 1981 por Richard G. Morris para estudiar y evaluar el aprendizaje y la memoria espacial en ratas de laboratorio y, desde entonces, se ha convertido en uno de los instrumentos de uso más frecuente en Neurociencia del comportamiento. Sin duda, una de las razones de su éxito es su relativa simplicidad y el hecho de que se eviten los problemas generados por las claves olfativas que se acumulan en los laberintos tradicionales. No obstante, aunque el procedimiento básico es relativamente simple, también ha sido usado en algunos de los más sofisticados experimentos en el estudio de la Neurobiología y Neurofarmacología del aprendizaje y la memoria espacial así como en la validación de modelos animales (roedores) de desórdenes neurocognitivos. El laberinto acuático se ha ganado, por tanto, una posición importante en el corazón de la investigación en Neurociencia de nuestros días y aunque ha recibido diferentes nombres (piscina de Morris, laberinto Morris, laberinto acuático, laberinto de nado, tarea de navegación espacial), el más común ha sido y es el de Laberinto Acuático de Morris (LAM).

El LAM es una piscina circular llena de agua a una temperatura que oscila entre 18 y 27 °C, según se utilicen ratas o ratones, en la que se sumerge una plataforma que debe ser localizada por el animal. El agua se vuelve opaca con leche o alguna sustancia no tóxica para que el animal no vea la plataforma aunque se ha demostrado que esto no es necesario ya que el animal nada con la cabeza por encima del agua, lo que le impide ver la plataforma. Aunque originalmente Morris (1984) describió dos tanques para ratas: uno de 132 cm de diámetro y otro de 214 cm de diámetro, el laberinto también se adapta para ratones variando el tamaño (120-200 cm para ratas y 73-180 cm para ratones) y la altura del aparato (56-75 cm para ratas y 28-57 cm para ratones), así como la plataforma de escape (19 x 22 cm para ratas y 6 x 6 cm para ratones). En la

versión tradicional del laberinto los sujetos experimentales nadan desde diferentes puntos de salida, situados en el perímetro de la piscina, hasta encontrar la plataforma escondida bajo el agua. Para localizar la plataforma, el sujeto depende de *landmarks* o puntos de referencia. El término *landmark* engloba un amplio rango de posibilidades tales como pequeños faros u objetos en la piscina y, por tanto, relativamente cerca de la plataforma, conjuntos de objetos localizados inmediatamente alrededor de la circunferencia de la piscina (e.g., Prados y Trobalon, 1998; Rodrigo y col., 1997); y, en la mayoría de los experimentos, otros objetos localizados en la habitación en la que se encuentra la plataforma (una mesa, una lámpara, pósters en las paredes, ventanas, una puerta o incluso claves estáticas generadas en el laboratorio como el aire acondicionado). En muchos de estos experimentos se utilizan simultáneamente estos diferentes tipos de claves (Chamizo y col., 2006). Respecto al número de objetos distales al laberinto suficientes para garantizar el aprendizaje, se ha demostrado que una cortina alrededor de la piscina retrasa la adquisición de la tarea (Morris, 1981) y que cuanto más simple es el entorno exterior al laberinto más fácil es el aprendizaje de lugar (Lamberty y Gower, 1991). No obstante, las ratas de los experimentos de Prados y Trobalon (1998) y Rodrigo y colaboradores (1997) tuvieron dificultades para encontrar la plataforma escondida cuando sólo se utilizaba un único punto de referencia. Por otro lado, la precisión con la que las ratas pueden estimar la distancia entre las diferentes claves y la plataforma varía inversamente con la distancia (Chamizo y col., 2006). Así, como corroboró un estudio de Chamizo y Rodrigo (2004) a menor distancia, más probable es que una única clave sea suficiente para localizar la plataforma. Ellas entrenaron a ratas con una única clave presente y registraron la latencia para alcanzar la plataforma en los ensayos de entrenamiento y la proporción de tiempo que los sujetos pasaron en el cuadrante target en los ensayos de prueba. En ambas medidas, la ejecución de las ratas fue mejor cuando la única clave se encontraba suspendida inmediatamente sobre la plataforma que cuando se encontraba sobre la pared de la piscina (a unos 50 cm de la plataforma) y mejor en esta segunda condición que en una tercera, cuando



la clave se suspendió sobre la pared de la piscina en el cuadrante opuesto al de la plataforma (a unos 110 cm de ella). La proximidad de la clave a la plataforma es un factor importante y a tener en cuenta a la hora de diseñar el procedimiento experimental, sobretodo para evitar posibles fenómenos de ensombrecimiento cuando se trabaja con más de una clave.

Otros estudios experimentales han comprobado que los roedores normales, sin lesión o déficit cognitivo asociado a la edad, aprenden a localizar rápidamente la plataforma sumergida usando vías directas que indican que la navegación a un punto fijo y oculto en el espacio puede ser guiada por información de la memoria sobre su relación espacial con claves distales y externas al laberinto que se encuentran “lejos” del lugar de la piscina el en que se hallan los sujetos. Así, con esta tarea es posible valorar memoria de referencia espacial (memoria episódica), si la plataforma y los objetos mantienen siempre la misma relación espacial y también la memoria de trabajo, cuando esta relación cambia en cada ensayo. La memoria de referencia es independiente de los ensayos y permite aprender el procedimiento general de ejecución de la tarea y la memoria de trabajo en cambio es una memoria temporal que depende de cada ensayo. El LAM puede también utilizarse como tarea no espacial. En este procedimiento la plataforma es visible y puede llevar acoplada alguna señal, por lo que los animales resuelven la tarea sin hacer uso, necesariamente, de la información que el espacio proporciona (esencial para la versión plataforma oculta). De hecho, ambas versiones (oculta-visible) no son igualmente sensibles a los déficits conductuales. Un deterioro en la tarea visible sugeriría que el tratamiento experimental está afectando a otras capacidades más que al aprendizaje espacial «*per se*» (Morris, 1984). Sin embargo, incluso con la plataforma visible, los animales podrían hacer uso de información espacial para localizar la plataforma. Únicamente una ejecución correcta de la versión oculta junto con un deterioro de la visible indicaría que los déficits motivacionales o sensoriomotores no contribuyen significativamente al aprendizaje espacial (D’Hooge y De Dyen, 2001).

En la mayoría de los estudios conductuales podemos distinguir tres fases: la de habituación a la piscina, la de adquisición del aprendizaje y la de retención del aprendizaje denominada también prueba o test. En la fase de habituación se introduce al animal con el hocico hacia las paredes de la piscina, se le deposita en el agua y se le deja nadar libremente durante 60-120 segundos. Con estos ensayos de habituación en los que la plataforma está sumergida pero las claves espaciales no están presentes, se pretende familiarizar al animal con la situación experimental y paliar los efectos interferentes sobre el mismo causados por las respuestas emocionales a los estímulos nuevos (Dieter, 1977). Finalizados los 60-120 segundos del ensayo, el animal es guiado manualmente hasta la plataforma sumergida donde se le mantiene 30 segundos. En la fase de adquisición se introduce al animal de igual manera que en la fase de habituación y se le deja también nadar libremente durante unos 60-120 segundos para que busque la plataforma. En estos ensayos de adquisición tanto la plataforma como las claves espaciales están presentes. Se considera que el sujeto ha encontrado la plataforma cuando permanece en ella 5 o 10 segundos. En caso de no encontrarla, igual que en la fase de habituación, el animal es guiado por el experimentador hacia la plataforma donde se le ayuda a subir y se le deja 30 segundos. Pasados estos segundos, se retira al animal de la plataforma y se le deja descansar brevemente en su jaula habitual antes de iniciar el siguiente ensayo. Este procedimiento se repite en los distintos ensayos y a lo largo del entrenamiento. La capacidad del animal para localizar eficientemente la plataforma depende de la utilización de las claves que rodean a la piscina. Después de esta fase de adquisición o aprendizaje, que puede durar varios días, se realiza una prueba final de retención, ensayo de prueba o test en el que se retira la plataforma de la piscina. En este ensayo se permite al animal nadar entre 60-100 segundos y se registra el tiempo que éste pasa en el cuadrante target (donde debiera encontrarse la plataforma), el tiempo que pasa en el resto de cuadrantes y las trayectorias de nado. Ésta es una prueba de preferencia espacial en la que, si el animal ha aprendido a localizar la plataforma en base a las claves distales al laberinto, nadará más tiempo en el

cuadrante target, es decir, en el que debiera estar situada la plataforma (ver figura 6).

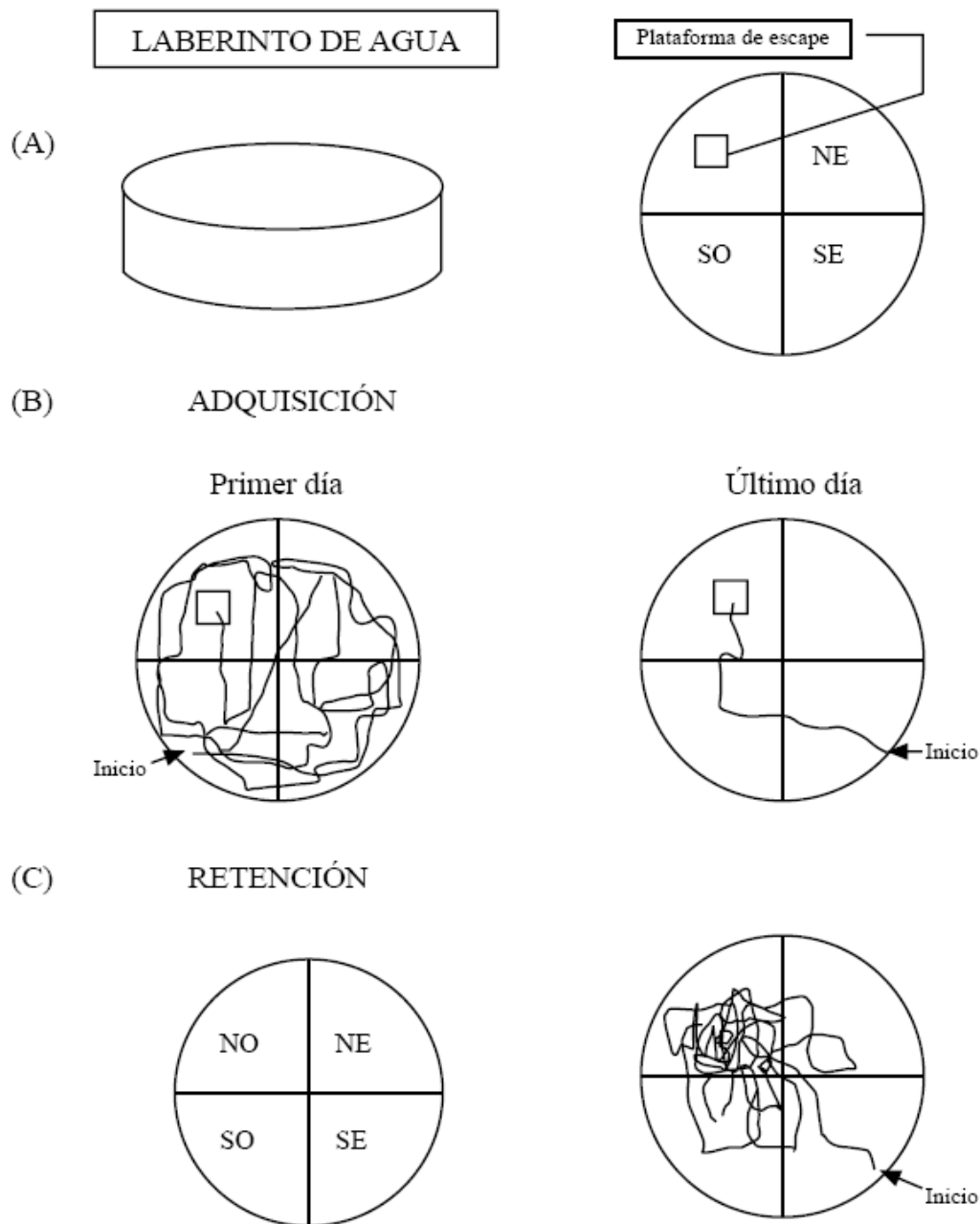


Figura 6. (A) Laberinto de agua y lugar donde se sitúa la plataforma sumergida (representada por un pequeño cuadrado). (B) Trayectoria que realiza el animal para alcanzar la plataforma sumergida durante la fase de adquisición. En el primer día de entrenamiento muestra un patrón de búsqueda desorientado, mientras que el último día su trayectoria es directa hacia la plataforma sumergida. (C) Trayectoria del animal en la prueba final sin plataforma. En esta prueba de retención el sujeto nada más tiempo en el cuadrante donde estaba situada la plataforma (cuadrante target). Figura extraída de Vicens, Redolat y Carrasco (2003).

## **4. 2 CONSIDERACIONES METODOLÓGICAS**

Los estudios realizados en el LAM han puesto de manifiesto que la ejecución de los sujetos puede verse afectada por factores tales como: las características de los animales experimentales, el propio instrumento o laberinto acuático y el procedimiento de entrenamiento. A continuación se desarrollará con más detalle cada uno de estos factores.

### **4.2.1 SUJETOS EXPERIMENTALES**

Factores como el peso, el desarrollo físico, la edad, el género y la especie o cepa de los animales pueden influir en la velocidad de nado (Wenk, 1998). Más aún, las diferencias en la ejecución de la tarea no sólo existen entre especies diferentes sino también entre cepas diferentes de ratas y ratones (Crawley, 1996; Lipp y Wolfer, 1998). Además, algunos estudios han demostrado que el aprendizaje espacial puede verse severamente afectado en animales estresados, enfermos, desnutridos o viejos.

#### 4.2.1.1 Diferencias por sexo

Diferentes pruebas experimentales han puesto de manifiesto que los roedores macho aprenden antes que los roedores hembra las tareas de aprendizaje espacial en el LAM (Brandeis y col., 1989; Forcano y col., 2007). Por ejemplo, Forcano y sus colaboradores (2007) entrenaron a dos grupos de ratas Long-Evans, uno de machos y otro de hembras, en el LAM con una única clave situada en el cuadrante opuesto al de la plataforma y observaron que las ratas macho aprendieron más rápidamente que las ratas hembra a nadar hacia la plataforma pero que pasaron menos tiempo que éstas en el cuadrante target durante la segunda mitad de cada ensayo de prueba. De acuerdo con estos autores, las ratas macho pasarían menos tiempo que las hembras buscando la plataforma en los ensayos de prueba porque se darían antes por vencidos al no encontrarla. No obstante, cuando la tarea de aprendizaje se simplificó, situando la plataforma muy cerca de la clave, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos. Éstos aprendieron igual de

rápido y dejaron de buscar la plataforma en el cuadrante target en la segunda mitad de cada ensayo de prueba. Por otro lado, Bucci y sus colaboradores (1995) observaron una ejecución muy parecida entre ratas macho y hembra de 6 meses de edad sugiriendo que las aparentes diferencias sexuales en animales más jóvenes podrían estar reflejando simplemente una diferencia en la velocidad de maduración de los sujetos.

Las hormonas sexuales podrían jugar un rol importante en las diferencias observadas entre machos y hembras. Un experimento de Roof (1993) demostró que las hembras que habían sido tratadas con testosterona durante su primera semana de vida no difirieron de los machos en el entrenamiento de adquisición en el LAM. Además, otros estudios experimentales mostraron que las ratas hembra no ovariectomizadas presentaron niveles de adquisición inferiores a las ovariectomizadas (Daniel y col., 1999) y que las ratas hembra ejecutaron mejor la tarea con plataforma-escondida durante la fase estral que proestral (Warren y Juraska, 1997). Además, la inyección intrahipocampal de estradiol mejoró la adquisición en el LAM en las ratas hembras ovariectomizadas igualándolas a las macho (Packard y col., 1996). Se ha sugerido también que las alteraciones en el sistema colinérgico podrían ser la base de las diferencias sexuales en el aprendizaje en el LAM. En este sentido, se ha comprobado, por ejemplo, que los ratones hembra parecen ser más sensibles que los macho a los efectos de la escopolamina, un bloqueador colinérgico (Berger-Sweeney y col., 1995) y que el estradiol facilita la adquisición de las ratas macho en el LAM mientras que la escopolamina bloquea estos efectos (Packard y col., 1996). El estradiol, por tanto, podría ser la hormona que interactuaría principalmente con el sistema colinérgico para potenciar el aprendizaje espacial.

#### 4.2.1.2 Diferencias entre especies y cepas.

Estudios comparativos entre las capacidades espaciales de ratas y ratones indican la existencia de diferencias entre especies, e incluso entre cepas, en la ejecución en el LAM pero no en otros laberintos como el radial. Se ha

demostrado, por ejemplo, que los ratones son capaces de aprender el laberinto de agua aunque lo hacen más lentamente que las ratas (Whishaw y Tomie, 1996). Una posible explicación de ello es, por un lado, el que la flotación y la tigmotaxis (tendencia a nadar alrededor de las paredes) tienden a ser más pronunciadas en los ratones que en las ratas, lo que complicaría las pruebas y, por otro lado, el hecho de que los ratones en determinados paradigmas de evitación activa tienden a paralizarse (respuesta de freezing) y a aplazar la respuesta de huida más que a buscar una posible ruta de escape (D'Hooge y De Deyn, 2001). Además, la tasa de adquisición y retención en este laberinto puede diferir entre cepas (Diana y col., 1994; Lindner y Schallert, 1988) y dentro de la misma cepa (Herrero y col., 2004) lo que según Lamberty y Gower (1996) podría deberse a las diferencias hipocampales, emocionales o de sensibilidad a nuevos ambientes. Por otro lado, si bien las ratas (*Rattus norvegicus*) y los ratones (*Mus musculus*) han sido, de lejos, los sujetos experimentales que con mayor frecuencia se han utilizado en el LAM también se ha trabajado con otras especies animales como los ratones de campo (*Microtus pennsylvanicus*) y los jerbos (*Meriones unguiculatus*) (Corbett y col., 1992).

#### 4.2.1.3 Edad

Los diferentes estudios realizados han puesto de manifiesto que, en general, la ejecución en el LAM declina con la edad de los animales (Brandeis y col., 1989; Deupree y col., 1991; Gower y Lamberty, 1993). No obstante, existe gran variabilidad interindividual, ya que algunos animales viejos aprenden esta tarea tan eficientemente como los jóvenes, mientras otros muestran un marcado deterioro (Gallagher y col., 1993). Deterioro que podría deberse a la alteración de la función y morfología de la formación hipocampal (Foster, 1999; Gallagher y Nicolle, 1993; Geinisman y col., 1995; Shapiro, 2001). No obstante, ha sido difícil encontrar marcadores hipocampales relacionados con el deterioro cognitivo debido al envejecimiento (Geinisman y col., 1995). Con todo, el paradigma de navegación espacial parece ser un modelo apropiado para evaluar tales déficits, ya que las representaciones del entorno dependen en gran

medida de un funcionamiento hipocampal eficiente, el cual puede verse deteriorado en el proceso de envejecimiento tanto humanos como en animales (Barnes, 1998).

#### 4.2.1.4 Nutrición

Factores relacionados con la nutrición, como la administración de antioxidantes o la restricción calórica, podrían paliar y/o prevenir los déficits en la ejecución en el LAM que se asocian generalmente al envejecimiento (Casadesus y col., 2002). En concreto, se ha visto que una dieta hipocalórica previene los déficits asociados a la edad en ratas de 24 meses de edad (Pitsikas y col., 1990; Stewart y col., 1989) y que la restricción de comida incrementa la resistencia de las ratas a los déficits de aprendizaje inducidos por la inyección intrahipocampal de kainato (Bruce-Keller y col., 1999). No obstante Bedi (1992) infra-alimentó a ratas durante los 30 primeros días de vida y encontró que estos animales realizaban peor que los sujetos control la tarea con plataforma-escondida en el LAM. Por otro lado, un trabajo de Bellush y sus colaboradores (1996) puso de manifiesto que la restricción dietética en ratones afectó la adquisición de la tarea con plataforma-escondida. Finalmente, se ha visto que algunos suplementos dietéticos con extractos de bayas azules, espinacas y fresas previenen el deterioro asociado a la edad en el LAM, lo que se explicaría por la actividad antioxidante de estos alimentos (Joseph y col., 1999).

#### 4.2.1.5 Estrés e infección

Se sabe que las funciones cognitivas, tanto en animales como en personas, también se ven afectadas por factores como el estrés. El aprendizaje en el LAM suele ser una tarea aversiva para los sujetos experimentales. El estrés deteriora las tareas de memoria hipocampo-dependientes como el LAM (Holscher, 1999; Smith, 1996). Se ha observado que la adquisición de la tarea con plataforma-escondida en el LAM fue deficiente en ratas Wistar-Kyoto hiperreactivas al estrés (Grauer y Kapon, 1993) y las ratas que recibieron un shock eléctrico en las patas antes de realizar la prueba test presentaron una deficiente ejecución en el

LAM y un incremento de los niveles de corticosterona en plasma (De Quervain y col., 1998). Otro estudio experimental de Bodnof y sus colaboradores (1995) demostró que las ratas expuestas durante tres meses a corticosterona (suficiente para mimetizar los niveles hormonales que se observan tras un estrés moderado) presentaron déficits espaciales y una reducción de la plasticidad sináptica en el hipocampo. Además, el incremento crónico de los niveles de glucocorticoides circulantes se relacionó con la pérdida de células hipocampales y la subsiguiente alteración en la ejecución del laberinto de agua (Sandi y col., 1997). Otro estudio de Sandi (1998) sugirió que la liberación de hormonas esteroideas adrenales como consecuencia del estrés influiría directamente sobre la formación de la memoria. En este sentido, se ha observado que, tanto el exceso como la disminución de los niveles de hormonas adrenales, deterioran no sólo la adquisición sino también el recuerdo de la información espacial (Walther y col., 1999).

Por otro lado, varios agentes infecciosos y parásitos pueden también afectar el comportamiento del huésped infectado. En este sentido, se ha visto que algunas infecciones virales o bacterianas deterioran directa o indirectamente la ejecución de las ratas o ratones infectados en la tarea con plataforma-escondida en el LAM (Gibertini y col., 1995; McLean y col., 1993; Yayou y col., 1993). Otros factores como el alcohol, las sustancias tóxicas y la privación de sueño pueden deteriorar también el aprendizaje y la memoria espacial en el LAM. Se ha visto, por ejemplo, que la privación de sueño paradójico en intervalos específicos (5-8 h) tras la adquisición de esta tarea deteriora la ejecución de los animales cuando la plataforma permanece oculta pero no cuando es visible (Smith y Rose, 1996). De forma sorprendente, el aislamiento social, aunque altera otras conductas, como la habituación en el campo abierto, no parece inducir un deterioro espacial, sino que incluso puede mejorar la adquisición del laberinto de agua (Wongwitdecha y Marsden, 1996).



#### 4.2.1.6 Experiencia previa

Algunas pruebas experimentales han puesto de manifiesto que el deterioro asociado a la edad en la ejecución de tareas espaciales puede modificarse por la experiencia en la misma tarea tanto en ratas (Bierley y col., 1986) como en ratones (Vicens y col., 2002). La ejecución en las tareas espaciales tiende a permanecer constante o incluso mejorar cuando son evaluadas repetidamente (Pitsikas y col., 1991; Vicens y col., 1999). Los estudios longitudinales sugieren que los efectos beneficiosos del entrenamiento sobre el deterioro de la memoria espacial asociado a la edad podrían relacionarse con la plasticidad cerebral que se mantiene incluso a edades avanzadas, lo que induciría cambios neurobiológicos similares a los descritos tras la utilización de ambientes enriquecidos (Van Praag y col., 2000).

#### **4.2.2 PROTOCOLOS DE ENTRENAMIENTO, ESTRATEGIAS DE NADO Y PARÁMETROS ANALIZADOS.**

Los protocolos de entrenamiento básico incluyen el entrenamiento de adquisición de la tarea plataforma-escondida, el test de prueba (trial test) y el test de working memory (reversal test) (Wenk, 1998). No obstante, otros autores han descrito variaciones de estos protocolos incluyendo diferentes procedimientos de preentrenamiento, plataformas flotantes y protocolos mixtos de adquisición y retención (Brandeis y col., 1989; Stewart y Morris, 1993). Por ejemplo, Markowska y sus colaboradores (1993) realizaban ensayos de prueba inmediatamente después de cada sesión diaria de entrenamiento, en ratas. Estos autores obtuvieron curvas de aprendizaje muy buenas especialmente cuando utilizaban ensayos de prueba en los que la plataforma de escape estaba disponible únicamente tras un intervalo de tiempo variable.

El entrenamiento estándar en la versión plataforma-escondida usualmente consiste en bloques de 4 ensayos cada uno en los que se va variando aleatoriamente el punto de salida del animal. Como ya se ha comentado

anteriormente, cada ensayo tiene una duración de entre 60 y 120 segundos, tras los cuales el animal es guiado por el experimentador hacia la plataforma donde permanecerá un corto periodo de tiempo (p.e, 20-30 segundos). Los datos obtenidos en cada sesión de adquisición se utilizan para obtener un promedio por bloque de ensayos. Normalmente el parámetro más utilizado para establecer este promedio es la latencia de escape de cada sujeto, es decir, el tiempo que el animal tarda en localizar y subir a la plataforma en cada ensayo. Tras una serie de bloques de ensayos de adquisición, se realiza uno o varios ensayos de prueba o ensayos de transferencia, durante los cuales se retira la plataforma de la piscina y se permite al animal nadar durante un periodo de tiempo determinado (p.e, 60-100 seg.). Durante el ensayo de prueba, la precisión espacial del animal está determinada y representada por el tiempo que el animal pasa en el cuadrante donde debiera encontrarse la plataforma (cuadrante target) o por el número de veces que el animal pasa por el área virtual que forma la plataforma. Un animal bien entrenado muestra una mayor preferencia por el cuadrante target y pasa una media de tiempo igual o superior al 50% de su tiempo libre de nado explorando ese cuadrante. Alternativamente, estos bloques de ensayos de adquisición pueden estar seguidos por bloques de ensayos en los que se ha cambiado la posición de la plataforma y en los que el animal debe establecer una nueva relación espacial entre la plataforma y las claves visuales (reversal training). Por otro lado, el entrenamiento de adquisición en la tarea plataforma-visible (p.e, colocando una bandera encima de la plataforma) se ha usado a veces como una tarea de control no espacial. No obstante, se visto que incluso durante el entrenamiento en esta tarea los ratones parecen usar información espacial para localizar la plataforma (Hauben y col., 1999).

Respecto a las estrategias de nado, un animal puede usar básicamente 3 estrategias diferentes para alcanzar la plataforma de escape durante los ensayos de entrenamiento (Brandeis y col., 1989). Pueden aprender una secuencia de movimientos que les llevará hacia la plataforma (estrategia práxica); pueden

aproximarse a la plataforma usando claves proximales (estrategia táxica); o pueden navegar hacia la plataforma usando la información sobre la localización de la plataforma que les proporciona la configuración espacial de claves distales (estrategia espacial o mapeo). Así, los resultados han puesto de manifiesto que las ratas Sprague-Dawley son capaces de usar trazas de olor para localizar la plataforma en un *circular two-choice water maze* (Means y col., 1992). Esto también podría suceder en un experimento típico de LAM, si se permitiera a los animales usar una estrategia táxica basada en olores en ausencia de claves visibles dentro del laberinto. Además, como ha demostrado Dalm y sus colaboradores (2000), un animal podría utilizar tanto estrategias prácticas como espaciales para localizar la plataforma escondida incluso cuando las posiciones de salida del animal se aleatorizan.

Finalmente, en cuanto a los parámetros analizados, Crabbe y sus colaboradores (1999) han señalado que, a diferencia de muchas otras variables como el aparato, el protocolo de entrenamiento, la edad de los animales, las condiciones de estabulación, la cepa del animal..., la latencia de escape durante el entrenamiento en el LAM no se ve afectada significativamente por variables ambientales. Así, las medidas conductuales más utilizadas son la latencia de escape en los ensayos de adquisición y el porcentaje de tiempo que el sujeto pasa en el cuadrante target durante la prueba test. La adquisición se refleja en menores latencias de escape a lo largo de los días y la retención en el mayor porcentaje de tiempo en el cuadrante target. Estas medidas se registran mediante cronómetros o métodos computerizados. En este sentido, aparatos como el Ethovision, el Smart u otros analizadores de imagen digital valoran conductas más específicas (distancia total recorrida por el sujeto, velocidad de nado, trayectoria de nado, tiempo en paredes, tiempo en cada cuadrante o error en el ángulo de la cabeza) y son más sensibles a los factores que afectan la ejecución (Gerlai, 2001). Durante la prueba test se pueden valorar distintos parámetros: exactitud del ángulo de la cabeza, porcentaje del camino recorrido

en el cuadrante de entrenamiento o número de cruces sobre el lugar donde se localizaba anteriormente la plataforma.

### **4.3. CONSIDERACIONES GENERALES**

El LAM, por tanto, reflejaría la complejidad de la navegación espacial, mostrando cómo los animales se orientan eficientemente en el espacio mediante su capacidad de establecer y retener asociaciones entre estímulos ambientales. A pesar de ser una tarea aversivamente motivada este paradigma resulta muy útil para investigar los mecanismos neurobiológicos implicados en el aprendizaje y la memoria espacial. Además permite una evaluación exhaustiva de la capacidad espacial de los animales, tanto en los ensayos de entrenamiento como en la prueba final, pudiéndose obtener diferentes medidas de su conducta espacial. En comparación con el laberinto radial, el LAM posee ciertas ventajas como es el que resulte más fácil detectar y cuantificar las diferentes estrategias de búsqueda, su mayor sensibilidad a los cambios que en estas estrategias producen las lesiones cerebrales o la administración de fármacos y el hecho de que no requiera privación de agua o comida (Hodges, 1996).

En suma, a pesar de su relativa simplicidad, el LAM constituye un paradigma sensible a numerosos factores conductuales, farmacológicos e incluso sociales. Además, su utilización virtual en la experimentación con humanos confirma en gran medida lo hallado con roedores y demuestra que este paradigma es un instrumento útil para el estudio del aprendizaje y la memoria espacial.

# **III. TRABAJO EXPERIMENTAL**

### **III. TRABAJO EXPERIMENTAL**

#### **1. PLANTEAMIENTO**

La finalidad de este trabajo es establecer un modelo conductual de facilitación del aprendizaje y la memoria espacial, relacional o explícita e hipocampo-dependiente, por autoestimulación eléctrica intracraneal post-entrenamiento en el Laberinto Acuático de Morris. Para ello, realizamos 4 experimentos consecutivos con ratas Wistar. En cada uno de ellos, los sujetos experimentales realizaron al menos 5 sesiones de adquisición, una diaria, y ensayos de 2 minutos de duración. Cada ensayo se iniciaba desde una posición que variaba de ensayo a ensayo. Las ratas debían nadar en la piscina hasta localizar la plataforma escondida que estaba señalizada por una pelota de playa colocada sobre la pared de la piscina en el cuadrante derecho adyacente a la plataforma (experimento 1) o en el cuadrante opuesto al de la plataforma (experimentos 2, 3 y 4). En estos 4 experimentos las ratas realizaron 8, 5, 3 y 1 ensayo diario respectivamente e inmediatamente después de cada sesión de entrenamiento los sujetos del grupo AEIC recibieron el tratamiento de autoestimulación eléctrica intracraneal. Los sujetos Control no recibieron el tratamiento de AEIC. Durante el entrenamiento en la tarea plataforma-escondida, registramos la latencia de nado y otras variables como la velocidad media de nado, el tiempo en paredes y la distancia total nadada por cada sujeto. Tres días después de la última sesión de entrenamiento, los animales realizaron el ensayo de prueba que consistió en dejar nadar al animal durante 60 segundos con la pelota presente pero sin la plataforma. En este ensayo de prueba registramos la media de tiempo que cada sujeto pasó en cada cuadrante así como las trayectorias de nado.

## 2. EXPERIMENTOS.

### 2.1. EXPERIMENTO 1

#### 2.1.1 Introducción

En este primer experimento los sujetos realizaron 10 sesiones de adquisición, una diaria, de 8 ensayos cada una. Como se muestra en la figura 7, la pelota se dispuso en el cuadrante adyacente derecho al de la plataforma.

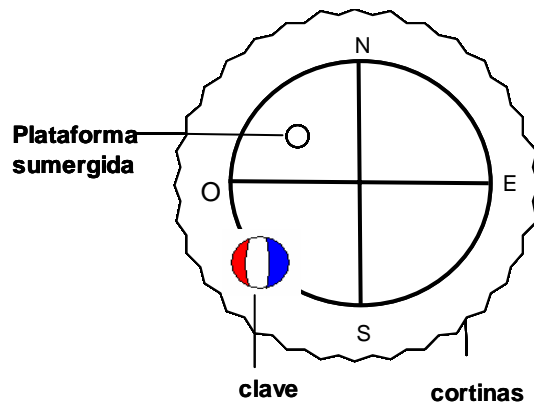


Fig. 7. Vista del LAM desde arriba. Una pelota de playa se situó dentro del recinto de la cortina, suspendida del falso techo y en el cuadrante advacente al de la plataforma.

#### 2.1.2. Material y Procedimiento

##### 2.1.2.1 Bienestar animal

El procedimiento experimental fue aceptado por la *Comissió d'Ètica en l'Experimentació Animal i Humana (CEEAH)* de la Universidad Autónoma de Barcelona y el *Departament d'Agricultura, Ramaderia i Pesca (DARP)* le asignó el número de orden 2381. Todo el procedimiento se realizó bajo las buenas prácticas de laboratorio (GLPs) asegurándose el bienestar y el estado de salud general de los sujetos experimentales de acuerdo con la directiva de la CEE y directrices que especifica la Ley 5/1995 [(DOGC 2073-10.7.1995) del 21 de Junio] de "Protección de los animales utilizados para experimentación y para otras finalidades científicas", así como del decreto que regula y reglamenta [Decret 214/1997 del 30 de Julio (DOGC 2450-7.8.97)]. Según las directrices de la Laboratory Animal Science Association (LASA), la severidad del procedimiento fue moderada.

### 2.1.2.2 Sujetos

Se utilizaron un total de 23 ratas (*Rattus norvegicus*) albinas macho de la cepa Wistar, de 96,20 días (D.S.=2,10) de edad y un peso medio de 410,64 g (D.S.=22,58) al inicio del experimento, procedentes de nuestro laboratorio. Tres días antes de la cirugía estereotáxica las ratas se aislaron y mantuvieron en cajas individuales de material plástico de tamaño homologado (25x25x14 cm), cubiertas con una tapa de enrejado metálico y provistas de un lecho de serrín. Los animales se mantuvieron bajo condiciones constantes y controladas de temperatura (20-22°C) y humedad (40-70%) bajo un ciclo de 12 horas luz (8-20H) y 12 oscuridad (20-8H) controlado artificialmente. Todos los sujetos siguieron un régimen alimenticio *ad libitum* tanto para la comida como para el agua y se testaron durante la primera mitad del ciclo de luz. El control del estado de los sujetos después de la cirugía estereotáxica se llevó a cabo mediante un protocolo de supervisión. Previamente se establecieron unos criterios de punto final para evitar el sufrimiento innecesario de los animales (véase Anexo).

### 2.1.2.3 Cirugía Estereotáxica

Previamente a la cirugía, se realizaron 2 sesiones de *handling* (una sesión diaria), de 5 minutos de duración cada una (procedimientos estandarizados). Con estas manipulaciones se pretendía disminuir la reactividad emocional de los sujetos a la posterior manipulación experimental. Durante la intervención, se implantó en todos los animales un electrodo monopolar de 230  $\mu\text{m}$  (S.0008) de diámetro en el HPM, concretamente en el HL. La implantación fue crónica y unilateral (hemisferio derecho). Las coordenadas estereotáxicas utilizadas fueron -1'8 mm posterior a bregma, + 2'0 mm lateral a la línea medial sagital y - 8'5 mm de profundidad a partir de la superficie craneal (Paxinos y Watson, 1997)(ver figura 8).



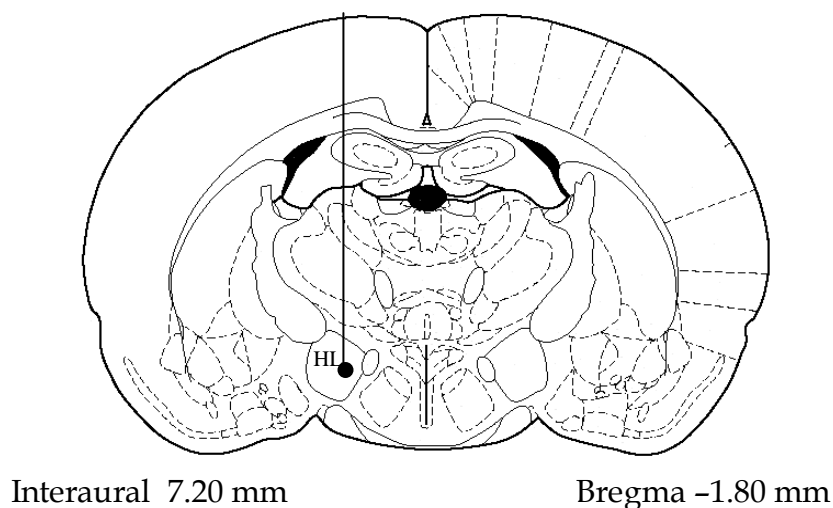


Fig. 8. Imagen del atlas de Paxinos y Watson (1997) indicando la trayectoria de paso y localización del electrodo de AEIC en el HL

En todo momento, se siguieron los procedimientos convencionales de cirugía aséptica utilizando un aparato estereotáxico digital adaptado para ratas (David Kopf Instruments, USA, modelo 1504). El electrodo de estimulación se soldaba a un conector de material plástico que, una vez implantado en el tejido cerebral, se soldaba mediante resina acrílica autopolimerizable (vértex self-curing, Dentimex, Nederland) sobre 3 tornillos de anclaje que se habían colocado en la superficie del cráneo. El electrodo de referencia consistía en un hilo de cobre de 200(μ de diámetro soldado a uno de los 3 tornillos de anclaje y a uno de los bornes del conector plástico.

La intervención de cada uno de los animales duraba aproximadamente entre 45 y 60 minutos. Se anestesiaban profundamente con una combinación de Ketamina (Imalgene, 150 mg/Kg., i.p.) y Xilacina (Rompun 8 mg/kg., i.p.). Al realizar la incisión y al aplicar los puntos de sutura, se administraba de forma tópica el anestésico local lidocaina. Durante las intervenciones se mantenía la temperatura corporal de los sujetos mediante una almohadilla térmica. Una vez finalizada la intervención se aplicaba sobre la herida quirúrgica un antiséptico tópico.

#### 2.1.2.4 Adquisición de la conducta de AEIC

Tras un período de 7 días de recuperación, durante los cuales se seguía un protocolo de supervisión como ya se mencionó en el punto 2.1.2.2, se inició el procedimiento de adquisición de la conducta de AEIC que se llevó a cabo en una caja operante de Skinner (25x20x20cm.) formada por una pared (la delantera) de cristal y tres (laterales) de metacrilato (Campden Instruments, Ltd.). En una de las paredes laterales se encontraba situada la palanca y una luz que se encendía de manera contingente a cada tren de corriente estimulante.

El equipo de estimulación consistía en un generador de corriente estimulante de onda cuadrada con módulo amplificador de salida eléctricamente aislado (Cibertec CS-20). Para controlar la corriente administrada a los sujetos se utilizó un osciloscopio Hameg (HM 412-5). La estimulación pues consistía en trenes de pulsos de onda cuadrada de 50 Hz de frecuencia. Cada tren estaba formado por 15 pulsos de 20 mseg. de duración, distribuidos en cada segundo de la siguiente manera: 0.3 seg "on" y 0.7 seg "off" (ver figura 9). Todos los parámetros de la corriente estimulante, excepto la intensidad de la misma, se mantuvieron fijos durante todo el experimento.

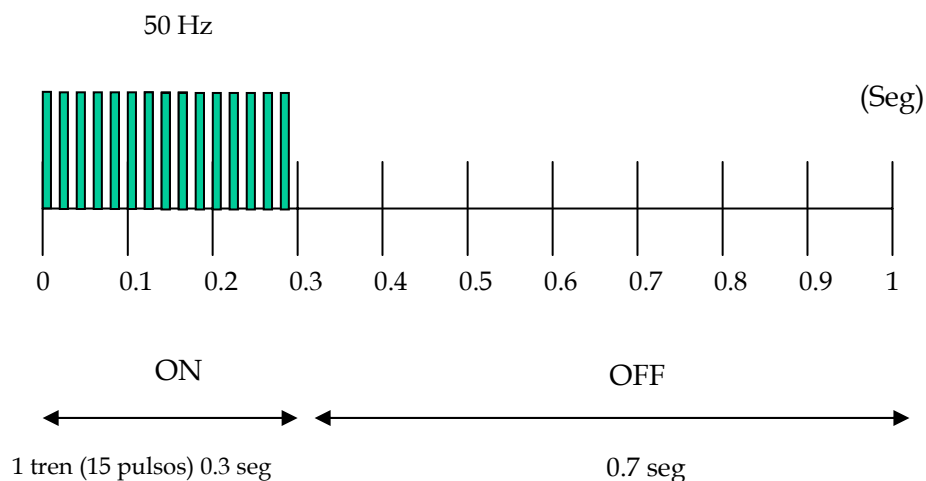


Fig. 9. Características de la corriente estimulante de AEIC. Cada reforzador consistía en un tren de 15 pulsos de 20 mseg de duración cada uno.

#### 2.1.2.4.1 Modelamiento y Asignación a Grupos Experimentales

En esta fase se empleó un procedimiento de *shaping* para instaurar en el animal la respuesta de apretar la palanca y autoadministrarse la corriente eléctrica en la caja de Skinner a través de los electrodos implantados crónicamente en su cerebro. Ello se consiguió mediante el refuerzo diferencial de las aproximaciones sucesivas a la palanca y a la conducta terminal. Todos los sujetos fueron modelados.

Una vez se conseguía la conducta meta (apretar palanca), se dejaba al animal autoestimularse durante 10 minutos a la intensidad mínima de estimulación con el fin de estabilizar la respuesta (ver figura 10). Finalizados estos 10 minutos se sacaba al animal de la caja de Skinner y se le dejaba descansar 5 minutos en su jaula habitual. Cuando los sujetos adquirieron la conducta de apretar la palanca para autoadministrarse la corriente eléctrica (AEIC) se distribuyeron aleatoriamente en 2 grupos experimentales, uno de los cuales recibiría tratamiento de AEIC post-entrenamiento (grupo AEIC) y otro no (grupo Control).

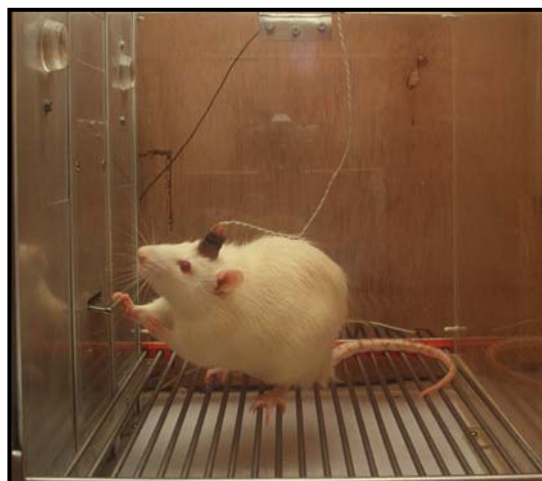


Fig. 10: Rata en una caja de Skinner recibiendo el tratamiento de AEIC

#### 2.1.2.4.2 Búsqueda de la Intensidad Óptima (BIO)

Acabados los 5 minutos de descanso, el grupo AEIC empezaba las sesiones de BIO, una por día (BIO1 y BIO2). Éstas tenían como objetivo determinar la intensidad óptima de la corriente de estimulación (IO), es decir, la intensidad de corriente que producía la mayor tasa de respuesta a la palanca en cada animal. Suponemos que una mayor tasa de respuesta de AEIC significa una mayor activación del SNR del animal y, por tanto, un efecto más placentero de la estimulación.

Cada sesión se iniciaba con una intensidad de 10  $\mu\text{A}$  y se incrementaba de 10 en 10  $\mu\text{A}$  cada dos minutos. Las respuestas del animal a la palanca empezaban a contabilizarse a partir de las 3 primeras realizadas en un intervalo de tiempo no superior a 1 minuto. Para cada intensidad, se registraba el número de respuestas efectuadas durante 2 minutos. Consideramos la IO de cada sesión de BIO para cada sujeto aquella que originaba la tasa máxima de respuesta de AEIC en el intervalo de 2 minutos. Si había varias iguales (+/-3 respuestas) se escogía siempre la intensidad de menor valor. La IO final, utilizable como tratamiento experimental en las sesiones subsiguientes, se obtenía promediando las intensidades óptimas correspondientes a las dos sesiones de BIO (BIO1 y BIO2). Tanto en la fase de modelamiento como en las sesiones de BIO se registraba el número total de respuestas a la palanca y el número total de trenes de AEIC recibidos (refuerzos), en cada una de las sesiones. Por lo general, el número de respuestas a la palanca supera al de refuerzos ya que los animales tienden a responder con una tasa de respuesta que, a veces, supera a la de refuerzos que es posible recibir (uno por segundo, según nuestro dispositivo de estimulación).

El criterio de finalización de cada sesión de BIO fue el de Segura-Torres y col. (1988) que, básicamente, consiste en dar por terminada la sesión de BIO cuando el incremento de la corriente estimulante ya no aumenta considerablemente la tasa de respuesta del animal. Mientras los sujetos del grupo AEIC realizaban las sesiones de BIO, los animales del grupo Control permanecían 5 minutos, sin recibir estimulación alguna, en la misma jaula operante donde se realizaban los BIODs.

#### *2.1.2.5 Laberinto Acuático de Morris*

##### *2.1.2.5.1 Aparato*

La tarea de escape del agua se realizó en una piscina circular elevada (diámetro, 2 m; altura 0.60 m) que se llenó con agua (hasta una altura de 0.45 m) y se mantuvo a una temperatura de  $22\pm 2$  °C. La piscina se dispuso en el centro de

una habitación en semipenumbra, montada sobre una plataforma metálica de 0.40 m de altura y rodeada por unas cortinas negras que colgaban de un falso techo hasta la base de la piscina formando un recinto de 2.4 m de diámetro. Se colocó una clave, una pelota de playa de 0.36 m de diámetro con segmentos verticales alternos en azul, blanco, rojo y amarillo, en el interior del recinto, suspendida del falso techo, 0.23 m sobre la superficie del agua y con su línea media directamente por encima de la pared de la piscina. Para la tarea de escape (sesiones de adquisición), se dispuso centralmente una plataforma de Plexiglas (diámetro: 0.11 m) sumergida 1 cm por debajo de la superficie del agua, en uno de los cuatro cuadrantes iguales en los que se subdividió virtualmente el tanque gracias a dos líneas que se cruzaban en su centro. Se añadió látex (1cl/l) (Látex Compound Española S.A) al agua para hacer la plataforma invisible al nado de la rata. Un circuito cerrado de video-cámara (Smart Video Tracking System, Version 2.5, Panlab) con una lente de ángulo ancho se montó 1.75 m sobre el centro de la piscina dentro del falso techo y sus grabaciones fueron registradas en un ordenador (modelo Benq V772) que se encontraba en la misma habitación.

#### 2.1.2.5.2 Sesiones de habituación al Laberinto

La habituación a la situación experimental previa a las sesiones de aprendizaje puede paliar los efectos interferentes sobre el mismo causados por el reflejo de orientación o por las respuestas emocionales a los estímulos nuevos (Dieter, 1977; McAllister y McAllister, 1979; McAllister y col., 1979). Por ello, la semana anterior a la primera sesión de adquisición, se llevaron a cabo 3 sesiones de habituación (una sesión diaria) al laberinto acuático de Morris. Cada sesión consistió en tres ensayos de 2 minutos de duración cada uno con un intervalo entre-ensayos (IEE) de 2 minutos. Durante los ensayos de habituación se permitió a los sujetos nadar libremente por la piscina con la plataforma presente pero sin el objeto. Pasados los 2 minutos se guió manualmente al animal hasta la plataforma donde permaneció 30 segundos (figura 11).

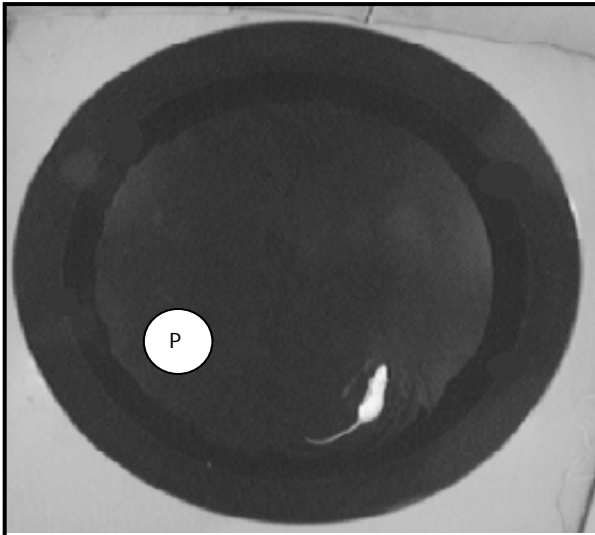


Fig. 11. Vista desde arriba de una rata nadando en el LAM.

#### 2.1.2.5.3 Sesiones de entrenamiento

Tres días después de la última sesión de habituación a la piscina, los animales fueron entrenados en una tarea de plataforma-escondida en el LAM. El paradigma general de entrenamiento consistió en 10 sesiones de entrenamiento (una sesión diaria) de 8 ensayos cada una. La plataforma escondida se señaló mediante la pelota de playa que se dispuso sobre la pared de la piscina y en el mismo cuadrante en el que se encontraba la plataforma.

Los IEE tenían una duración de 2 minutos y la plataforma y la clave fueron rotadas entre ensayos manteniéndose siempre la misma relación espacial entre ambas. Así, empezando desde cuatro posiciones diferentes en orden aleatorio (N, S, E u O), cuando la rata no encontraba la plataforma en los 2 minutos que duraba el ensayo se la guiaba manualmente hacia la plataforma y se la ayudaba a subir. Tras 30 segundos en la plataforma se retiraba de la piscina y se devolvía a su jaula habitual.

#### 2.1.2.5.4 Tratamiento de AEIC

Inmediatamente después de finalizar cada una de las sesiones de entrenamiento en el LAM, los sujetos del grupo AEIC recibieron el tratamiento de autoestimulación eléctrica, que consistió en permitir que se autoadministraran 2000 trenes de corriente estimulante a su IO final en la misma caja de Skinner

donde habían realizado las sesiones de BIO. Los sujetos del grupo Control permanecieron en la misma caja operante de Skinner, sin recibir tratamiento, 45 minutos. La magnitud de este tratamiento (intensidad aplicada y nº de trenes) se basó en el conocimiento derivado de los experimentos previos de nuestro laboratorio.

#### 2.1.2.5.5 Prueba test

Tres días después de finalizar la última sesión de aprendizaje, los sujetos experimentales realizaron la prueba test. Esta prueba consistió en un único ensayo de 60 segundos de duración con la clave presente pero sin la plataforma. Durante este tiempo se registró el tiempo que cada sujeto pasó en cada uno de los cuadrantes de la piscina así como las trayectorias de nado. Este test contrasta la hipótesis que tras el aprendizaje las ratas pasan más tiempo (de media) nadando en el cuadrante target (T) (donde debiera encontrarse la plataforma) que en el resto de cuadrantes (OP-opuesto, AD-adyacente derecho y AI-adyacente izquierdo).

#### 2.1.2.6 *Resumen del diseño experimental*

El diseño del experimento incluyó como variables dependientes: la latencia media de escape, el tiempo medio en paredes, velocidad media de nado, la distancia total nadada y el tiempo medio en el cuadrante target respecto al tiempo medio en el resto de cuadrantes del aparato. Como variable independiente se consideró el Tratamiento post-entrenamiento (AEIC versus Control). El diseño experimental de los cuatro experimentos realizados se muestra en el cuadro 1 de la página siguiente.

Cuadro 1: Resumen del diseño experimental

GRUPOS	ESTEREOTÁXIA	RECUPERACIÓN	MODELAMIENTO	BIOs	HABITUACIÓN	ADQUISICIÓN	PRUEBA TEST
<u>AEIC</u>	Implantación del electrodo de estimulación en el HL (hemisferio derecho)	7 días	Instauración en el animal de la respuesta de apretar palanca y autoadministrarse corriente eléctrica en la caja de Skinner	2 sesiones de BIO	<b>Experimento 1:</b> 3 sesiones de habituación de 3 ensayos cada una	<b>Experimento 1:</b> 10 sesiones de entrenamiento de 8 ensayos cada una <b>Experimento 2:</b> 10 sesiones de entrenamiento de 5 ensayos <b>Experimento 3:</b> 10 sesiones de entrenamiento de 3 ensayos cada una	1 ensayo sin plataforma y con clave
<u>Control</u>				---			



#### 2.1.2.7 *Análisis estadístico*

El procesamiento de los datos se realizó a través del paquete estadístico SPSS 14.0. Las pruebas principales se hicieron mediante un análisis mixto de la varianza (Modelo Lineal General-medidas repetidas y Modelo Lineal General-multivariable), con sus correspondientes análisis de contrastes, considerando la variable independiente como cualitativa (Tratamiento de AEIC-dos categorías) y las variables dependientes como cuantitativas: 1) latencia de escape como el tiempo (s) necesitado por el animal para encontrar y su subir a la plataforma. El máximo valor fue 120 s, 2) distancia media recorrida entendida como la distancia (cm) total nadada hasta alcanzar la plataforma 3) velocidad media de nado (cm/s) de los animales, 4) tiempo cerca de las paredes, 5) tiempo medio en el cuadrante target respecto al tiempo medio en el resto de áreas en la prueba test y 6) parámetros de AEIC. Se usaron también pruebas t de Student para comparar el tiempo medio que las ratas pasaban en el cuadrante target de la piscina respecto al tiempo total medio en el resto de cuadrantes.

#### 2.1.2.8 *Histología*

Al final del experimento, se realizó la valoración histológica de la implantación de los electrodos. Para ello, los animales fueron eutanasiados con una sobredosis de pentobarbital (150 mg/kg, i.p.) y perfundidos transcárdialmente con salino fisiológico al 0.9% seguido de formalina (agua y 37-40% formaldehído) al 10%. Se utilizó una bomba de perfusión a 140 r.m.p con un caudal aproximado de 40ml/minuto (J.P. Selecta, S.A. Barcelona) y, una vez fijado el tejido, se extrajeron los cerebros se guardaron en post-fijación en una solución de formalina (tres partes de agua destilada por una de formaldehído al 37-40%). Pasado el periodo de postfijación del tejido (aproximadamente 4 días), se procedió a la crioprotección de éste para su posterior congelación y corte. Mediante un criostato (Cryocut 1800, equipado con micrótomo 2020 JUNG), se obtuvieron secciones seriadas de tejido de 40 µm de grosor que se dejaron secar para su posterior tinción mediante el método de violeta de cresilo. Tras la tinción y mediante un microscopio óptico (Olympus BX 41; Olympus Optical

CO, LTD Japan) y la ayuda de un atlas esterotáxico (Paxinos y Watson, 1997), se valoró la localización de la punta de los electrodos de estimulación en todas las secciones.

### 2.1.3. Resultados

#### 2.1.3.1 Sujetos

Se llevó a cabo un control regular del peso de los sujetos ya que éste es un buen indicador de los cambios en salud que pudieran haber afectado al aprendizaje. El análisis de la varianza indicó que todos los grupos partieron de pesos similares al inicio del experimento. Tampoco se encontraron diferencias significativas entre los grupos en ningún otro momento del proceso experimental.

#### 2.1.3.2 Aprendizaje

##### 2.1.3.2.1 Latencia media de escape

En la figura 12 se representa la evolución del aprendizaje de los grupos Control y AEIC a lo largo de las 10 sesiones de entrenamiento. El estudio de la evolución del aprendizaje (MLG, medidas repetidas) indicó que tanto el grupo AEIC como el grupo Control, mostraron una tendencia lineal decreciente a lo largo de las sesiones de adquisición [*contraste polinomial*,  $F(1, 24) = 152,620$ ,  $p < 0.001$ ]. Esta evolución no dependió del grupo [*factor interacción grupo por sesión n.s*] y como puede observarse en la gráfica, las ratas Control y AEIC presentaron un nivel de aprendizaje similar a lo largo de las sesiones de entrenamiento. No obstante, para analizar específicamente el nivel de aprendizaje alcanzado por los grupos Control y AEIC en cada una de las 10 sesiones de adquisición, realizamos un análisis multivariable de la varianza (MANOVA). Este análisis puso de manifiesto diferencias estadísticamente significativas entre los grupos Control y AEIC en el tiempo medio que éstos necesitaron para encontrar la plataforma en la sexta sesión de adquisición [ $F(1, 21) = 4,757$ ,  $p = 0,04$ ]. Sorprendentemente, este día las ratas tratadas necesitaron más tiempo que las ratas control para localizar la plataforma escondida

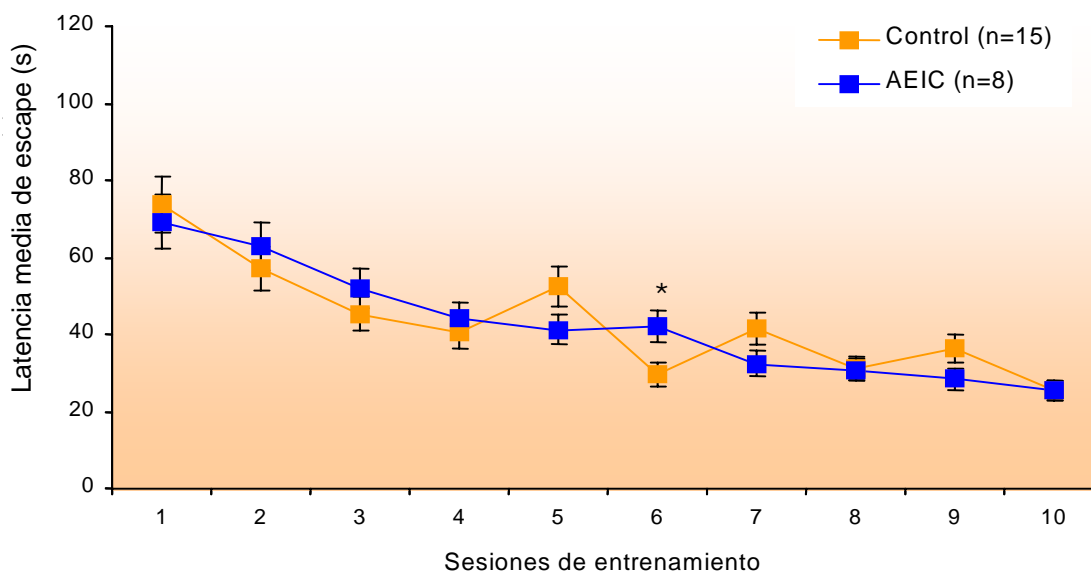


Fig. 12. Latencias medias de escape de los grupos AEIC y Control a lo largo de las 10 sesiones de entrenamiento (\*  $p < 0.05$ )

#### 2.1.3.2.2 Distancia media nadada

El MLG para medidas repetidas mostró una tendencia lineal decreciente significativa respecto a la distancia media nadada por los sujetos de los grupos Control y AEIC a lo largo de las 10 sesiones de adquisición [*contraste polinomial*,  $F(1,24) = 5,088$ ,  $p < 0.045$ ]. Esta evolución no dependió del grupo [*factor interacción grupo por sesión n.s.*]. Además el MANOVA no mostró diferencias estadísticas entre los grupos respecto a la distancia media recorrida en ninguna de las sesiones de entrenamiento.

#### 2.1.3.2.3 Velocidad media de nado

Aunque el MLG para medidas repetidas no mostró una evolución lineal significativa, se realizó un análisis multivariable de la varianza para estudiar esta variable en cada una de las sesiones de adquisición. El MANOVA indicó diferencias estadísticas entre los grupos AEIC y Control en la octava y décima sesiones [ $F(1,24) = 22,924$ ,  $p = 0,001$  y  $F(1, 24) = 5,688$ ,  $p = 0,0036$ , respectivamente]. En ambas sesiones, la velocidad media de nado fue significativamente mayor en el grupo Control que en el grupo AEIC.

#### 2.1.3.2.4 Tiempo medio en paredes

El análisis de medidas repetidas no mostró una evolución lineal significativa. No obstante, el MANOVA encontró diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos estudiados respecto al tiempo medio que las ratas pasaron nadando alrededor de las paredes del LAM en la tercera sesión de adquisición [ $F(1,24)=7,150$ ,  $p=0,022$ ]. Las ratas Control pasaron más tiempo nadando alrededor de las paredes de la piscina que las ratas AEIC.

#### 2.1.3.3 Ensayo de prueba

La figura 13 muestra el tiempo medio que las ratas pasaron en el área target respecto al tiempo medio que pasaron en el resto de cuadrantes del LAM. Tests t de Student no mostraron diferencias significativas entre los grupos AEIC y Control en el tiempo medio que pasaron en el área target [ $t=1,048$ ,  $p=0,306$ ]. Como se puede observar en la gráfica, las ratas de los grupos Control y AEIC pasaron más tiempo en el cuadrante target que en el resto de áreas [Control:  $t=28,53$ ,  $p<0,001$ ; AEIC:  $t=6,178$ ,  $p<0,001$ ] por lo que podríamos afirmar que bajo las condiciones del presente experimento, el tratamiento de AEIC post-entrenamiento no pareció facilitar el aprendizaje de los sujetos que lo recibieron.

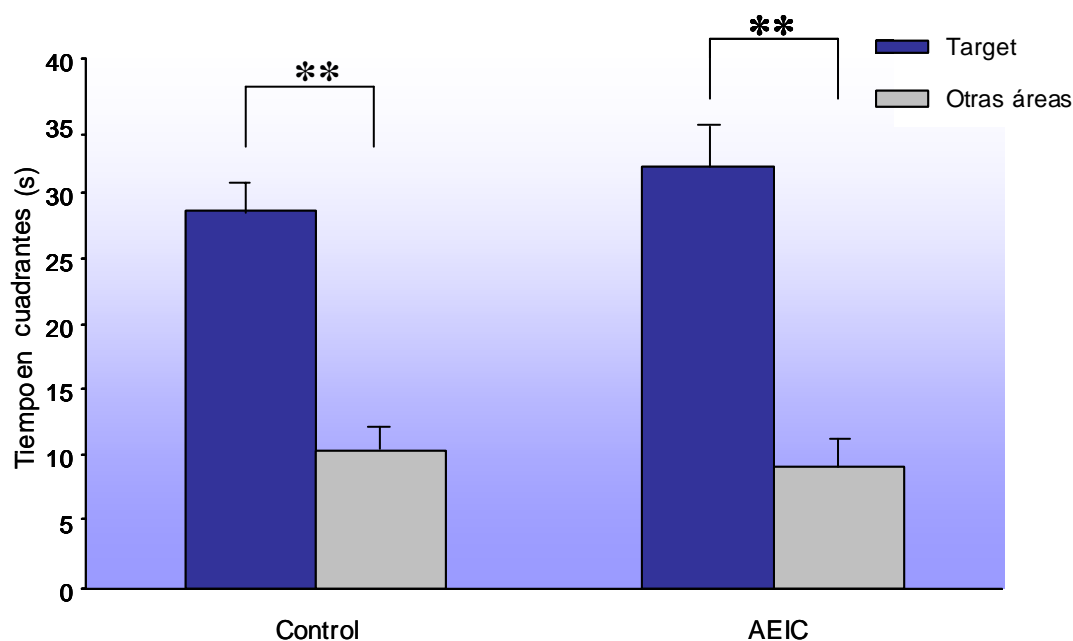


Fig. 13. Tiempo medio que las ratas Control y AEIC pasan en el cuadrante target respecto al tiempo medio que pasan en el resto de áreas en el ensayo de prueba (\*\*  $p<0,010$ )

#### 2.1.3.4 Parámetros de AEIC e Histología

Los valores medios y las D.S de las variables de AEIC se muestran en la tabla que sigue a continuación;

Grupo	IO final ( $\mu$ A)	Duración del tratamiento (min)
AEIC	10,22 (7,61)	41,08 (5,33)

Ninguno de los parámetros de AEIC evaluados se relacionó con el nivel de aprendizaje alcanzado por las ratas en las diferentes sesiones de aprendizaje de la tarea plataforma-escondida en el LAM. Además, el análisis de la regresión mostró que ninguna de estas variables se relacionó con la latencia de escape, la distancia media nadada y la velocidad media de nado durante las sesiones de entrenamiento y el ensayo de prueba.

La valoración histológica de la implantación del electrodo mostró que todos se localizaron entre las coordenadas AP - 1.30 mm y - 3.14 mm con referencia a bregma. Un análisis de regresión simple no mostró relación entre las coordenadas de localización del electrodo y las variables: parámetros de AEIC (IO, tasas de respuesta, tasas de refuerzo, duración del tratamiento y presencia de convulsiones), la latencia de escape, la distancia media recorrida, el tiempo en paredes y tiempo en el cuadrante target en el ensayo de prueba.

## 2.2 EXPERIMENTO 2

### 2.2.1. Introducción

En este segundo experimento los sujetos realizaron 10 sesiones de adquisición, una diaria, de 5 ensayos cada una. Como se muestra en la figura 14, la pelota se dispuso en el cuadrante opuesto al de la plataforma.

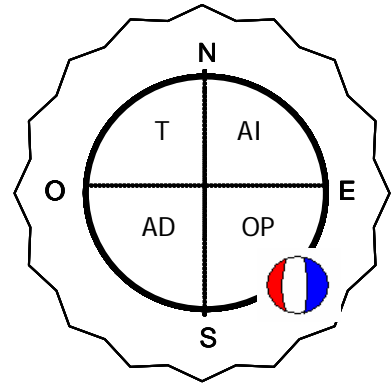


Fig. 14. Vista del LAM desde arriba. La pelota de playa se situó dentro del recinto de la cortina, suspendida del falso techo y en el cuadrante opuesto al de la plataforma.

### 2.2.2. Material y procedimiento

Se utilizaron un total de 23 ratas (*Rattus norvegicus*) albinas macho de la cepa Wistar, de 92.58 días (D.S.=2.75) de edad y un peso medio de 428.17 g (D.S.=32.06) al inicio del experimento, procedentes de nuestro laboratorio. Todo lo referente a ética y bienestar animal, procedimiento quirúrgico y coordenadas de implantación de los electrodos, aparato, análisis estadístico de los datos, modelamiento y asignación a grupos experimentales, ensayo de prueba y estudio histológico se realizó de forma idéntica al experimento 1. Respecto al diseño experimental, en este experimento se redujo el número de sesiones y ensayos de habituación (2 sesiones, una diaria, de 2 ensayos cada una) y se dificultó el aprendizaje. Así, los sujetos realizaron 10 sesiones de adquisición (una sesión diaria) de 5 ensayos cada una y se dispuso la pelota en el cuadrante opuesto al de la plataforma (ver figura). Inmediatamente después de cada sesión de entrenamiento los sujetos del grupo AEIC recibieron el tratamiento de autoestimulación que consistió en 2000 trenes de corriente estimulante a la IO final de cada sujeto. Los sujetos del grupo Control permanecieron en la misma caja operante de Skinner, sin recibir tratamiento, el mismo tiempo medio de duración del tratamiento de los sujetos AEIC (45 minutos).

### 2.2.3. Resultados

#### 2.2.3.1 Sujetos

Se llevó a cabo un control regular del peso de dichos sujetos ya que éste es un buen indicador de los cambios en salud que pudieran haber afectado al aprendizaje. El análisis de la varianza indicó que todos los grupos partieron de pesos similares al inicio del experimento. Tampoco se encontraron diferencias significativas entre los grupos en ningún otro momento del proceso experimental.

#### 2.2.3.2 Aprendizaje

##### 2.2.3.2.1 Latencia media de escape

El estudio de la evolución del aprendizaje puso de manifiesto una tendencia lineal decreciente de los dos grupos a lo largo de las 10 sesiones de entrenamiento en la tarea con plataforma escondida [*contraste polinomial.*,  $F(1, 24) = 152,620$ ,  $p < 0.001$ ]. Esta evolución no dependió del grupo [*factor interacción grupo por sesión n.s*] y, como se puede observar en la figura 15, ambos grupos presentaron un nivel de adquisición similar a lo largo de las sesiones de entrenamiento.

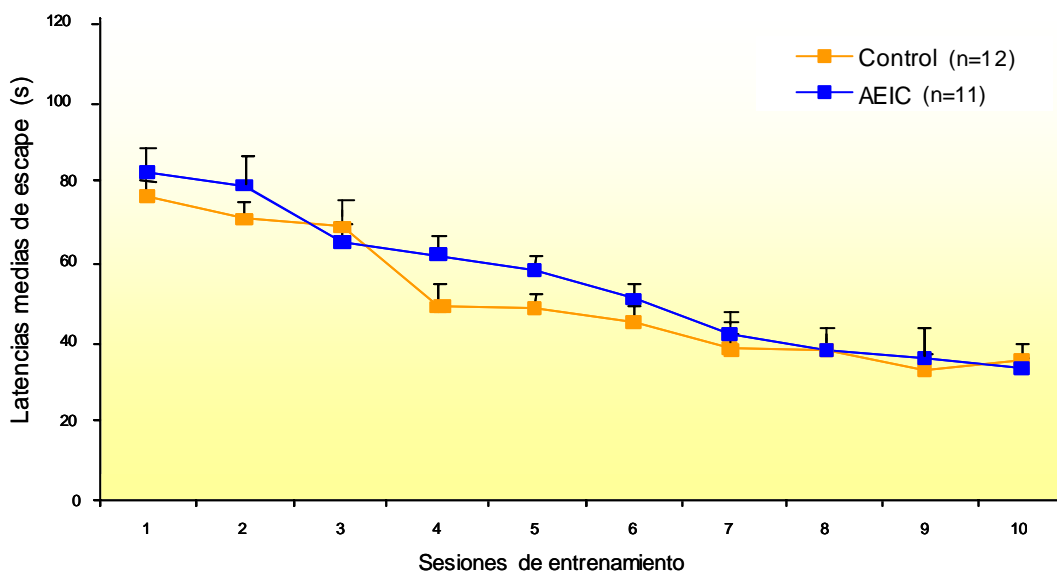


Fig. 15. Latencias medias de escape de los grupos AEIC y Control a lo largo de las 10 sesiones de entrenamiento.

#### 2.2.3.2.2 Distancia media nadada

Respecto a la distancia total media nadada, el análisis del factor intra-grupo mostró que, en general, ambos grupos mostraron una evolución lineal decreciente significativa [*contraste polinomial*,  $F(1,10)=17,646$ ,  $p=0,002$ ]. No obstante, esta evolución no dependió del grupo [*factor interacción grupo por sesión n.s.*]. Además, un análisis multivariable de la varianza no encontró diferencias respecto a la distancia media total recorrida por los grupos durante las sesiones de entrenamiento.

#### 2.2.3.2.3 Velocidad media de nado

El estudio de la evolución de la velocidad media de nado indicó que los grupos AEIC y Control mostraron una tendencia lineal decreciente significativa [*contraste polinomial*,  $F(1,10)=5,519$ ,  $p=0,041$ ]. No obstante, esto no pareció depender del grupo [*factor interacción grupo por sesión n.s.*]. Más lejos aún, un MANOVA no encontró diferencias entre los dos grupos estudiados en ninguna de las 10 sesiones de entrenamiento respecto a la velocidad media de nado de los sujetos.

#### 2.2.3.2.4 Tiempo medio en paredes

Un análisis múltiple de la varianza no mostró diferencias significativas entre los dos grupos estudiados respecto al tiempo medio que las ratas pasaron nadando alrededor de las paredes de la piscina a lo largo de las 10 sesiones de entrenamiento.

#### 2.2.3.3 Ensayo de prueba

Igual que en el experimento anterior, los resultados de los tests t de Student no mostraron diferencias significativas entre los grupos AEIC y Control respecto al tiempo medio que éstos pasaron en el área target [ $t=1,426$ ,  $p=0,167$ ]. Como se puede ver en la figura 16, en general, todos los sujetos experimentales (Control y AEIC) nadaron más tiempo en el cuadrante target que en el resto de cuadrantes [Control:  $t=3,946$ ,  $p=0,002$ ; AEIC:  $t=4,932$ ,  $p<0,001$ ] por lo que



podríamos decir que, bajo estas condiciones, el tratamiento de AEIC post-entrenamiento no pareció facilitar el aprendizaje de los sujetos tratados.

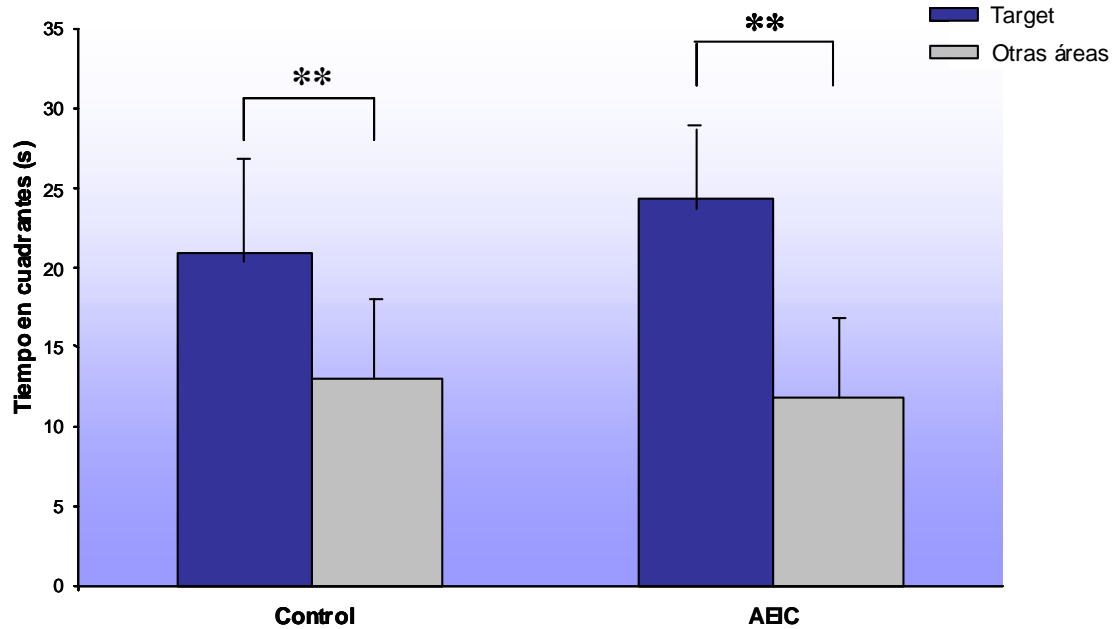


Fig. 16. Tiempo medio que las ratas Control y AEIC pasan en el cuadrante target respecto al tiempo medio que pasan en el resto de áreas en el ensayo de prueba (\*\*  $p < 0.010$ )

#### 2.2.3.4 Parámetros de AEIC e Histología

Los valores medios y las D.S. de las variables de AEIC se muestran en la tabla que sigue a continuación;

Grupo	IO final ( $\mu A$ )	Duración del tratamiento (min)
AEIC	14,58 (6,55)	40,26 (6,62)

Ninguno de los parámetros de AEIC evaluados se relacionó con el nivel de aprendizaje alcanzado por las ratas en las diferentes sesiones de aprendizaje de la tarea plataforma-escondida en el LAM. Además, el análisis de la regresión mostró que ninguna de estas variables se relacionó con la latencia de escape, la

distancia media nadada y la velocidad media de nado durante las sesiones de entrenamiento y el ensayo de prueba.

La valoración histológica de la implantación del electrodo mostró que todos se localizaron entre las coordenadas AP - 1.30 mm y - 3.14 mm con referencia a bregma. Un análisis de regresión simple no mostró relación entre las coordenadas de localización del electrodo y las variables: parámetros de AEIC (IO, tasas de respuesta, tasas de refuerzo, duración del tratamiento y presencia de convulsiones), la latencia de escape, la distancia media recorrida, el tiempo en paredes y tiempo en el cuadrante target en el ensayo de prueba.

### **2.3. EXPERIMENTO 3**

#### **2.3.1. Introducción**

En este tercer experimento los sujetos realizaron 10 sesiones de adquisición, una diaria, de 3 ensayos cada una. Igual que en el Experimento 2, la pelota se dispuso en el cuadrante opuesto al de la plataforma (ver figura 14).

#### **2.3.2. Material y procedimiento**

Se utilizaron un total de 21 ratas albinas macho de la cepa Wistar, de 93.78 días (D.S.= 3.16) de edad y un peso medio de 414.32 g (D.S.= 33.82) al inicio del experimento, procedentes también de nuestro laboratorio. Todo lo referente a ética y bienestar animal, procedimiento quirúrgico y coordenadas de implantación de los electrodos, aparato, análisis estadístico de los datos, modelamiento y asignación a grupos experimentales, sesiones de habituación, ensayo de prueba y estudio histológico se realizó de forma idéntica al Experimento 1.

Como se ha comentado, los animales realizaron 10 sesiones de adquisición (una sesión diaria) de 3 ensayos cada una con la pelota en el cuadrante opuesto al de la plataforma escondida. Igual que en los experimentos anteriores,

inmediatamente después de cada sesión de entrenamiento, los sujetos del grupo AEIC recibieron el tratamiento de autoestimulación mientras los sujetos del grupo Control permanecieron en la caja operante de Skinner, sin recibir tratamiento. El diseño experimental se recoge en el cuadro 1.

### 2.3.3. Resultados

#### 2.3.3.1 Sujetos

De acuerdo con un MANOVA, no se observaron diferencias entre los grupos AEIC y Control respecto a la evolución del peso a lo largo de las diferentes fases experimentales.

#### 2.3.3.2 Aprendizaje

##### 2.3.3.2.1 Latencia media de escape

La figura 17 muestra las latencias medias de escape de cada una de las 10 sesiones de entrenamiento. El estudio de la evolución del aprendizaje (MLG, medidas repetidas) a lo largo de las sesiones de adquisición indicó que tanto el grupo AEIC como el grupo Control mostraron una tendencia lineal decreciente significativa [*contraste polinomial*,  $F(1, 19)=90.771$ ,  $p<0.001$ ]. Como en los experimentos anteriores, esta evolución fue similar en ambos grupos [*factor interacción grupo por sesión n.s.*]. No obstante, en este tercer experimento el MANOVA mostró diferencias estadísticas entre las ratas Control y AEIC respecto al tiempo necesario para localizar la plataforma en la última sesión de adquisición (día 10)[ $F(1, 19)=5.773$ ,  $p=0.0027$ ]. En esta sesión, las ratas AEIC necesitaron menos tiempo que las ratas Control para encontrar la plataforma.

Dado que en nuestros trabajos previos hemos observado que el tratamiento de AEIC post-entrenamiento es más capaz de facilitar el aprendizaje y la memoria en ratas con un bajo nivel inicial de aprendizaje (Aldavert-Vera et al, 1996), en este experimento subdividimos a las ratas Control y AEIC, respectivamente, en dos grupos de acuerdo con el nivel de aprendizaje mostrado en la primera sesión de adquisición: “ratas aprendedoras” (RA, latencias de escape menores

que la media) y “ratas poco aprendedoras” (PA, latencias de escape superiores a la media). De este modo, obtuvimos 4 grupos experimentales: Control-RA, Control-PA, AEIC-RA y AEIC-PA.

De nuevo, el estudio de la evolución del aprendizaje indicó que todos los grupos presentaron una tendencia lineal decreciente significativa [*contraste polinomial*,,  $F(1, 18) = 21.572$ ,  $p < 0.001$ ]. En este caso, esta evolución [*factor interacción grupo por sesión*  $F(1,18) = 4.402$ ,  $p < 0.050$ ] dependió del grupo. Como mostraron los datos directos las ratas AEIC-PA disminuyeron su latencia media de nado en 72.50 s desde la primera (118.33 s) a la última sesión (35.83 s) de adquisición mientras que las ratas Control-PA sólo redujeron su latencia media de escape en 39.47 s desde la primera (98.20 s) a la última sesión (58.73 s) de adquisición. El efecto del tratamiento de AEIC pareció, por tanto, ser más fuerte en las ratas con baja capacidad inicial de aprendizaje.

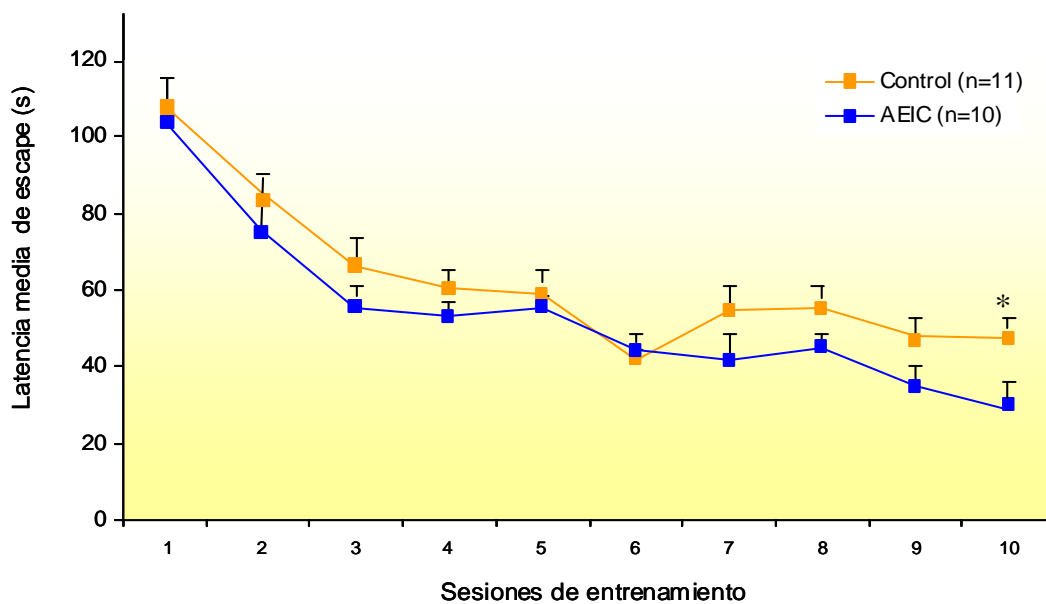


Fig. 17. Latencias media de escape en los grupos AEIC y Control a lo largo de las 10 sesiones de entrenamiento (\*\*  $p < 0.010$ )

#### 2.3.3.2.2 Distancia media nadada

Un MANOVA no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos respecto a la distancia media total nadada en ninguna de las 10 sesiones de adquisición.

#### 2.3.3.2.3 Velocidad media de nado

No se encontraron diferencias entre los grupos AEIC y Control respecto a la velocidad media de nado en ninguna de las sesiones de entrenamiento. Un MANOVA confirmó estos resultados.

#### 2.3.3.2.4 Tiempo medio en paredes

Un MANOVA no encontró diferencias significativas entre los grupos estudiados respecto al tiempo medio que los sujetos pasaron nadando alrededor de las paredes en ninguna de las sesiones de adquisición del aprendizaje de referencia espacial.

#### 2.3.3.3 *Ensayo de prueba*

La figura 18 compara el tiempo medio que las ratas Control y AEIC pasaron en el cuadrante target y en el resto de cuadrantes. En esta ocasión, los tests t de Student pusieron de manifiesto diferencias estadísticamente significativas respecto al tiempo medio que los grupos Control y AEIC pasaron en el cuadrante target ( $t=2,123$ ,  $p=0,047$ ). Estos tests mostraron únicamente una preferencia mayor a nadar en el cuadrante target que en el resto de áreas en los sujetos del grupo AEIC (Control:  $t=0,9$ ,  $p=0,389$ ; AEIC:  $t=2,047$ ,  $p=0,07$ ). Estos resultados muestran que bajo las condiciones de entrenamiento del presente experimento sólo los sujetos que recibieron el tratamiento de autoestimulación alcanzaron un nivel de aprendizaje consistente.

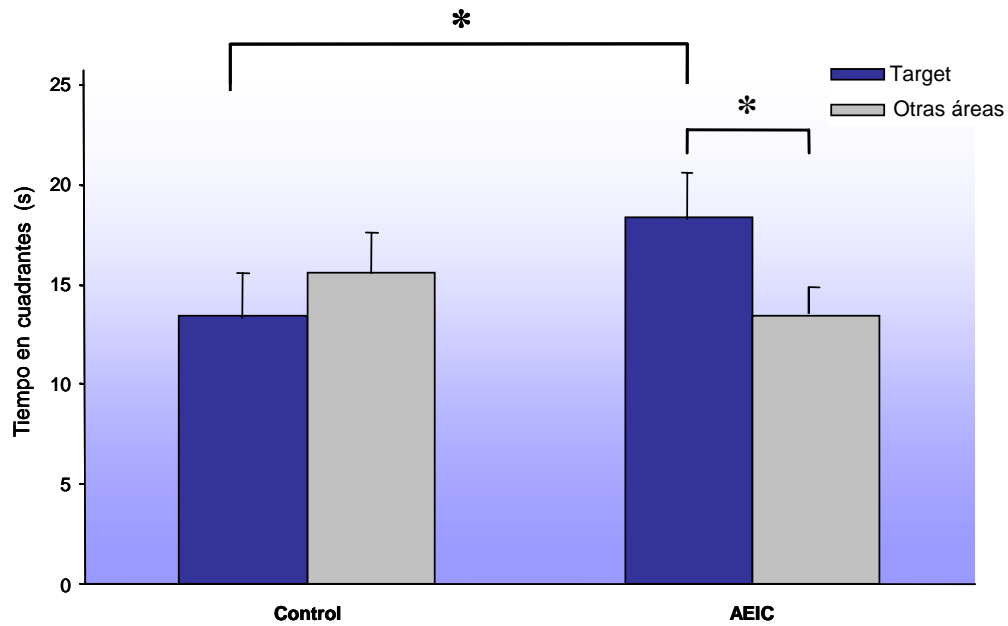


Fig.18. Tiempo medio que los sujetos Control y AEIC pasaron en el cuadrante target y en el resto de cuadrantes en el ensayo de prueba (\*  $p < 0.050$ )

#### 2.3.3.4 Parámetros de AEIC e Histología

Los valores medios y las D.S. de las variables de AEIC se muestran en la tabla que sigue a continuación;

Grupo	IO final ( $\mu$ A)	Duración del tratamiento (min)
AEIC	31 (9,36)	40,81 (6,63)

Igual que en los experimentos precedentes ninguno de los parámetros de AEIC evaluados se relacionó con el nivel de aprendizaje alcanzado por las ratas en las diferentes sesiones de aprendizaje de la tarea plataforma-escondida en el LAM. Además, el análisis de la regresión mostró que ninguna de estas variables se relacionó con la latencia de escape, la distancia media nadada y la velocidad media de nado durante las sesiones de entrenamiento y el ensayo de prueba.

Respecto a la valoración histológica de la implantación del electrodo, todos se localizaron entre las coordenadas AP - 1.80 mm y - 2.80 mm con referencia a bregma. Un análisis de regresión simple no mostró relación entre las coordenadas de localización del electrodo y las variables: parámetros de AEIC (IO, tasas de respuesta, tasas de refuerzo, duración del tratamiento), latencia de escape, distancia media nadada y la velocidad media de nado durante las sesiones de entrenamiento y el ensayo de prueba.

## **2.4. EXPERIMENTO 4**

### 2.4.1 Introducción

En este experimento los sujetos realizaron 5 sesiones de adquisición, una diaria, de 1 ensayo cada una. La relación espacial entre la plataforma y la pelota siguió siendo la misma que se utilizó en los Experimentos 2 y 3 (ver figura 14).

### 2.4.2. Material y procedimiento

En este experimento se utilizaron un total de 26 ratas albinas macho de la cepa Wistar, de 94.26 días (D.S.= 2.41) de edad y un peso medio de 408.86 g (D.S.= 41.15) al inicio del experimento, procedentes también de nuestro laboratorio. Igual que en el experimento anterior, todo lo referente a ética y bienestar animal, procedimiento quirúrgico y coordenadas de implantación de los electrodos, aparato, análisis estadístico de los datos, modelamiento y asignación a grupos experimentales, sesiones de habituación, ensayo de prueba y estudio histológico se realizó de forma idéntica al experimento 1.

No obstante, ya que en los experimentos previos 2 y 3 se ha observado una tendencia del tratamiento de autoestimulación post-entrenamiento a ser más efectivo cuando los animales tienen más dificultades para aprender, los sujetos de este nuevo experimento realizaron sólo 5 sesiones de adquisición (una sesión diaria) de un único ensayo cada una. La pelota se mantuvo en el cuadrante opuesto al de la plataforma e inmediatamente después de cada sesión de entrenamiento los sujetos del grupo AEIC recibieron el tratamiento de

autoestimulación (2000 trenes de corriente estimulante) mientras los sujetos del grupo Control permanecieron en la caja operante de Skinner, sin recibir tratamiento (45 minutos). El diseño experimental se muestra en el cuadro 1.

### 2.4.3. Resultados

#### 2.4.3.1 *Sujetos*

Según un análisis multivariable de la varianza, no se observaron diferencias respecto a la evolución del peso entre los grupos AEIC y Control a lo largo de las diferentes fases del experimento.

#### 2.4.3.2 *Aprendizaje*

##### 2.4.3.2.1 Latencia media de escape

El estudio de la evolución de la latencia de escape mostró una tendencia lineal decreciente significativa [*contraste polinomial*,  $F(1, 24) = 5,369$ ,  $p < 0.029$ ] tanto en el grupo Control como en el grupo AEIC. Además, el MLG para medidas repetidas indicó que esta evolución dependió del grupo [*factor interacción grupo x sesión*  $F(1, 24) = 13,953$ ,  $p = 0,001$ ]. Así, para estudiar más específicamente qué sucedió en cada una de las 5 sesiones de entrenamiento, se realizó un MLG multivariable. Este MANOVA mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en las tres últimas sesiones de adquisición [sesión 3,  $F(1,24) = 11,411$ ,  $p = 0,002$ ; sesión 4,  $F(1,24) = 6,335$ ,  $p = 0,019$  y sesión 5,  $F(1,24) = 4,205$ ,  $p = 0,051$ ]. Como se puede observar en la figura 19, incluso cuando ambos grupos de ratas mostraron el mismo nivel inicial de aprendizaje (sesión 1), las ratas tratadas aprendieron significativamente más que las ratas Control desde la tercera sesión en adelante. De hecho podríamos decir que las ratas del grupo Control no aprendieron la tarea con plataforma-escondida.



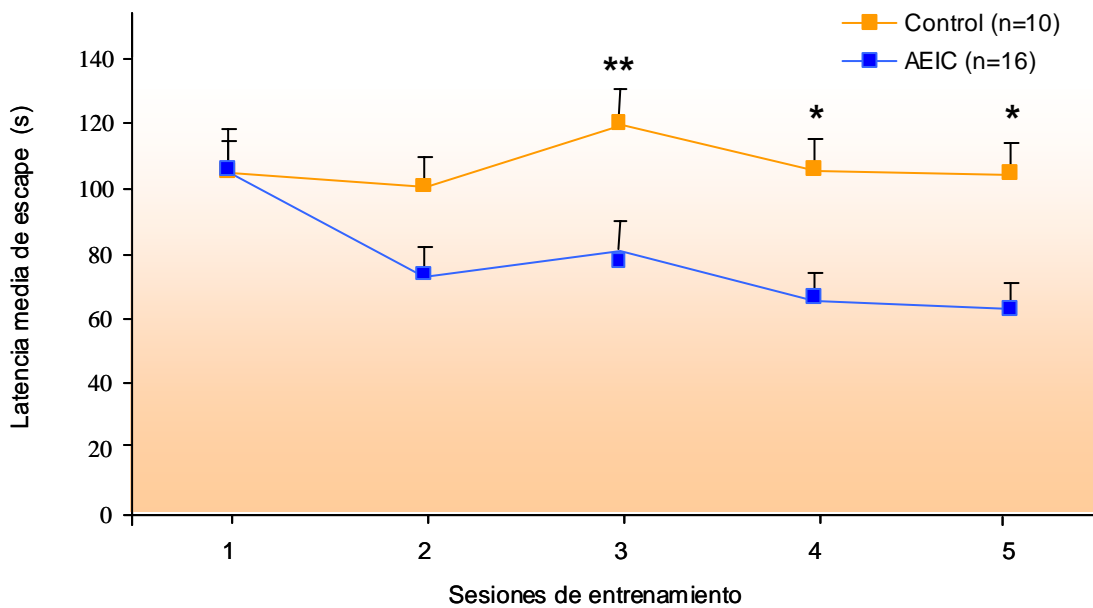


Fig. 19. Latencias medias de escape de los grupos AEIC y Control a lo largo de las 5 sesiones de entrenamiento (\*\*  $p < 0.010$ ; \*  $p < 0.050$ )

#### 2.4.3.2.2 Distancia media nadada

Igual que en los experimentos precedentes, un MANOVA no mostró diferencias significativas entre los grupos AEIC y Control respecto a la distancia media total nadada en ninguna de las 10 sesiones de adquisición.

#### 2.4.3.2.3 Velocidad media de nado

En este cuarto experimento, tampoco se encontraron diferencias entre los grupos estudiados respecto a la velocidad media de nado en ninguna de las sesiones de entrenamiento. Un MANOVA confirmó estos resultados.

#### 2.4.3.2.4 Tiempo medio en paredes

Un MANOVA no encontró diferencias significativas entre los grupos estudiados respecto al tiempo medio que los sujetos pasaron nadando alrededor de las paredes en ninguna de las sesiones de adquisición.

### 2.4.3.3 Ensayo de prueba

La figura 20 compara el tiempo medio que los sujetos de los grupos Control y AEIC pasaron en el cuadrante target y en el resto de cuadrantes durante el ensayo de prueba. Tests t de Student revelaron que las ratas del grupo Control nadaron más tiempo en el resto de áreas que en el cuadrante target [Control:  $t=-2,551$ ,  $p=0,031$ ] mientras que el grupo AEIC pasó más tiempo nadando en el cuadrante target [AEIC:  $t=4,862$ ,  $p<0,001$ ]. Así, la preferencia por el área target fue significativamente mayor en las ratas AEIC que en las ratas Control [ $t=4,802$ ,  $p<0,001$ ]. La figura 21 muestra ejemplos representativos de las trayectorias de nado de ratas de los grupos AEIC y Control durante la prueba test. Estos hallazgos muestran que cuando el aprendizaje se dificulta reduciéndose el número de ensayos de adquisición se incrementa la capacidad del tratamiento de autoestimulación eléctrica intracraneal post-entrenamiento para facilitar el aprendizaje y la consolidación de la memoria.

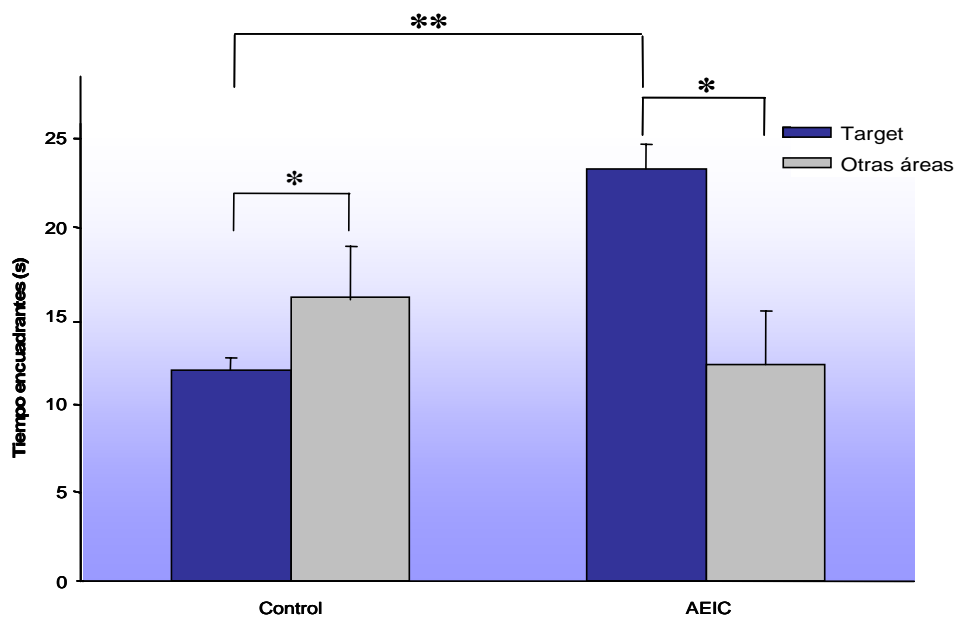


Fig. 20. Tiempo que las ratas Control y AEIC pasaron en el cuadrante target y en el resto de áreas en el ensayo de prueba

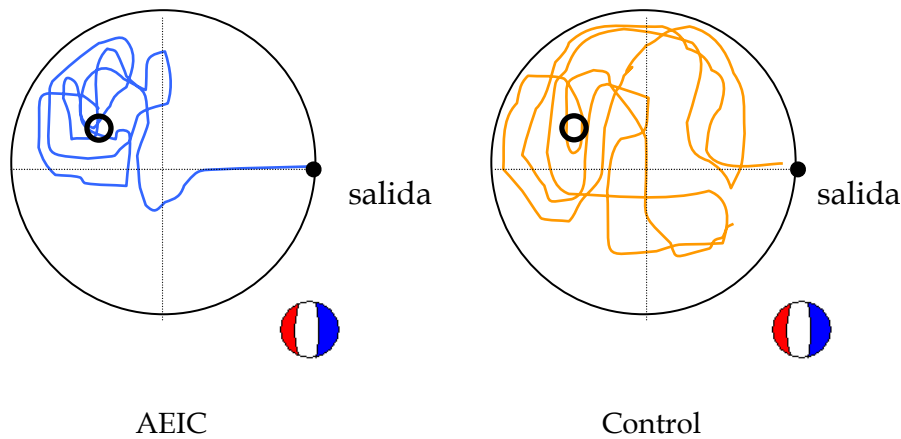


Fig. 21. Ejemplos de trayectorias de nado de sujetos de los grupos Control y AEIC en la Prueba test. La plataforma fue retirada de la piscina y se permitió a los sujetos nadar libremente durante 60 s. La localización virtual de la plataforma durante el test se muestra como un círculo blanco y el punto de salida de los sujetos se indica con un punto negro.

#### 2.4.3.4 Parámetros de AEIC e histología

Los valores medios y las D.S. de las variables de AEIC se muestran en la tabla que sigue a continuación;

Grupo	IO final ( $\mu$ A)	Duración del tratamiento (min)
AEIC	34,06 (16,87)	42,83 (12,29)

No se encontraron diferencias entre los sujetos tratados en ninguna de las variables de AEIC evaluadas. Además, análisis de la regresión mostraron que ninguna de estas variables estuvo relacionada con el tiempo necesitado por las ratas para localizar la plataforma (latencia de escape), la distancia media nadada y la velocidad media de nado durante las sesiones de entrenamiento y el ensayo de prueba.

Respecto al estudio histológico, todos los electrodos se implantaron entre las coordenadas AP - 1.80 mm y - 3.14 mm con referencia a bregma. Un análisis de regresión simple no mostró relación entre las coordenadas de localización del electrodo y las variables: parámetros de AEIC (IO, tasas de respuesta, tasas de

refuerzo, duración del tratamiento), latencia de escape, distancia media nadada y la velocidad media de nado durante las sesiones de entrenamiento y el ensayo de prueba.

## **IV. DISCUSIÓN GENERAL**

#### **IV. DISCUSIÓN GENERAL**

Los resultados de los presentes experimentos han mostrado que la AEIC post-entrenamiento es capaz de facilitar la adquisición y la retención de una tarea hipocampo-dependiente en el LAM, especialmente cuando las condiciones de entrenamiento consisten en un único ensayo diario (Experimento 4), es decir, cuando las condiciones de entrenamiento hicieron el aprendizaje más difícil. En este caso, es muy llamativa la importante reducción que el tratamiento de AEIC produjo en el tiempo que las ratas necesitaron para alcanzar la plataforma (latencia de escape): incluso cuando las ratas Control y AEIC mostraron el mismo nivel inicial de condicionamiento (primera sesión de adquisición), las ratas AEIC redujeron el tiempo de nado para alcanzar la plataforma de 110 s (primera sesión de entrenamiento) a 85 s (segunda sesión de entrenamiento). Además, en la tercera sesión de entrenamiento las ratas AEIC necesitaron significativamente 40 s menos que sus respectivas Controles para encontrar la plataforma (80 s versus 120 s, respectivamente). Esta mejora se observó y fue también estadísticamente significativa en los sucesivos cuarto y quinto ensayos.

En este mismo experimento, el ensayo de prueba realizado tres días después de la última sesión de entrenamiento también confirmó el mayor nivel de adquisición y de memoria de las ratas AEIC tratadas comparadas con las ratas Control. El efecto del tratamiento de AEIC post-entrenamiento fue por tanto fuerte y consistente. Hasta donde sabemos, junto con nuestras previas observaciones de que la AEIC post-entrenamiento puede facilitar la expresión flexible de una respuesta aprendida en una tarea de alternancia demorada en el laberinto en T (Soriano-Mas y col., 2005), éste es el primer trabajo que pone de manifiesto la posibilidad de facilitar la memoria explícita, relacional o hipocampo-dependiente, por la AEIC post-entrenamiento.

En una serie de experimentos previos de nuestro laboratorio (Ruiz-Medina y col., 2007) hemos observado también la capacidad de la AEIC post-entrenamiento para facilitar consistentemente la retención a las 48 horas de una tarea de evitación activa de dos sentidos cuando el entrenamiento consistió en sólo 5 ensayos dados a las ratas en una única sesión de adquisición. De forma similar, en el presente Experimento 4, hemos observado que las ratas que recibieron AEIC post-entrenamiento tras sólo un ensayo de adquisición de 2 minutos de duración redujeron significativamente el tiempo de nado necesario para alcanzar la plataforma. Parece entonces que la AEIC post-entrenamiento tiene una especial capacidad para facilitar tanto la memoria relacional o explícita como la implícita cuando se entrena poco a los sujetos y el aprendizaje está en sus fases incipientes.

No obstante, ¿por qué la AEIC post-entrenamiento fue incapaz (Experimentos 1 y 2) o tuvo una baja capacidad para facilitar la memoria (Experimento 3) del mismo tipo de tarea en el LAM con más ensayos diarios de entrenamiento? En este sentido, cabe destacar que la mayor facilitación del aprendizaje y de la memoria de las ratas tratadas con AEIC en el Experimento 4 se observó entre la primera y la segunda sesión de entrenamiento, lo que indica que la AEIC podría ser más efectiva cuando los mecanismos moleculares implicados en la formación de la memoria están todavía en sus fases iniciales, no estabilizados. Incrementar la cantidad de entrenamiento podría, por tanto, competir con la AEIC post-entrenamiento en la facilitación de los mecanismos moleculares que subyacen a la consolidación de la memoria enmascarando y/o reduciendo sus efectos conductuales.

En nuestros trabajos anteriores hemos observado también que uno de los principales efectos de la AEIC post-entrenamiento consiste en acelerar la consolidación de la memoria. Concretamente, el tratamiento de AEIC post-entrenamiento facilitó la memoria de ratas en una única tarea de evitación activa de dos sentidos permitiendo a los sujetos tratados alcanzar el mismo

nivel de aprendizaje en un test de retención a las 24 horas que el que alcanzaron sus respectivos controles (ratas no tratadas) en un test de retención que se realizó a los 7 días (Aldavert-Vera y col., 1996). De forma similar, los resultados del presente Experimento 4 mostraron que incluso cuando las ratas empezaban con el mismo nivel de aprendizaje, las ratas AEIC mejoraron su adquisición más rápido que las ratas Control. La diferencia entre grupos en la latencia para alcanzar la plataforma creció de la segunda a la tercera sesión pero pareció mostrar una tendencia a disminuir en la cuarta y quinta sesiones. Si estos resultados se confirmasen, tendríamos una prueba de que la AEIC post-entrenamiento podría ser también capaz de acelerar la consolidación de la memoria tanto en tareas de memoria explícita o relacional, una hipótesis que hay que seguir explorando.

La capacidad de la AEIC para facilitar la consolidación de la memoria podría relacionarse con los muchos cambios moleculares y fisiológicos que se observan tras el aprendizaje en regiones cerebrales como el hipocampo o la corteza cerebral. Diferentes trabajos sobre iniciación y mantenimiento de la plasticidad sináptica en el hipocampo muestran que tanto el propio aprendizaje como la PLP artificialmente inducida producen muy rápidamente cambios morfológicos en las espinas dendríticas que podrían constituir la base estructural de la memoria. Se ha demostrado que, en milisegundos, la activación de las sinapsis pertinentes da lugar a una liberación de glutamato que activa receptores AMPA y, en segundos, la despolarización post-sináptica local consecuente libera a los canales de los receptores de coincidencia asociativa NMDA de los iones  $Mg^{2+}$  que los bloquean, permitiendo entonces un gran influjo postsináptico de  $Ca^{2+}$  a través de los canales de esos receptores. Ello a su vez origina la activación de quinasas que, por un lado, inducen cambios en el citoesqueleto de la neurona en el plazo de minutos y, por otro, activan factores de transcripción de la síntesis de proteínas receptoras AMPA, las cuales migran hacia los lugares modificados y, en el plazo de horas, se insertan en la membrana estabilizando los cambios habidos en el citoesqueleto de la neurona postsináptica (Lamprecht



y LeDoux, 2004). Siendo así y tal como ya hemos sugerido, la AEIC podría activar las fases iniciales de este proceso facilitando de ese modo la cascada de acontecimientos moleculares que hacen posible la consolidación de la memoria. Trabajos recientes de nuestro laboratorio confirman esta posibilidad al demostrar mediante técnicas de *microarrays* de ADN que la AEIC es capaz de estimular la expresión de genes de células hipocámpales cuya expresión promueve la síntesis de moléculas implicadas en mecanismos de plasticidad y aprendizaje y consolidación de la memoria (Huguet y col., 2007).

Otros trabajos han demostrado que el tratamiento de AEIC es capaz de producir también cambios neurales como activación metabólica neocortical (Harley y col., 1995), incremento de los niveles de neurotransmisores excitatorios (Shankaranarayana Rao y col., 1998b), e inducción de plasticidad a largo-plazo (Shankaranarayana Rao y col., 1993; Shankaranarayana Rao y col., 1998a), todo lo cual podría relacionarse directa o indirectamente con la facilitación del aprendizaje que ese tipo de tratamiento origina. Es decir, la forma en que éstos y otros cambios cerebrales podrían estar relacionados con la facilitación de la memoria por AEIC post-entrenamiento es algo que necesita ser investigado en posteriores trabajos. El sencillo y consistente modelo de facilitación que el presente trabajo ha desarrollado podría ser especialmente útil para tal propósito.

## **CONCLUSIONES GENERALES**

- 1. El presente trabajo ha permitido corroborar el efecto facilitador de la AEIC post-entrenamiento sobre el aprendizaje y la consolidación de la memoria de una tarea de referencia espacial en el Laberinto Acuático de Morris, en ratas Wistar.**
- 2. La AEIC post-entrenamiento afecta especialmente a aquellos sujetos que han recibido muy poco entrenamiento, es decir, cuando los mecanismos moleculares implicados en la formación de la memoria están todavía en sus fases iniciales, no estabilizados.**
- 3. El tratamiento de AEIC post-entrenamiento ha mostrado tener efectos beneficiosos sobre la memoria declarativa incrementándose así sus posibilidades moduladoras y terapéuticas.**
- 4. El simple y consistente modelo de facilitación de la memoria explícita que el presente trabajo ha desarrollado podría ser útil para profundizar en el conocimiento de los procesos moleculares subyacentes al efecto de facilitación de la AEIC post-entrenamiento.**

## **V. REFERENCIAS**

## V. REFERENCIAS

- Addis, D.R., McIntosh, A.R., Moscovitch, M., Crawley, A.P., McAndrews, M.P. (2004). Characterizing spatial and temporal features of autobiographical memory retrieval networks: a partial least squares approach. *Neuroimage*. 23 (4): 1460-71.
- Aggleton, J.P. y Brown, M.W. (1999). Episodic memory, amnesia and the hippocampal anterior thalamic axis. *Behavioral and Brain Sciences*. 22: 425-489.
- Aldavert-Vera, L., Costa-Miserachs, D., Massanés-Rotger, E., Soriano-Mas. C., Segura-Torres, P., & Morgado-Bernal, I. (1997). Facilitation of a distributed Shuttle-box with posttraining intracranial self-stimulation in old rats. *Neurobiology of Learning and Memory*. 67: 254-258.
- Aldavert-Vera, L., Segura-Torres, P., Costa-Miserachs, D., & Morgado-Bernal, I. (1996). Shuttle-box memory facilitation by posttraining intracranial self-stimulation: Differential effects in rats with high and low basic conditioning levels. *Behavioural Neuroscience*. 110(2): 346-352.
- Arvanitogiannis, A., Flores, C., Pfaus, J. G. y Shizgal, P. (1996). Increased ipsilateral expression of Fos following lateral hypothalamic self-stimulation. *Brain Research*. 720(1-2):148-154.
- Arvanitogiannis, A., Flores, C. y Shizgal, P. (1997). Fos-like immunoreactivity in the caudal diencephalon and brainstem following lateral hypothalamic self-stimulation. *Behavioural Brain Research*. 88(2):275-279.
- Arvanitogiannis, A., Tzschentke, T. M., Riscaldino, L., Wise, R. A. y Shizgal, P. (2000). Fos expression following self-stimulation of the medial prefrontal cortex. *Behavioural Brain Research*. 107(1-2):123-132.
- Assad, W. R., Rainer, G. y Miller, E. K. (1998). Neural activity in the primate prefrontal cortex during associative learning. *Neuron*. 21:1399-1407.
- Astur, R.S., Taylor, L.B., Mamelak, A.N., Philpott, L. y Sutherland, R.J. (2002). Humans with hippocampus damage display severe spatial memory impairments in a virtual Morris water task. *Behavioural Brain Research*, 132(1): 77-84.
- Bacon, S. J., Headlam, J. N., Gabbott, P. L. A. y Smith, A. D. (1996). Amygdala input to medial prefrontal cortex (mPFC) in the rat. A light and electron microscope study. *Brain Research*. 720:211-219.

- 
- Bao, S., Chand, V. T. y Merzenich, M. M. (2001). Cortical remodeling induced by activity of ventral tegmental dopamine neurons. *Nature*. 412:79-83.
- Bar, M. y Aminoff, E. (2003). Cortical analysis of visual context. *Neuron*. 38:347-58
- Barnes, C.A. (1998). Memory changes during normal aging: neurobiological correlates. En: Martínez, Jr.J.L., Kesner, R.P. *Neurobiology of learning and memory*. Academic Press, California. 247-287.
- Bartus, R.T. (2000). On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis. *Experimental Neurology*. 163: 495-529.
- Beaudin, S. and Lalonde, R. (1997). The effects of pentobarbital on spatial learning, motor coordination, and exploration. *Pharmacology Biochemistry and Behaviour*. 57: 111-114.
- Bedi, K.S. (1992). Spatial learning ability of rats undernourished during early postnatal life. *Physiology & Behavior*. 51, pp. 1001-1007.
- Bellush, L.L., Wright, A.M., Walker, J.P., Kopchick, J. and Colvin, R. A. (1996). Caloric restriction and spatial learning in old mice. *Physiology & Behavior*. 60, pp. 541-547.
- Benhamou, S. and Poucet, B. (1996). A comparative analysis of spatial memory processes. *Behavioral Processes*. 35: 113-126.
- Berger-Sweeney, J., Arnold, A., Gabeau, D. and Mills, J. (1995). Sex differences in learning and memory in mice: effects of sequence of testing and cholinergic blockade. *Behavioral Neuroscience*. 109: 859-873.
- Berridge, K. C. y Robinson, T. E. (1998). What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning or incentive salience? *Brain Research Reviews*. 28: 309-369.
- Bespalov, A. y Zvartau, E. (1997). NMDA receptors antagonists prevent conditioned activation of intracranial self-stimulation in rats. *European Journal of Pharmacology*. 326:109-112.
- Bierley, R.A., Rixen, G.J., Tröster, A.I. y Beatty, W.W (1986). Preserved spatial memory of rats survives 10 months without training. *Behavioral & Neural Biology*. 45: 223-29.
- Bielajew, C., Thrasher, A. y Fouriez, G. (1987). Self-stimulation sites in the lateral hypothalamic and lateral preoptic areas are functionally connected. *Canadian Psychology*. 28:36.

- Bindu, P. N. y Desiraju, T. (1990). Increase of dendritic branching of CA3 neurons of hippocampus and self-stimulation areas in subjects experiencing self-stimulation of lateral hypothalamus and substantia nigra-ventral tegmental area. *Brain Research*. 527:171-175.
- Bliss, T.V.P. (1998). The saturation debate. *Science*. 281: 1975-1976.
- Blaha, C. D. y Phillips, A. G. (1990). Application of in vivo electrochemistry to the measurement of changes in dopamine release during intracranial self-stimulation. *Journal of Neuroscience Methods*. 34: 125-133.
- Bodnof, S.R., Humphreys, A.G., Lehman, J.C., Diamond, D.M., Rose, G.M. y Meaney, M.J. (1995). Enduring effects of chronic corticosterone treatment on spatial learning, synaptic plasticity, and hippocampal neuropathology in young and mid-aged rats. *The Journal of Neuroscience*. 15: 61-69.
- Brandeis, R., Brandys, Y. y Yehuda, S. (1989). The use of the Morris water maze in the study of memory and learning. *The International Journal of Neuroscience*. 48: 29-69.
- Brioni, J.D., Arolfo, M.P., Jerusalinsky, D., Medina, J.H. y Izquierdo, I. (1991). The effect of flumazenil on acquisition, retention, and retrieval of spatial information. *Behavioral and Neural Biology*. 56: 329-335.
- Brown, M.W. y Aggleton, J.P. (2001). Recognition memory: what are the roles of the perirhinal cortex and hippocampus?. *Nature Reviews. Neuroscience*. 2: 51-61.
- Brown, E. E., Robertson, G. S. y Fibiger, H. C. (1992). Evidence for conditional neuronal activation following exposure to a cocaine-paired environment: role for forebrain limbic structures. *The Journal of Neuroscience*. 12: 4112-4121.
- Bruce-Keller, A.J., Umberger, G., McFall, R. y Mattson, M.P. (1999). Food restriction reduces brain damage and improves behavioral outcome following excitotoxic and metabolic insults. *Annals of Neurology*. 45, pp. 8-15.
- Bucci, D.J., Chiba, A.A. y Gallagher, M. (1995). Spatial learning in male and female Long-Evans rats. *Behavioral Neuroscience*. 109: 180-183.
- Burwell, R.D. y Eichenbaum, H. (1999). What's new in animal models of amnesia? *Behavioral and Brain Sciences*. 22: 446-447.
- Bures, J., Fenton, A.A., Kaminsky, Y. y Zinyuk, L. (1997). Place cells and place navigation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94:343-350.

- 
- Cahill, L. y McGaugh, J. L. (1996). Modulation of memory storage. *Current Opinion in Neurobiology*. 6:237-242.
- Cahill, L. y McGaugh, J. L. (1998). Mechanisms of emotional arousal and lasting declarative memory. *Trends in Neurosciences*. 21:294-299.
- Cain, D.P. (1997a). LTP, NMDA, genes and learning. *Current Opinion in Neurobiology*. 7: 235-242.
- Cain, D.P. (1997b). Prior non-spatial pretraining eliminates sensorimotor disturbances and impairments in water maze learning caused by diazepam. *Psychopharmacology (Berl.)* 130, pp. 313-319.
- Cain, D.P. (1998). Testing the NMDA, long-term potentiation, and cholinergic hypotheses of spatial learning. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 22:181-193.
- Cain, D.P. y Saucier, D. (1996a). The neuroscience of spatial navigation: focus on behavior yields advances. *Reviews in the Neurosciences*. 7:215-231.
- Cain, D.P., Saucier, D. y Boon, F. (1997). Testing hypotheses of spatial learning: the role of NMDA receptors and NMDA-mediated long-term potentiation. *Behavioral Brain Research*. 84: 179-193.
- Cain, D.P., Saucier, D., Hall, J., Hargreaves, E.L. y Boon F. (1996b). Detailed behavioral analysis of water maze acquisition under APV or CNQX: contribution of sensorimotor disturbances to drug-induced acquisition deficits. *Behavioral Neuroscience*. 110: 86-102.
- Carlezon, W. A. y Wise, R. A. (1993). Morphine-induced potentiation of brain stimulation reward is enhanced by MK-801. *Brain Research*. 620:339-342.
- Carr, D. B. y Sesack, S. R. (2000). Dopamine terminals synapse on callosal projection neurons in the rat prefrontal cortex. *The Journal of Comparative Neurology*. 425:275-283.
- Casadesus, G., Shukitt-Hale, B. y Joseph, J.A. (2002). Qualitative versus quantitative caloric intake: are they equivalent paths to successful aging? *Neurobiology of Aging*. 23: 747-769.
- Castro-Alamancos, M. A. y Connors, B. W. (1996). Short-term plasticity of a thalamocortical pathway dynamically modulated by behavioral state. *Science*. 272(5259): 274-277.
- Cervo, L. y Samanin, R. (1995). Effects of dopaminergic and glutamatergic receptor antagonists on the acquisition and expression of cocaine conditioning place preference. *Brain Research*. 673: 242-250.

- 
- Chamizo, V. D., Manteiga, R.D., Rodrigo, T. y Mackintosh, N.J. (2006). Competition between landmarks in spatial learning: The role of proximity to the goal. *Behavioural Processes*. 71: 59-65
- Chamizo, V. D. y Rodrigo, T. (2004). Effect of absolute spatial proximity between a landmark and a goal. *Learning and Motivation*. 35, 102-114.
- Colle, L. M. y Wise, R. A. (1987). Opposite effects of unilateral forebrain ablations on ipsilateral and contralateral hypothalamic self-stimulation. *Brain Research*. 407(2): 285-293.
- Colle, L. M. y Wise, R. A. (1988). Effects of nucleus accumbens amphetamine on lateral hypothalamic brain stimulation reward. *Brain Research*. 459: 361-368.
- Conover, K. L. y Shizgal, P. (1992). Coactivation of the lateral hypothalamus and ventral tegmental area yields greater reward summation than coactivation of the lateral hypothalamus and medial pre-frontal cortex. *Society for Neuroscience Abstract*. 18: 709.
- Conway, E.L. (1998). Brain lesions and delayed water maze learning deficits after intracerebroventricular spermine. *Brain Research*. 800. 10-20.
- Corbett, D. (1990). Differences in sensitivity to neuroleptic blockade: medial forebrain bundle versus frontal cortex self-stimulation. *Behavioural Brain Research*. 36(1-2):91-96.
- Corbett, D., Evans, S.J. y Nurse, S.M. (1992). Impaired acquisition of the Morris water maze following global ischemic damage in the gerbil. *Neuroreport*. 3: 204-206.
- Corbett, D. y Wise, R. A. (1980). Intracranial self-stimulation in relation to the ascending dopaminergic systems of the midbrain: a moveable electrode mapping study. *Brain Research*. 185(1):1-15.
- Corbetta, M. y Shulman, G. L. (2002). Control of goal-directed and stimulus-driven attention in the brain. *Nature Reviews Neuroscience*. 3:201-215.
- Coulombe, D. y White, N. (1980). The effect of post-training lateral hypothalamic self-stimulation on aversive and appetitive classical conditioning. *Physiology and Behavior*. 25: 267-272.
- Coulombe, D. y White, N. (1982a). Post-training self-stimulation and memory: a study of some parameters. *Physiology and Psychology*. 10: 343-9.



- 
- Coulombe, D. y White, N. (1982b). The effect of post-training lateral hypothalamic self-stimulation on sensory preconditioning in rats. *Canadian Journal of Psychology*. 36: 57-66.
- Crabbe, J.C., Wahlsten, D. y Dudek, B.C. (1999). Genetics of mouse behavior: interactions with laboratory environment. *Science*. 284: 1670-1672.
- Crawley, J.N. (1996). Unusual behavioral phenotypes of inbred mouse strains. *Trends in Neuroscience*. 19: 181-187.
- Cressant, A., Muller, R.U. y Poucet, B. (1997). Failure of centrally placed objects to control the firing fields of hippocampal place cells. *Journal of Neuroscience*. 17: 2.531-2.542.
- Crow, T. J. (1972). Catecholamine-containing neurones and electrical self-stimulation. 1. A review of some data. *Psychological Medicine*. 2(4):414-421.
- D'Hooge, R. y De Deyn, P. (2001). Applications of the Morris Water maze in the study of learning and memory. *Brain Research Reviews*. 36: 60-90.
- Dalm, S., Grootendorst, J., de Kloet, E.R. y Oitzl, M.L. (2000). Quantification of swim patterns in the Morris water maze. *Behavioral Research Methods*. 32: 134-139.
- Daniel, J.M., Roberts, S.L. y Dohanich, G.P. (1999). Effects of ovarian hormones and environment on radial maze and water maze performance of female rats. *Physiology and Behavior*. 66: 11-20.
- Daselaar, S.M., Fleck, M.S. y Cabeza, R. (2006). Triple dissociation in the medial temporal lobes: recollection, familiarity and novelty. *Journal of Neurophysiology*. 96: 1902-11.
- Davachi, L. y Wagner, A.D. (2002). Hippocampal contributions to episodic encoding: insights from relational and item- based learning. *Journals of Neurophysiology*. 88 (2): 982-90.
- De Felipe, J. y Farinas, I. (1992). The pyramidal neuron of the cerebral cortex: morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs. *Progress in Neurobiology*. 39:563-607.
- De Quervain, D.J., Roozendaal, B. y McGaugh, J.L. (1998). Stress and glucocorticoids impair retrieval of long-term spatial memory. *Nature*. 394: 787-790.
- Destrade, C. y Jaffard, R. (1978). Post-trial hippocampal and lateral hypothalamic electrical stimulation. Facilitation on long-term memory of

- appetitive avoidance learning tasks. *Behavioral Biology*. 22:345-374.
- Deupree, D.L., Turner, D.A. y Watters, C.L. (1991). Spatial performance correlates with in vitro potentiation in young and aged Fischer 344 rats. *Brain Research*. 554: 1-9.
- Diana, G., Domenico, M.R., Loizzo, A., Scotti de Carolis, A. y Sagratella, S. (1994). Age and strain differences in rat place learning and hippocampal dentate gyrus frequency-potentiation. *Neuroscience Letters*. 171: 113-116.
- Di Chiara, G., Tanda, G., Frau, R. y Carboni, E. (1995). On the preferential release of dopamine in the nucleus accumbens by amphetamine: further evidence obtained by vertically implanted concentric dialysis probes. *Psychopharmacology*. 112(2-3): 398-402.
- Dieter, S.E. (1977). Preexposure to situational cues and shock intensity in two-way avoidance learning. *Animal Learning and Behavior*. 5: 403-406.
- Eacott, M. J. y Gaffan, D. (1992). Inferotemporal-frontal disconnection: the uncinata fascicle and visual associative learning in monkeys. *European Journal of Neuroscience*. 4: 1320-1332.
- Easterling, K. W., Plovnick, R. M. y Holtzman, S. G. (2000). Acute opioid but not benzodiazepine dependence in rats responding for intracranial self-stimulation. *Psychopharmacology (Berlin)*. 148(3): 263-71.
- Eichenbaum, H. (1996). Is the rodent hippocampus just for "place"? *Current Opinion in Neurobiology*, 6(2): 187-95.
- Eichenbaum, H. (1999). The hippocampus and mechanisms of declarative memory. *Behavioural Brain Research*. 103: 123-133.
- Eichenbaum, H. (2000). A cortical-hippocampal system for declarative memory. *Nature Neuroscience Reviews*. 1:41-50.
- Eichenbaum, H. (2004). Hippocampus: cognitive processes and neural representations that underlie declarative memory. *Neuron*. 44: 109-20.
- Eichenbaum, H., Dudchenko, P., Wood, E., Shapiro, M. y Tanila, H. (1999). The hippocampus, memory and place cells: is it spatial memory or a memory space? *Neuron*. 23: 209-226.
- Eichenbaum, H., Otto, T. y Cohen, N.J. (1994). Two functional components of the hippocampal memory system. *Behavioral Brain Science*. 17: 449-517.

- Eichenbaum, H., Stewart, C. y Morris, R.G. (1990). Hippocampal Eichenbaum, H., Yonelinas, A.P. y Ranganath, C. (2007). The Medial Temporal Lobe and Recognition Memory. *Annual Reviews of Neuroscience*. 30:123-52
- Elliot, R., Friston, K. J. y Dolan, R. J. (2000). Dissociable neural response in human reward systems. *The Journal of Neuroscience*. 20: 6159-6165.
- Epstein, R. y Kanwisher, N. (1998). A cortical representation of the local visual environment. *Nature*. 392 (6676): 598-601.
- Esposito, R. U., Porrino, L. J., Seeger, T. F., Crane, A. M., Everist, H. D. y Pert, A. (1984). Changes in local cerebral glucose utilization during rewarding brain stimulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 81:635-639.
- Estévez-González, A., García-Sánchez, C. y Barraquer-Bordas, Ll. (2000). Los lóbulos frontales: el cerebro ejecutivo. *Revista de Neurología*. 31(6): 566-577.
- Feenstra, M. G. P. y Botterblom, M. H. A. (1996). Rapid sampling of extracellular dopamine in the rat prefrontal cortex during food consumption, handling and exposure to novelty. *Brain Research*. 742: 17-24.
- Feenstra, M. G. P., Teske, G., Botterblom, M. H. A. y De Bruin, J. P. C. (1999). Dopamine and noradrenaline release in the prefrontal cortex of rats during classical aversive conditioning to a contextual stimulus: interference by novelty effects. *Neuroscience Letters*. 272:179-182.
- Fibiger, H. C., LePiane, F. G., Jakubovic, A. y Phillips, A. G. (1987). The role of dopamine in intracranial self-stimulation of the ventral tegmental area. *The Journal of Neuroscience*. 7(12): 3888-3896.
- Fiorino, D. F., Coury, A., Fibiger, H. C. y Phillips, A. G. (1993). Electrical stimulation of reward sites in the ventral tegmental area increases dopamine transmission in the nucleus accumbens of the rat. *Behavioural Brain Research*. 55(2): 131-141.
- Fiorino, D. F., Coury, A. y Phillips, A. G. (1997). Dynamic changes in nucleus accumbens dopamine efflux during the Coolidge effect in male rats. *The Journal of Neuroscience*. 17:4849-4855.
- Fitzgerald, L.W. y Dokla, C.P. (1989). Morris water task impairment and hypoactivity following cysteamine-induced reductions of somatostatin-like immunoreactivity. *Brain Research*. 505:246-250.
- Flores, C., Arvanitogiannis, A. y Shizgal, P. (1997). Fos-like immunoreactivity in

- forebrain regions following self-stimulation of the lateral hypothalamus and the ventral tegmental area. *Behavioural Brain Research*. 87(2):239-251.
- Forcano L., Santamaría, J., Mackintosh, N.J. y Chamizo, V.D.(2007). Single landmark learning: Sex differences in a navigation task (en revision).
- Foster, T.C. (1999). Involvement of hippocampal synaptic plasticity in age-related memory decline. *Brain Research Reviews*. 30: 236-249.
- Fouriez, G. y Wise, R. (1976). Pimozide-induced extinction of intracranial self-stimulation: response patterns rule out motor or performance deficits. *Brain Research*. 103: 377-380.
- Franklin, K. B. J. (1978). Catecholamines and self-stimulation: reward and performance effects dissociated. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 9: 813-820.
- Fuster, J. M. (1991). The prefrontal cortex and its relation to behavior. *Progress in Brain Research*. 87: 201- 211.
- Fuster, J. M. (1995). *Memory in the Cerebral Cortex*. Massachusetts: MIT Press (Cambridge).
- Fuster, J. M., Bodner, M. y Kroger, J. K. (2000). Cross-modal and cross-temporal association in neurons of frontal cortex. *Nature*. 405: 347-351.
- Fuxe, K., Kalia, L. F., Golstein, M., Andersson, K. y Härfstrand. A. (1985). Dopaminergic systems in the brain and pituitary. En: E. Flückiger, E. E. Müller y M. O. Thorner (Eds.). *The dopaminergic system*. Berlin: Springer-Verlag, 11-25.
- Gallagher, M., Burwell, R. y Burchinal, M. (1993). Severity of spatial learning impairment in aging: development of a learning index for performance in the Morris water maze. *Behavioral Neuroscience*. 107: 618-626.
- Gallagher, M. and Holland, P.C. (1992). Preserved configural learning and spatial learning impairment in rats with hippocampal damage. *Hippocampus*. 2: 81-88.
- Gallistel, C. R. y Freyd, G. (1987). Quantitative determination of the effects of catecholaminergic agonists and antagonists on the rewarding efficacy of brain stimulation. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 26: 731-741.
- Gallistel, C. R., Glimcher, P. W. y Miselis, R. R. (1989). Nuclei whose fibers co-localize with the substrate for medial forebrain bundle (MFB) self-stimulation. *Society for Neuroscience Abstracts*. 15:33.

- Gallistel, C. R., Shizgal, P. y Yeomans, J. S. (1981). A portrait of the substrate for self-stimulation. *Psychological Review*. 88(3): 228-273.
- Garris, P. A., Collins, L. B., Jones, S. R. y Wightman, R. M. (1993). Evoked extracellular dopamine in vivo in the medial prefrontal cortex. *Journal of Neurochemistry*. 61: 637-647.
- Garris, P. A., Kilpatrick, M., Bunin, M. A., Michael, D., Walker, Q. D. y Wightman, R. M. (1999). Dissociation of dopamine in the nucleus accumbens from intracranial self-stimulation. *Nature*. 398: 67-69.
- Gehring, W. J. y Willoughby, A. R. (2002). The medial frontal cortex and the rapid processing of monetary gains and losses. *Science*. 295: 2279-2282.
- Geinisman, Y., Detoledo-Morrell, L., Morrell, F. and Heller, R.E. (1995). Hippocampal markers of aged-related memory dysfunction: behavioral, electrophysiological and morphological perspectives. *Progress in Neurobiology*. 45: 223-252.
- Gerlai, R. (2001). Behavioral tests of hippocampal function: simple paradigms complex problems. *Behavioral Brain Research*. 125: 269-277.
- Gerlai, R.T., McNamara, A., Williams, S. y Phillips HS. (2002). Hippocampal dysfunction and behavioral deficit in the water maze in mice: an unresolved issue?. *Brain Research Bulletin*, 57(1):3-9
- Gibertini, M., Newton, C., Friedman H. and Klein, T.W. (1995). Spatial learning impairment in mice infected with *Legionella pneumophila* or administered exogenous interleukin-1- $\beta$ . *Brain, Behavioral and Immunology*. 9: 113-128.
- Gioanni, Y., Rougeot, C., Clarke, P. B. S., Lepousé, C., Thierry, A. M. y Vidal, C. (1999). Nicotinic receptors in the rat prefrontal cortex: increase in glutamate release and facilitation of mediodorsal thalamo-cortical transmission. *European Journal of Neuroscience*. 11:18-30.
- Giovanello, K.S., Verfaillie, M., Keane, M.M. (2003). Disproportionate deficit in associative recognition relative to item recognition in global amnesia. *Cognitive, Affective & Behavioral Neuroscience*. 3(3): 186-94.
- Glimcher, P. W. y Gallistel, C. R. (1989). Dorsomedial hypothalamic neurons give rise to most or all of the substrate for medial forebrain bundle (MFB) self-stimulation. *Society for Neuroscience Abstracts*. 15:33.
- Goldman-Rakic, P. S. (1998). The cortical dopamine system: role in memory and cognition. *Advances in Pharmacology*. 42:707-711.

- Gower, A.J. y Lamberty Y. (1993). The aged mouse as a model of cognitive decline with special emphasis on studies in NMRI mice. *Behavioral Brain Research*. 57: 163-173.
- Granon, S. y Poucet, B. (1995). Medial prefrontal lesions in the rat and spatial navigation: evidence for impaired planning. *Behav. Neuroscience*. 109: 474-484.
- Gratton, A., Hoffer, B. J. y Gerhardt, G. A. (1988). Effects of electrical stimulation of brain reward sites on release of dopamine in rat: an in vivo electrochemical study. *Brain Research Bulletin*. 21:319-324.
- Grauer, E. y Kapon, Y. (1993). Wistar-Kyoto rats in the Morris water maze: impaired working memory ad hiper-reactivity to stress. *Behavioral Brain Research*. 59: 147-151.
- Graybiel, A. M., Moratalla, R. y Robertson, H. A. (1990). Amphetamine and cocaine induce drug-specific activation of the c-fos gene in striosome-matrix compartments and limbic subdivisions of the striatum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 87: 6912-6916.
- Guarraci, F.A. y Kapp, B.S. (1999) An electrophysiological characterization of ventral tegmental area dopaminergic neurons during differential pavlovian fear conditioning in the awake rabbit. *Behavioral Brain Research*. 99: 169-179
- Hasselmo, M.E. y McClelland, J.L. (1999). Neural models of memory. *Current opinion in Neurobiology*. 9: 184-188.
- Hatfield, T. y McGaugh, J.L. (1999). Norepinephrine infused into the basolateral amygdala posttraining enhances retention in a spatial water maze task. *Neurobiology of Learning and Memory*. 71: 232-239.
- Hauben, U., D'Hooge, R., Soetens, E. y De Deyn, P.P. (1999). Effects of oral administration of the competitive N-methyl-D-aspartate antagonist, CGP 40116, on passive avoidance, spatial learning, and neuromotor abilities in mice. *Brain Research Bulletin*. 48: 333-341.
- Heath, R. G. (1963). Intracranial self-stimulation in man. *Science*. 140:394-396.
- Hedou, G., Feldon, J. y Heidbreder, C. A. (1999). Effects of cocaine on dopamine in subregions of the rat prefrontal cortex and their efferents to subterritories of the nucleus accumbens. *European Journal of Pharmacology*. 372: 143-155.
- Herberg, L. J. y Rose, I. C. (1989). The effect of MK-801 and other antagonists on NMDA-type glutamate receptors on brain-stimulation reward.

---

Psychopharmacology. 99: 87-90.

Hernandez, G., Hamdani, S., Rajabi, H., Conover, Kent., Stewart, J., Arvanitogiannis, A. y Shizgal, P. (2006). Prolonged Rewarding Stimulation of the Rat Medial Forebrain Bundle: Neurochemical and Behavioral Consequences. *Behavioral Neuroscience*. 120(4): 888-904

Hernández, L. y Hoebel, B. G. (1988). Feeding and hypothalamic stimulation increase dopamine turnover in the accumbens. *Physiology and Behavior*. 44: 599-606.

Herrero, A.I., Sandi, C. y Venero, C. (2006). Individual differences in anxiety trait are related to spatial learning abilities and hippocampal expression of mineralocorticoid receptors. *Neurobiology of Learning and Memory*. 86 (2): 150-9.

Hodges, H. (1996). Maze procedures: the radial-arm and the water maze compared. *Cognitive Brain Research*. 3: 167-181.

Hodges, P., Sowinski, P., Sinden, J.D., Netto, C.A. y Fletcher, A. (1995). The selective 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonist, WAY100289, enhances spatial memory in rats with ibotenate lesions of the forebrain cholinergic projection system. *Psychopharmacology*. 117: 318-332.

Holscher, C. (1999). Stress impairs performance in spatial water maze learning tasks. *Behavioral Brain Research*. 100: 225-235.

Hope, B., Kosofsky, B., Hyman, S. E. y Nestler, E. J. (1992). Regulation of immediate early gene expression and AP-1 binding in the rat nucleus accumbens by chronic cocaine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 89: 5764-5768.

Horger, B.A. y Roth, R.H. (1996) The role of mesoprefrontal dopamine neurons in stress. *Critical Reviews in Neurobiology*. 10: 395-418

Horvitz, J.C., Stewart, T. y Jacobs, B.L. (1997). Burst activity of ventral tegmental dopamine neurons is elicited by sensory stimuli in the awake cat. *Brain Research*. 759: 251-258

Huguet, G., Aldavert, L., Kádár, E., Peña, S., Morgado, I. y Segura, P. (2007). Hippocampal gene expression in intracranial self-stimulation (ICSS) in rats. Abstract accepted in the 39<sup>th</sup> Annual General Meeting of the European Brain and Behaviour Society (Trieste).

Hunt, G. E., Atrens, D. M. y Jackson, D. M. (1994). Reward summation and the effects of dopamine D1 and D2 agonists and antagonists on fixed-

- interval responding for brain stimulation. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 48: 853-862.
- Hunt, G. E. y McGregor, I. S. (1998). Rewarding brain stimulation induces only sparse Fos-like immunoreactivity in dopaminergic neurons. *Neuroscience*. 83(2): 501-515.
- Huston, J.P. y Oitzl, M.S. (1989). The relationship between reinforcement and memory: parallels in the rewarding and mnemonic effects of the neuropeptide substance P. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 13: 171-180.
- Huston, J. P., Ornstein, K. y Lehner, R. (1982). The diencephalic peninsula: self-stimulation after unilateral precollicular transection and removal of the telencephalon. *Brain Research*. 245: 187-191.
- Ihalainen, J. A., Riekkinen, P. y Feenstra, M. G. P. (1999). Comparison of dopamine and noradrenaline release in mouse prefrontal cortex, striatum and hippocampus using microdialysis. *Neuroscience Letters*. 277: 71-74.
- Ikeda, K., Moss, S. J., Fowler, S. C. y Niki, H. (2001). Comparison of two intracranial self-stimulation (ICSS) paradigms in C57BL/6 mice: head-dipping and place-learning. *Behavioural Brain Research*. 126(1-2): 49-56.
- Ikemoto, S. y Panksepp, J. (1999). The role of nucleus accumbens dopamine in motivated behavior: a unifying interpretation with special reference to reward-seeking. *Brain Research Reviews*. 31: 6-41.
- Introvini-Collison, I.B., Ford, L. y McGaugh, J.L. (1995). Memory impairment induced by intraamygdala  $\beta$ -endorphin is mediated by noradrenergic influences. *Neurobiology of Learning and Memory*. 63: 200-205.
- Ishida, Y., Todaka, K., Hashiguchi, H., Nakamura, M., Hoshino, K., Nishimori, Y., Mitsuyama, Y. y Nakahara, D. (2001). Fos expression in monoaminergic neurons following intracranial self-stimulation of the medial forebrain bundle in rat. *European Journal of Neuroscience*. 13: 1600-1608.
- Itoh, S., Takashima, A. y Morimoto, T. (1994). Impaired spatial learning by vasoactive intestinal peptide in Morris water maze task in the rat. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 72, pp. 25-29.
- Joseph, J.A., Shukitt-Hale, B., Denisova, N.A., Bielinski, D., Martin, A., McEwen, J.J. y Bickford, P.C. (1999). Reversal of age-related declines in neuronal signal transduction, cognitive, and motor behavioral deficits with blueberry, spinach, or strawberry dietary supplementation. *Journal of Neuroscience*. 19: 8114-8121.



- Kant, G.J., Wylie, R.M., Vasilakis, A.A. y Ghosh, S. (1996). Effects of triazolam and diazepam on learning and memory as assessed using a water maze. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 53: 317-322.
- Karreman, M. y Moghaddam, B. (1996). The prefrontal cortex regulates the basal release of dopamine in the limbic striatum: an effect mediated by ventral tegmental area. *Journal of Neurochemistry*. 66(2): 589-98.
- Kessels, R.P., DeHaan, E.H., Kapelle, L.J. y Postma, A. (2001). Varieties of human spatial memory: a meta-analysis on the effects of hippocampal lesions. *Brain Research. Brain Research Reviews*. 35(3): 295-303.
- Kilpatrick, M. R, Rooney, M. B., Michael, D. J. y Wightman, R. M. (2000). Extracellular dopamine dynamics in rat caudate-putamen during experimenter-delivered and intracranial self-stimulation. *Neuroscience*. 96(4): 697-706.
- Kiyatkin, E. A. y Rebec, G. V. (2001). Impulse activity of ventral tegmental area neurons during heroin self-administration in rats. *Neuroscience*. 102: 565-580.
- Koob, G. F. y Bloom, F. E. (1988). Cellular and molecular mechanisms of drug dependence. *Science*. 242: 715-723.
- Koob, G. F. y Le Moal, M. (1997). Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. *Science*. 278(5335): 52-58.
- Koob, G. F. y Nestler, E. J. (1997). The neurobiology of drug addiction. *Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*. 9(3): 482-497.
- Kuroda, M., Murakami, K., Igarashi, H. y Okada, A. (1996). The convergence of axon terminals from the mediodorsal thalamic nucleus and ventral tegmental area on pyramidal cells in layer V of the rat prelimbic cortex. *European Journal of Neuroscience*. 8: 1340-1349.
- Lada, M. W., Vickroy, T. W. y Kennedy, R. T. (1998). Evidence for neuronal origin and metabotropic receptor-mediated regulation of extracellular glutamate and aspartate in rat striatum in vivo following electrical stimulation of the prefrontal cortex. *Journal of Neurochemistry*. 70(2): 617-25.
- Lalonde, R. y Cote, C. (1993). Behavioral effects of non-NMDA glutamate receptor antagonists. *Neuroscience Biobehavioral Reviews*. 17: 79-84.
- Lamberty, Y. y Gower, A.J. (1991). Simplifying environmental cues in a Morris-type water maze improves place learning in old NMRI mice. *Behavioral and Neural Biology*. 56: 89-100.

- 
- Lamberty, Y. y Gower, A.J. (1996). Arm width and brightness modulation of spontaneous behavior of two strains of mice tested in the elevated plus-maze. *Physiology & Behavior*. 59: 439-444.
- Lamprecht, R. y LeDoux, J. (2004). Structural plasticity and memory. *Nature Reviews Neuroscience*. 5: 45-54.
- Lassen, M.B., Brown, E., Stobbs, S.H., Gunderson, S.H., Maes, L., Valenzuela, F., Ray, A.P., Henriksen, S.J. y Steffensen, S.C. (2007). Brain stimulation reward is integrated by a network of electrically coupled GABA neurons. *Brain Research*. 1156: 46-58.
- LeDoux, J.E. (1995). Emotion: clues from the brain. *Annual Review of Psychology*. 46: 209-235.
- Lee, R. S., Griffin, P. S., Steffensen, S. C., Lintz, R. E., Koob, G. F. y Henriksen, S. J. (2000). Responses of VTA GABA neurons to heroin self-administration. *Society for Neuroscience Abstracts*. 26: 475.
- Lee, R. S., Steffensen, S. C. y Henriksen, S. J. (1997). Ventral tegmental area non-dopamine neuronal activity during cortical arousal. *Society for Neuroscience Abstracts*. 23: 793.
- Lee, R. S., Steffensen, S. C. y Henriksen, S. J. (2001). Discharge profiles of ventral tegmental area GABA neurons during movement, anesthesia, and the sleep-wake cycle. *Journal of Neuroscience*. 21: 1757-1766.
- Leon, M. I. y Shadlen, M. N. (1999). Effect of expected reward magnitude on the responses of neurons in the dorsolateral prefrontal cortex of the macaque. *Neuron*. 24: 415-425.
- Levkovitz, Y., Richter-Levin, G. y Segal, M. (1994). Effect of 5-hydroxytryptophane on behavior and hippocampal physiology in young and old rats. *Neurobiology of Aging* 15: 635-641.
- Lindner, M.D. y Schallert, T. (1988). Aging and atropine effects on spatial navigation in the Morris water task. *Behavioral Neuroscience*. 102: 621-634.
- Lipp, H.-P. y Wolfer, D.P. (1998). Genetically modified mice and cognition. *Current Opinion in Neurobiology*. 8: 272-280.
- Ljungberg, T., Apicella, R. y Schultz, W. (1992). Responses of monkey dopamine neurons during learning of behavioural reactions. *Journal of Neurophysiology*. 67: 145-163.

- Logue, S.F., Paylor, R. y Wehner, J.M. (1997). Hippocampal lesions cause learning deficits in inbred mice in the Morris water maze and conditioned-fear task. *Behavioural Neuroscience*. 111(1): 104-13.
- Macey, D. J., Froestl, W., Koob, G. F. y Markou, A. (2001). Both GABA(B) receptor agonist and antagonists decreased brain stimulation reward in the rat. *Neuropharmacology*. 40(5): 676-685.
- Mahajan, D. S. y Desiraju, T. (1988). Alterations of dendritic branching and spine densities of hippocampal CA3 pyramidal neurons induced by operant conditioning in the phase of brain growth spurt. *Experimental Neurology*. 100: 1-15.
- Major, R. y White, N. (1978). Memory facilitation by self-stimulation reinforcement mediated by nigro-neostriatal bundle. *Physiology and Behavior*, 20: 723-733.
- Manns, J.R. y Eichenbaum, H. (2006). Evolution of Declarative Memory. *Hippocampus*. 16: 795-808.
- Manns, J.R., Hopkins, R.O., Reed, J.M., Kitchener, E.G. y Squire, L.R. (2003). Recognition memory and the human hippocampus. *Neuron*. 37: 171-80
- Mantz, J., Thierry, A.M. y Glowinski, J. (1989) Effect of noxious tail pinch on the discharge rate of mesocortical and mesolimbic dopamine neurons: selective activation of the mesocortical system. *Brain Research*. 476, 377-381
- Markowska, A.L., Long, J.M., Johnson, C.T. y Olton, D.S.(1993). Variable-interval probe test as a tool for repeated measurements of spatial memory in the water maze. *Behavioral Neuroscience*. 107: 627-632.
- Martin, S. J., Grimwood, P. D. y Morris, R. G. M. (2000). Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annual Review of Neuroscience*. 23:649-711.
- Massanés-Rotger, E., Aldavert-Vera, L., Segura-Torres, P., Martí-Nicolovius, M. y Morgado-Bernal, I. (1998). Involvement of the Parafascicular nucleus in the facilitatory effect of intracranial self-stimulation on active avoidance in rats. *Brain Research*. 808: 220-231.
- Marrocco, R. T., Witte, E. A. y Davidson, M. C. (1994). Arousal systems. *Current Opinion in Neurobiology*. 4: 166-170.
- Massanés-Rotger, E., Aldavert-Vera, L., Segura-Torres, P., Martí-Nicolovius, M. y Morgado-Bernal, I. (1998). Involvement of the parafascicular nucleus in

- the facilitative effect of intracranial self-stimulation on active avoidance in rats. *Brain Research*. 808: 220-231.
- McClure, S.M., Daw, N.D. y Montague, P.R. (2003) A computational substrate for incentive salience. *Trends in Neurosciences*. 26: 423-428
- McGaugh, J.L. (1989). Involvement of hormonal and neuromodulatory systems in the regulation of memory storage. *Annual Reviews of Neuroscience*. 12: 255-287.
- McGaugh, J.L. (2000). Memory: a century of consolidation. *Science*. 287: 248-251.
- McGregor, I. S., Atrens, D. M. y Jackson, D. M. (1992). Cocaine facilitation of prefrontal cortex self-stimulation: a microstructural and pharmacological analysis. *Psychopharmacology*. 106(2): 239-47.
- McLamb, R.L., Williams, L.R., Nanry, K.P., Wilson, W.A. y Tilson, H.A. (1990). MK-801 impedes the acquisition of a spatial memory task in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 37: 41-45.
- McLean, J.H., Shipley, M.T., Bernstein, D.I. y Corbett, D. (1993). Selective lesions of neural pathways following viral inoculation of the olfactory bulb. *Experimental Neurology*. 122, pp. 209-222.
- McNamara, R.K., DePape, G.E., y Skelton, R.W. (1993). Differential effects of benzodiazepine receptor agonists on hippocampal long-term potentiation and spatial learning in the Morris water maze. *Brain Research*. 626: 63-70.
- McNamara, R.K. y Skelton, R.W. (1991). Diazepam impairs acquisition but not performance in the Morris water maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 38: 651-658.
- McNamara, R.K. y Skelton, R.W. (1993). The neuropharmacological and Neurochemical basis of place learning in the Morris water maze. *Brain Research Reviews*. 18: 33-49.
- McNaughton, B.L., Barnes, C.A., Gerrard, J.L., Gothard, K., Jung, M.W., Knierim, J.J., Kudrimoti, H., Qin, Y., Skaggs, W.E., Suster, M. y Weaver, K.L. (1996). Deciphering the hippocampal polyglot: the hippocampus as a path integration system. *The Journal of Experimental Biology*. 199: 173-185.

- 
- McNaughton, B.L., Leonard, B. y Chen, L.L. (1989). Cortical-hippocampal interactions and cognitive mapping: A hypotheses based on reintegration of the parietal and inferotemporal pathways for visual processing. *Psychobiology*. 17: 236-246.
- Means, L.W., Alexander, S.R. y O'Neal, M.F. (1992). Those cheating rats: male and female rats use odor trails in a water-escape 'working memory' task. *Behavioral and Neural Biology*. 58: 144-151.
- Miller, E. K. (2000). The prefrontal cortex and cognitive control. *Nature Reviews Neuroscience*. 1: 59-65.
- Milner, B., Squire, L.R. y Kandel, E.R. (1998). Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron*. 20: 445-468.
- Milner, P. M. (1991). Brain-stimulation reward: a review. *Canadian Journal of Psychology*. 45:1-36.
- Milner, B., Squire, L.R. y Kandel, E.R. (1998). Cognitive: neuroscience and the study of memory. *Neuron*. 20: 445-468.
- Mishkin, M., Suzuki, W.A., Gadian, D.G. y Vargha-Khadem, F. (1997). Hierarchical organization of cognitive memory. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B Biological Sciences*, 352: 1461-1467.
- Mogensen, J., Pedersen, T.K., Holm, S. y Bang, L.E. (1995). Prefrontal cortical mediation of rats' place learning in a modified water maze. *Brain Research Bulletin*. 38: 425-434.
- Mogenson, G. J., Jones, D. L. y Yim, C. Y. (1980). From motivation to action: Functional interface between the limbic system and the motor system. *Progress in Neurobiology*. 14: 69-97.
- Mogenson, G. J., Takigawa, M., Robertson, A. y Wu, M. (1979). Self-stimulation of the nucleus accumbens and ventral tegmented area of Tsai attenuated by microinjections of spiroperidol into the nucleus accumbens. *Brain Research*. 171(2): 247-59.
- Mondadori, C. y Weiskrantz, L. (1993). NMDA receptor blockers facilitate and impair learning via different mechanisms. *Behavioral and Neural Biology*. 60: 205-210.
- Montague, P.R., Dayan, P. y Sejnowski, T.J. (1996) A framework for mesencephalic dopamine systems based on predictive Hebbian learning. *The Journal of Neuroscience*. 16: 1936-1947

- 
- Mora, F. (1978). The neurochemical substrates of prefrontal cortex self-stimulation: a review and an interpretation of some recent data. *Life Sciences*. 22(11): 919-929.
- Mora, F., Avrith, D. B. y Rolls, E. T. (1980). An electrophysiological and behavioural study of self-stimulation in the orbitofrontal cortex of the rhesus monkey. *Brain Research Bulletin*. 5: 111-115.
- Mora, F. y Cobo, M. (1990). The neurobiological basis of prefrontal cortex self-stimulation: a review and an integrative hypothesis. *Progress in Brain Research*. 85:419-431.
- Morgado-Bernal, I. (2005). Psicobiología del aprendizaje y la memoria: fundamentos y avances recientes. *Revista de Neurología*. 40 (5): 289-297.
- Morris, R.G. (1981). Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learning and Motivation*. 12: 239-260.
- Morris, R.G. (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*. 11: 47-60.
- Morris, R.G. (1990). Toward a representational hypothesis of the role of the hippocampal synaptic plasticity in spatial and other forms of learning. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. 55: 161-73.
- Morris, R.G.M. y Davis, M. (1994). The role of NMDA receptors in learning and memory. In: G.L. Collingridge and J.C. Watkins, Editors, *The NMDA Receptor* (2nd Edition ed.), Oxford University Press, Oxford. 340-375.
- Morris, R.G.M., Garrud, P., Rawlins, J.N.P. y O'Keefe, J. (1982). Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature*. 297: 681-683.
- Morris, R.G.M. y Frey, U. (1997). Hippocampal synaptic plasticity: role in spatial learning or the automatic recording of attended experience? *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B Biological Sciences*, 352, 1489-1503.
- Moser, E., Moser, M.B. y Andersen, P. (1993). Spatial learning impairment parallels the magnitude of dorsal hippocampal lesions, but is hardly present following ventral lesions. *The Journal of Neuroscience*. 13: 3916-3925.

- Moser, M.B., Moser E.I., Forrest, E., Andersen, P. y Morris, R.G. (1995). Spatial learning with a minislab in the dorsal hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 92(21): 9697-701.
- Murray, B. y Shizgal, P. (1994). Evidence implicating both slow- and fast-conducting fibers in the rewarding effect of medial forebrain bundle stimulation. *Behavioural Brain Research*. 63: 47-60.
- Myhrer, T. (2003). Neurotransmitter system involved in learning and memory in the rat: a meta-analysis based on studies of four behavioral tasks. *Brain Research Reviews*. 41: 268-287.
- Nakahara, D., Fuchikami, K., Ozaki, N., Iwasaki, T. y Nagatsu, T. (1992). Differential effect of self-stimulation on dopamine release and metabolism in the rat medial frontal cortex, nucleus accumbens and striatum studied by in vivo microdialysis. *Brain Research*. 574: 164-170.
- Nakahara, D., Ishida, Y., Nakamura, M., Furuno, N. y Nishimori, T. (2001). Intracranial self-stimulation induces Fos expression in GABAergic neurons in the rat mesopontine tegmentum. *Neuroscience*. 106(3): 633-641.
- Nakahara, D., Nakamura, M., Furukawa, H. y Furuno, N. (2000). Intracranial self-stimulation increases differentially in vivo hydroxylation of tyrosine but similarly in vivo hydroxylation of tryptophan in rat medial prefrontal cortex, nucleus accumbens and striatum. *Brain Research*. 864: 124-129.
- Neill, D. B., Fenton, H. y Justice, J. B. (2002). Increase in accumbal dopaminergic transmission correlates with response cost not reward of hypothalamic stimulation. *Behavioural Brain Research* 137: 129-138
- Nielsen, C. K., Arnt, J. y Sánchez, C. (2000). Intracranial self-stimulation and sucrose intake differ as hedonic measures following chronic mild stress: interstrain and interindividual differences. *Behavioural Brain Research*. 107: 21-33.
- Nielson, K. A., Radtke, R. y Jensen, R. A. (1996). Arousal-induced modulation of memory storage processes in humans. *Neurobiology of Learning and Memory*. 66:133-142.
- Nieuwenhuys, R., Geeradets, L. M. G. y Veening, J. G. (1982). The medial forebrain bundle of the rat. I. General introduction. *The Journal of Comparative Neurology*. 206: 49-81.
- Norgren, R. y Grill, H. (1982). Brainstem control of ingestive behavior. En: D. W.

- 
- Pfaff (Ed.). The physiological mechanism of motivation. New York: Springer-Verlag, 99-131.
- Norman, A. B., Lu, S. Y., Klug, J. M. y Norgren, R. B. (1993). Sensitization of c-fos expression in rat striatum following multiple challenges with D-amphetamine. *Brain Research*. 603: 125-128.
- O'Keefe, J.A. y Dostrovsky, J. (1971). The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Research*. 34(1): 171-5.
- O'Keefe, J.A. y Nadel, L. (1978). The hippocampus as a cognitive map. New York: Oxford University Press.
- Olds, J. (1958). Self-stimulation of the brain. *Science*. 127: 315-324.
- Olds, J., Allan, W. S. y Briese, E. (1971). Differentiation of hypothalamic drive and reward centers. *American Journal of Physiology*. 221: 368-375.
- Olds, J. y Milner, P. (1954). Positive reinforcement produced by Electrical stimulation of septal area and other regions of the rat brain. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 47: 419-427.
- Packard, M.G., Hirsh, R. y White, N.M. (1989). Differential effects of fornix and caudate nucleus lesions on two radial maze tasks: evidence for multiple memory systems. *The Journal of Neuroscience*. 9: 1465-1472.
- Packard, M.G., Kohlmaier, J.R. y Alexander, G.M. (1996). Posttraining intrahippocampal estradiol injections enhance spatial memory in male rats: interaction with cholinergic systems. *Behavioral Neuroscience*. 110: 626-632.
- Parker, A. y Gaffan, D. (1998). Memory after frontal/temporal disconnection in monkeys: conditional and non-conditional tasks, unilateral and bilateral frontal lesions. *Neuropsychologia*. 36: 259-271.
- Paxinos, G. y Watson, C. (1997). The rat brain in stereotaxic coordinates. San Diego: Academic Press.
- Pearce, J.M., Robert, A.D. y Good, M. (1998). Hippocampal lesions disrupt navigation based on cognitive maps but not heading vectors. *Nature*. 396: 75-77.
- Persico, A. M., Schindler, C. W., O' Hara, B. F., Brannock, M. T. y Uhl, G. R. (1993). Brain transcription factor expression: effects of acute and chronic amphetamine and injection stress. *Molecular Brain Research*. 20: 91-100.



- Phillips, A. G. (1984). Brain reward circuitry: a case for separate systems. *Brain Research Bulletin*. 12: 195-201.
- Phillips, A. G., Coury, A., Fiorino, D., LePiane, F. G., Brown, E. y Fibiger, H. C. (1992). Self-stimulation of the ventral tegmental area enhances dopamine release in the nucleus accumbens: a microdialysis study. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 654: 199-206.
- Phillips, A. G., Blaha, C.D. y Fibiger, H.C. (1989). Neurochemical correlates of brain self-stimulation reward measured by ex vivo and in vivo analyses. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 13: 99-104.
- Phillips, A. G. y Fibiger, H. C. (1989). Neuroanatomical bases of intracranial self-stimulation: untangling the Gordian Knot. En: J. M. Liebman y S. J. Cooper (Eds.). *The Neuropharmacological Basis of Reward*. New York: Oxford University Press. 66-105.
- Phillips, A. G., Mora, F. y Rolls, E. T. (1981). Intra-cerebral self-administration of amphetamine by rhesus monkeys. *Neuroscience Letters*. 24: 81-86.
- Pirot, S., Glowinski, J. y Thierry, A. M. (1994). Anatomical and electrophysiological evidence for an excitatory amino acid pathway from the thalamic mediodorsal nucleus to the prefrontal cortex in the rat. *European Journal of Neuroscience*. 6: 1225-1234.
- Pirot, S., Glowinski, J. y Thierry, A. M. (1995). Excitatory responses evoked in prefrontal cortex by mediodorsal thalamic nucleus stimulation: influence of anaesthesia. *European Journal of Pharmacology*. 285: 45-54.
- Pitsikas, N., Biagini, L. y Algeri, S. (1991). Previous experience facilitates preservation of spatial memory in the senescent rat. *Physiology & Behavior*. 49: 823-825.
- Pitsikas, N., Carli, M., Fidecka, S. y Algeri, S. (1990). Effect of life-long hypocaloric diet on age-related changes in motor and cognitive behavior in a rat population. *Neurobiology of Aging*. 11: 417-423.
- Ploeger, G.E., Spruijt, B.M. y Cools, A.R. (1994). Spatial localization in the Morris water maze in rats: acquisition is affected by intra-accumbens injections of the dopaminergic antagonist haloperidol. *Behavioral Neuroscience*. 108 (1994): 927-934.
- Porrino, L., Esposito, R., Seeger, T., Crane, A., Pert, A. y Sokoloff, L. (1984). Metabolic mapping of the brain during rewarding self-stimulation. *Science*. 224: 306-309.
- Porrino, L. J., Huston-Lyons, D., Bain, G., Sokoloff, L. y Kornetsky, C. (1990).

- The distribution of changes in local cerebral energy metabolism associated with brain stimulation reward to the medial forebrain bundle of the rat. *Brain Research*. 511:1-6.
- Poucet, B., Save, E. y Lenck-Santini, P.-P. (2000). Sensory and memory properties of hippocampal place cells. *Reviews in Neurosciences*. 11: 95-111.
- Prados, J. y Trobalon, J.B. (1998). Locating an invisible goal in a water maze requires at least two landmarks. *Psychobiology*. 26: 42-48.
- Preuss, T. M. (1995). Do rats have prefrontal cortex? The Rose-Woolsey-Arkert program reconsidered. *Journal of Cognitive Neuroscience*. 7:1-15.
- Prince, S.E., Daselaar, S.M. y Cabeza, R. (2005). Neural correlates of relational memory: successful encoding and retrieval of semantic and perceptual associations. *The Journal of Neuroscience*. 25: 1203-10
- Przybylski, J. y Sara, S. J. (1997). Reconsolidation of memory after its reactivation. *Behavioural Brain Research*. 84(1-2): 241-246.
- Rada, P. V., Mark, G. P. y Hoebel, B. G. (1998). Dopamine release in the nucleus accumbens by hypothalamic stimulation-escape behavior. *Brain Research*. 782: 228-234.
- Rainer, G., Asaad, W. F. y Miller, E. K. (1998). Memory fields of neurons in the primate prefrontal cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95: 15008-15013.
- Ranganath, C., Yonelinas, A.P., Cohen. M.X., Dy, C.J., Tom, S.M. y D'Esposito, M. (2003). Dissociable correlates of recollection and familiarity within the medial temporal lobes. *Neuropsychologia*. 42:2-13
- Rebec, G. V., Grabner, C. P., Johnson, M., Pierce, R. C. y Bardo, M. T. (1997). Transient increases in catecholaminergic activity in medial prefrontal cortex and nucleus accumbens shell during novelty. *Neuroscience*. 76(3): 707-14.
- Redish, A.D. y Touretzky, D.S. (1998). The role of the hippocampus in solving the Morris water maze. *Neural Computation*. 10: 73-111.
- Redolar-Ripoll, D., Aldavert-Vera, L., Soriano-Mas, C., Segura-Torres, P. y Morgado-Bernal, I. (2002). Intracranial self-stimulation facilitates memory consolidation, but not retrieval: its effects are more effective than increased training. *Behavioural Brain Research*. 129: 65-75.

- 
- Redolar-Ripoll, D., Soriano-Mas, C., Guillazo-Blanch, G., Aldavert-Vera, L., Segura-Torres, P. y Morgado-Bernal, I. (2003). Posttraining Intracranial Self-Stimulation Ameliorates the Detrimental Effects of Parafascicular Thalamic Lesions on Active Avoidance in Young and Aged Rats. *Behavioral Neuroscience*. 117(2): 246-256.
- Richardson, N. R. y Gratton, A. (1998). Changes in medial prefrontal cortical dopamine levels associated with response-contingent food reward: an 9138.
- Riekkinen, M. y Riekkinen Jr. P. (1997). Nicotine and D-cycloserine enhance acquisition of water maze spatial navigation in aged rats. *Neuroreport*. 8: 699-703.
- Rison, R.A. y Stanton, P.K. (1995). Long-term potentiation and N-methyl-D-aspartate receptors: foundations of memory and neurological disease?. *Neuroscience Biobehavioral Reviews*. 19: 533-552.
- Robbins, T. W. y Everitt, B. J. (1996). Arousal systems and attention. En: M. S. Gazzaniga (Ed.). *Handbook of Cognitive Neuroscience*. Cambridge: MIT Press. 703-720.
- Robertson, A. (1989). Multiple reward systems and the prefrontal cortex. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 13: 163-170.
- Robinson, T. E. y Berridge, K. C. (1993). The neural basis for drug craving: and incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Research Reviews*. 18: 247-291.
- Rodrigo, T., Chamizo, V.D., McLaren, I.P.L. y Mackintosh, N.J. (1997). Blocking in the spatial domain. *Journal of Experimental Psychology. Animal Behavior Processes*. 23, 110-118.
- Rolls, E. T. (1975). *The Brain and Reward*. Oxford: Pergamon.
- Rolls, E. T. (1999). *The Brain and Emotions*. Oxford: Oxford University Press. 148-204.
- Romo, R., Brody, C.D., Hernández, A. y Lemus, L. (1999). Neuronal correlates of parametric working memory in the prefrontal cortex. *Nature*. 399: 470-473.
- Rompré, P.P. y Miliareisis, E. (1985). Pontine and mesencephalic substrates of self-stimulation. *Brain Research*. 359: 246-259.
- Rossetti, Z. L., Marcangione, C. y Wise, R. A. (1998). Increase of extracellular glutamate and expression of Fos-like immunoreactivity in the ventral

- tegmental area in response to electrical stimulation of the prefrontal cortex. *Journal of Neurochemistry*. 70(4): 1503-1512.
- Roof, R.L. (1993). Neonatal exogenous testosterone modifies sex difference in radial arm and Morris water maze performance in prepubescent and adult rats. *Behavioral Brain Research*. 53: 1-10.
- Routtenberg, A. (1974). An electrochemical study in rat. *The Journal of Neuroscience*. 18(21): 9130-9134 (1974). Significance of intracranial self-stimulation pathways for memory consolidation. En: P. B. Bradley (Ed.). *Methods in Brain Research*. New York: John Wiley & Sons, 453-474.
- Routtenberg, A. (1975). Intracranial self-stimulation pathways as substrate for memory consolidation. En: J. K. Cole y T. B. Sonderegger (Eds.) *Nebraska Symposium on Motivation*. Lincoln: University of Nebraska Press. 161-182.
- Routtenberg, A. (1979). Participation of brain stimulation reward substrates in memory: anatomical and biochemical evidence. *Pharmacology of Central Motivational Systems, Federation Proceedings*. 38: 2446-2453.
- Routtenberg, A. y Sloan, M. (1972) Self-stimulation in the frontal cortex of *Rattus norvegicus*. *Behavioral Biology*. 7(4): 567-72.
- Rugg, M.D. y Yonelinas, A.P. (2003). Human recognition memory: a cognitive Neuroscience perspective. *Trends in Cognitive Sciences*. 7: 313-19.
- Ruiz-Medina, J., Redolar-Ripoll, D., Morgado-Bernal, I., Aldavert-Vera, L. y Segura-Torres, P. (2007). Intracranial self-stimulation improves memory consolidation in rats with little training (accepted in *Neurobiology of Learning and Memory*).
- Sandi, C. (1998). The role and mechanisms of action of glucocorticoid involvement in memory storage. *Neural Plasticity*. 6: 41-52.
- Sandi, C., Loscertales, M. y Guaza, C. (1997). Experience-dependent facilitating effect of corticosterone on spatial memory formation in the water maze. *European Journal of Neuroscience*. 9: 637-642.
- Sara, S., Roullet, P. y Przybylski, J. (1999). Consolidation of memory for odor-reward association: beta-adrenergic receptor involvement in the late phase. *Learning and Memory*. 6:88-96.
- Schenk, S., Prince, C. y Shizgal, P. (1985). Spatio-temporal integration in the substrate for self-stimulation of the prefrontal cortex. *Physiology and Behavior*. 35(2): 303-306.

- Schenk, S. y Shizgal, P. (1982). The substrates for lateral hypothalamic and medial pre-frontal cortex self-stimulation have different refractory periods and show poor spatial summation. *Physiology and Behavior*. 28(1): 133-138.
- Schenk, S. y Shizgal, P. (1985). The substrates for self-stimulation of the lateral hypothalamus and medial prefrontal cortex: a comparison of strength-duration characteristics. *Physiology and Behavior*. 34(6): 943-949.
- Schultz, W. (1998). Predictive reward signal of dopamine neurons. *Journal of Neurophysiology*. 80: 1-27.
- Schultz, W. (2000). Multiple reward signals in the brain. *Nature Reviews Neuroscience*. 1:199-207.
- Schultz, W. (2002) Getting formal with dopamine and reward. *Neuron*. 36: 241-263
- Schultz, W., Dayan, P. y Montague, R. R. (1997). A neural substrate of prediction and reward. *Science*. 275: 1593-1599.
- Schultz, W. y Romo, R. (1987). Responses of nigrostriatal dopamine neurons to high-intensity somatosensory stimulation in the anesthetized monkey. *Journal of Neurophysiology*. 57: 201-217
- Segal, D. S., Kuczenski, R. y Florin, S. M. (1995). Does dizocilpine (MK-801) selectively block the enhanced responsiveness to repeated amphetamine administration?. *Behavioral Neuroscience*. 109: 532-546.
- Segura-Torres, P. y Capdevila-Ortís, L. (1986). Autoestimulació elèctrica intracranial i aprenentatge d'evitació en rates. Tesis de Licenciatura. Facultat de Psicologia, Universitat Autònoma de Barcelona.
- Segura-Torres, P., Capdevila-Ortíz, L., Martí-Nicolovius, M. y Morgado-Bernal, I. (1988). Improvement of shuttle-box learning with pre- and post-trial intracranial self-stimulation in rats. *Behavioural Brain Research*. 29: 111-117.
- Segura-Torres, P., Portell-Cortés, I. y Morgado-Bernal, I. (1991). Improvement of shuttle-box avoidance with post-training intracranial self-stimulation, in rats: a parametric study. *Behavioural Brain Research*. 42: 161-167.
- Segura-Torres, P., Wagner, U., Massanés-Rotger, E., Aldavert-Vera, L., Martí-Nicolovius, M. y Morgado-Bernal I. (1996). Tuberomammillary nucleus lesion facilitates two-way active avoidance retention in rats. *Behavioural Brain Research*. 82:113-117.

- Shankaranarayana Rao, B. S., Desiraju, T., Meti, B. L. y Raju, T. R. (1994). Plasticity of hippocampal and motor cortical pyramidal neurons induced by self-stimulation experience. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*. 38: 23-28.
- Shankaranarayana Rao, B. S., Desiraju, T. y Raju, T. R. (1993). Neuronal plasticity induced by self-stimulation rewarding experience in rats -a study on alteration in dendritic branching in pyramidal neurons of hippocampus and motor cortex. *Brain Research*. 627: 216-224.
- Shankaranarayana Rao, B. S., Raju, T. R. y Meti, B. L. (1997). Synaptic plasticity in hippocampus and motor cortex induced by self-stimulation rewarding experience. *Annual Conference of Indian Society Aerospace Medicine*. 37:47-48.
- Shankaranarayana Rao, B. S., Raju, T. R. y Meti, B. L. (1998a). Alterations in the density of excrescences in CA3 neurons of hippocampus in rats subjected to self-stimulation experience. *Brain Research*. 804: 320-324.
- Shankaranarayana Rao, B. S., Raju, T. R. y Meti, B. L. (1998b). Long-lasting structural changes in CA3 hippocampal and layer V motor cortical pyramidal neurons associated with self-stimulation rewarding experience: a quantitative Golgi study. *Brain Research Bulletin*. 47(1): 95-101.
- Shankaranarayana Rao, B. S., Raju, T. R. y Meti, B. L. (1998c). Self-stimulation of lateral hypothalamus and ventral tegmentum increase the levels of noradrenaline, dopamine, glutamate and AChE activity but not 5-hydroxytryptamine and GABA levels in hippocampus and motor cortex. *Neurochemical Research*. 23: 1055-1061.
- Shapiro, M. (2001). Plasticity, hippocampal place cells and cognitive maps. *Archives of Neurology*. 58(6): 874-81.
- Shizgal, P. y Murray, B. (1989). Neuronal basis of intracranial self-stimulation. En: J. M. Liebman y S. J. Cooper (Eds.). *The Neuropharmacological Basis of Reward*. New York: Oxford University Press. 106-163.
- Silva, A.J., Paylor, R., Wehner, J.M. y Tonegawa, S. (1992). Impaired spatial learning in  $\alpha$ -calcium-calmodulin kinase II mutant mice. *Science*. 257: 206-211.
- Singh, J., Desiraju, T. y Raju, T. R. (1997a). Cholinergic and GABAergic modulation of self-stimulation of lateral hypothalamus and ventral tegmentum: effects of carbachol, atropine, bicuculline, and picrotoxin.

- Physiology and Behavior. 61(3): 411-418.
- Singh, J., Desiraju, T. y Raju, T. R. (1997b). Dopamine receptor sub-types involvement in nucleus accumbens and ventral tegmentum but not medial prefrontal cortex: on self-stimulation of lateral hypothalamus and ventral mesencephalon. *Behavioural Brain Research*. 86:171-179.
- Skinner, D.M., Martin, G.M., Harley, C., Kolb, B., Pridgar, A., Bechara, A. y Van der Kooy, D. (1994). Acquisition of conditional discriminations in hippocampal lesioned and decorticated rats: Evidence for learning that is separate from both simple classical conditioning and configural learning. *Behavioral Neuroscience*. 108: 911-926.
- Smith, C. y Rose, G.M. (1997). Posttraining paradoxical sleep in rats is increased after spatial learning in the Morris water maze. *Behavioral Neuroscience*. 111: 1197-1204.
- Smith, M.A. (1996). Hippocampal vulnerability to stress and aging: possible role of neurotrophic factors. *Behavioral Brain Research*. 78: 25-36.
- Soriano-Mas, C., Redolar-Ripoll, D., Aldavert-Vera, L., Morgado-Bernal, I. y Segura-Torres P. (2005). Post-training intracranial self-stimulation facilitates a hippocampus-dependent task. *Behavioural Brain Research*. 160: 141-147.
- Soriano-Mas, C., Redolar-Ripoll, D., Guillazo-Blanch, G., Morgado-Bernal, I y Segura-Torres, P. (2007). Intracranial self-stimulation after memory reactivation: immediate and late effects. *Brain Research Bulletin*. 74: 51-57.
- Sprick, U., Hasenohrl, R.U., Krauth, J., Klapdor, K. y Huston, J.P. (1996). Effects of chronic substance P treatment and intracranial fetal grafts on learning after hippocampal kainic acid lesions. *Peptides*. 17: 275-285.
- Squire, L.R., Knowlton, B. y Musen, G. (1993). The structure and organization of memory. *Annual Reviews Psychological*. 44: 453-95.
- Steffensen, S.C., Svingos, A.L., Pickel, V.M. y Henriksen, S. J. (1998). Electrophysiological characterization of GABAergic neurons in the ventral tegmental area. *Journal of Neuroscience*. 18: 8803-8815.
- Steffensen, S.C., Lee, R.S., Stobbs, S.H. y Henriksen, S.J. (2001). Responses of ventral tegmental area GABA neurons to brain stimulation reward. *Brain Research*. 906: 190-197.
- Stellar, J. R. y Corbett, D. (1989). Regional neuroleptic microinjections indicate a role for nucleus accumbens in lateral hypothalamic self-stimulation

- reward. *Brain Research*. 477: 126-143.
- Stellar, J. R., Illes, J. y Mills, L. E. (1982). Role of ipsilateral forebrain in lateral hypothalamic stimulation reward in rats. *Physiology and Behavior*. 29: 1089-1097.
- Stellar, J. R., Kelley, A. E. y Corbett, D. (1983). Effects of peripheral and central dopamine blockade on lateral hypothalamic self-stimulation: evidence for both reward and motor deficits. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 18: 433-442.
- Stellar, J. R. y Stellar, E. (1985). *The neurobiology of motivation and reward*. New York: Springer-Verlag.
- Stewart, C.A. y Morris, R.G.M. (1993). The watermaze. In: A. Sahgal, Editor, *Behavioural Neuroscience. A Practical Approach Vol. 1*, IRL Press, Oxford. 107-122.
- Stewart, J., Mitchell, J. y Kalant, N. (1989). The effects of life-long food restriction on spatial memory in young and aged Fischer 344 rats measured in the eight-arm radial and the Morris water mazes. *Neurobiology of Aging*. 10: 669-675.
- Suzuki, W. A. y Amaral, D.G. (1990). Cortical inputs to the CA1 field of the monkey hippocampus originate from the perirhinal and parahippocampal cortex but not from area TE. *Neuroscience Letters*. 115: 43-48.
- Suzuki, W. A. y Amaral, D.G. (1994a). Perirhinal and parahippocampal cortices of the macaque monkey: cortical afferents. *Journal of Comparative Neurology*. 350: 497-533.
- Suzuki, W. A. y Amaral, D.G. (1994b). Topographic organization of the reciprocal connections between the monkey entorhinal cortex and the perirhinal and parahippocampal cortices. *Journal of Neuroscience*. 14: 1856-1877.
- Swanson, L. W. (2000). Cerebral hemisphere regulation of motivated behavior. *Brain Research*. 886: 113-164.
- Swanson, L. W. y Kohler, C. (1986). Anatomical evidence for direct projections from the entorhinal area to the entire cortical mantle in the rat. *The Journal of Neuroscience*. 6: 3010-3023.
- Taber, M. T. y Fibiger, H. C. (1995). Electrical stimulation of the prefrontal cortex increases dopamine release in the nucleus accumbens of the rat: modulation by metabotropic glutamate receptors. *The Journal of Neuroscience*. 15(5 Pt 2): 3896-3904.



- Thinus-Blanc, C., Save, E., Rossi-Arnaud, C., Tozzi, A. y Ammassari-Teule, M. (1996). The differences shown by C57BL/6 and DBA/2 inbred mice in detecting spatial novelty are subserved by a different hippocampal and parietal cortex interplay. *Behavioral Brain Research*. 80: 33-40.
- Thompson, R. F. y Krupa, D.J. (1994). Organization of memory traces in the mammalian brain. *Annual Review of Neuroscience*. 17: 519-550.
- Tremblay, L. y Schultz, W. (2000). Modifications of reward expectation-related neuronal activity during learning in primate orbitofrontal cortex. *Journal of Neurophysiology*. 83: 1877-1885.
- Tulving, E. (2000). Introduction to memory chapters. A M.S. Gazzaniga (Ed.): *The New Cognitive Neurosciences*. Cambridge: MIT Press, pp. 727-732.
- Tulving, E. y Markowitsch, H.J. (1998). Episodic and declarative memory: role of the hippocampus. *Hippocampus*. 8: 198-204.
- Tzschentke, T. M. (2000). The medial prefrontal cortex as a part of the brain reward system. *Amino Acids*. 19(1): 211-219.
- Tzschentke, T. M. (2001). Pharmacology and behavioral pharmacology of the mesocortical dopamine system. *Progress in Neurobiology*. 63(3): 241-320.
- Tzschentke, T. M., You, Z. B. y Wise, R. A. (1997). Electrical stimulation of the medial prefrontal cortex elicits release of dopamine and glutamate in nucleus accumbens and ventral tegmental area in rats: effects of different frequencies and currents. *Society For Neuroscience Abstracts*. 23: 1753.
- Trzcinska, M. y Bielajew, C. (1998). Functional connections between medial prefrontal cortex and caudate-putamen in brain-stimulation reward of rats. *Behavioral Neuroscience*. 112(5): 1177-1186.
- Tzchentke, T. M. y Schmidt, W. J. (1995). N-methyl-D-aspartic acid-receptor antagonists block morphine-induced conditioned place preference in rats. *Neuroscience Letters*. 193: 37-40.
- Ungless, M. A. (2004). Dopamine: the salient issue. *Trends in Neuroscience*. 27: 702-706.
- Van Praag, H., Kempermann, G. y Gage, F.H. (2000). Neural consequences of environmental enrichment. *Nature Neuroscience Reviews*. 1: 191-198.
- Velley, L. y Cardo, B. (1979). Long-term improvement of learning after early electrical stimulation of some central nervous structures: is the effect structure and age-dependent?. *Brain Research Bulletin*. 4: 459-466.

- Velley, L., Chassaing, J. M. y Cardo, B. (1981). Learning improvement of appetitively or aversively reinforced light-dark discrimination and reversal four weeks after electrical stimulation of the lateral hypothalamus of the rat. *Brain Research Bulletin*. 6(5): 377-383.
- Velley, L., Manciet, G. y Cardo, B. (1978). Effects of early electrical stimulation of the lateral hypothalamus on the delayed acquisition of approach and avoidance learning tasks in the rat. *Behavioural Processes*. 3: 317-324.
- Vicens, P., Bernal, M.C., Carrasco, M.C. y Redolat, R. (1999). Previous training in the water maze: Differential effects in NMRI and C57BL mice. *Physiology and Behavior*. 67: 197-203.
- Vicens, P., Redolat, R y Carrasco, M.C. (2003). Aprendizaje espacial y laberinto de agua: metodología y aplicaciones. *Psicothema*. 15(4): 539-544.
- Vicens, P., Redolat, R. y Carrasco, M.C. (2002). Effects of early spatial training on water maze performance: A longitudinal study in mice. *Experimental Gerontology*. 37: 575-581.
- Walther, T., Voigt, J.P., Fukamizu, A., Fink, H. y M. Bader. (1999). Learning and anxiety in angiotensin-deficient mice. *Behavioral Brain Research*. 100: 1-4.
- Warren, S.G. y Juraska, J.M. (1997). Spatial and nonspatial learning across the rat estrous cycle. *Behavioral Neuroscience*. 111: 259-266.
- Watanabe, M. (1990). Prefrontal unit activity during associative learning in the monkey. *Experimental Brain Research*. 80: 296-309.
- Watanabe, M. (1992). Frontal units of the monkey coding the associative significance of visual and auditory stimuli. *Experimental Brain Research*. 89: 233-247.
- Watanabe, M. (1996). Reward expectancy in primate prefrontal neurons. *Nature*. 382: 629-632.
- Wenk, G.L. (1998). Assessment of spatial memory using radial arm and Morris water mazes. In: J. Crawley, C. Gerfen, R. McKay, M. Rogawski, D. Sibley and P. Skolnick, Editors, *Current Protocols in Neuroscience*, Wiley, New York.
- Wesierska, M., Macias-Gonzalez, R. y Bures, J. (1990). Differential effect of ketamine on the reference and working memory versions of the Morris water maze task. *Behavioral Neuroscience*. 104: 74-83.

- Whishaw, I.Q. y Tomie, J.A. (1996). Of mice and mazes: similarities between mice and rats on dry land but not water maze. *Physiology and Behaviour*. 60: 1191-1197.
- White, N. M. y Major, R. (1978). Facilitation of retention by self-stimulation and by experimenter-administered stimulation. *Canadian Journal of Psychology*. 32: 116-123.
- White, N.M. y Milner, P.M. (1992). The psychobiology of reinforcers. *Annual Review of Psychology*. 43: 443-471.
- Williams, G. V. y Goldman-Rakic, P. S. (1995). Modulation of memory fields by dopamine D1 receptors in prefrontal cortex. *Nature*. 376: 572-575.
- Willick, M. L. y Kokkinidis, L. (1995). The effects of ventral tegmental administration of GABA<sub>A</sub>, GABA<sub>B</sub> and NMDA receptor agonists on medial forebrain bundle self-stimulation. *Behavioural Brain Research*. 70: 31-36.
- Wise, R. A. (1978). Neuroleptic attenuation of intracranial self-stimulation: reward or performance deficits? *Life Sciences*. 22: 535-542.
- Wise, R. A. (1980). Action of drugs of abuse on brain reward systems. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 13: 213-223.
- Wise, R. A. (1996a). Addictive drugs and brain stimulation reward. *Annual Review of Neuroscience*. 19: 319-340.
- Wise, R. A. (1996b). Neurobiology of addiction. *Current Opinion in Neurobiology*. 6(2): 243-251.
- Wise, R. A. y Bozarth, M. A. (1984). Brain reward circuitry: four circuit elements "wired" in apparent series. *Brain Research Bulletin*. 12: 203-208.
- Wise, R. A. y Hoffman, D. C. (1992). Localization of drug reward mechanisms by intracranial injections. *Synapse*. 10: 247-263.
- Wongwitdecha, N. y Marsden, C.A. (1996). Effects of social isolation rearing on learning in the Morris water maze. *Brain Research*. 715: 119-124.
- Yadin, E., Guarini, V. y Gallistel, C. R. (1983). Unilaterally activated systems in rats self-stimulating at sites in the medial forebrain bundle, medial prefrontal cortex, or locus coeruleus. *Brain Research*. 266: 39-50.
- Yayou, K., Takeda, M., Tsubone, H., Sugano, S. y Doi, K. (1993). The disturbance of water-maze task performance in mice with EMC-D virus infection. *The Journal of Veterinary Medical Science*. 55: 341-342.

- Yee, B. K. (2000). Cytotoxic lesion of the medial prefrontal cortex abolishes the partial reinforcement extinction effect, attenuates prepulse inhibition of the acoustic startle reflex and induces transient hyperlocomotion, while sparing spontaneous object recognition memory in the rat. *Neuroscience*. 95(3): 675-89.
- Yeomans, J. S. (1990). *Principles of brain stimulation*. New York: Oxford University Press, 55-137.
- Ylinen, A., Lahtinen, H., Sirvio, J., Partanen, J., Asikainen, A., Gulyas, A., Freund, T.F. y Riekkinen, P. (1991). Behavioural, electrophysiological and histopathological changes following sustained stimulation of the perforant pathway input to the hippocampus: effect of the NMDA receptor antagonist, CGP 39551. *Brain Research*. 553: 195-200.
- Yoganarasimha, D. y Meti, B. L. (1999). Amelioration of fornix lesion induced learning deficits by self-stimulation rewarding experience. *Brain Research*. 845: 246-251.
- Yoganarasimha, D., Shankaranarayana Rao, B. S., Raju, T. R. y Meti, B. L. (1998). Facilitation of acquisition and performance of operant and spatial learning tasks in self-stimulation experienced rats. *Behavioral Neuroscience*. 112(3): 725-729.
- Young, A. M., Joseph, M. H. y Gray, J. A. (1992). Increased dopamine release in vivo in nucleus accumbens and caudate nucleus of the rat during drinking: a microdialysis study. *Neuroscience*. 48: 871-876.
- Zamanillo, D., Sprengel, R., Hvalby, O., Jensen, V., Burnashev, N., Rozov, A., Kaiser, K.M., Koster, H.J., Borchardt, T., Worley, P., Lubke, J., Frotscher, M., Kelly, P.H., Sommer, B., Andersen, P., Seeburg, P.H. y Sakmann, B. (1999). Importance of AMPA receptors for hippocampal synaptic plasticity but not for spatial learning. *Science*. 284: 1805-1811.
- Zeigler, H.P. (1975). Trigeminal deafferentation and hunger in the pigeon (*Columba livia*). *Journal of Comparative and Physiological Psychology*. 89: 827-844.
- Zola, S.M. y Squire, L.R. (1999). Remembering the hippocampus. *Behavioral and Brain Sciences*. 22: 469-471.
- Zola-Morgan, S., Squire, L.R. y Amaral, D.G. (1986). Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. *Journal of Neuroscience*. 6: 2950-2967.

# **ANEXO**

# PROTOCOLO DE SUPERVISIÓN

**PROCEDIMIENTO:**

---

**EXPERIMENTO:**

---

Sesión	Fecha	Observación Animal				Otras Observaciones	Puntuación Total
		Mutil. Voc.ext	aspecto	Agresivo comatos	peso		
Intervención estereotóxica	Est						
	Rec.1						
	Rec.2						
	Rec.3						
	Rec.4						
	Rec.5						
	Rec.6						
	Rec.7						
Fase Experimental	Sem. Mod+BIO 1						
	Sem.BIO2						
	Sem. LAM						
	Sem. LAM						
	Sem. LAM						

**CORRECCIÓN: ESCALA DE SEVERIDAD y acciones a realizar en cada caso.**

Por el tipo de variables de estudio de nuestros procedimientos y los complejos parámetros conductuales, el estado de los animales ha de ser no sólo de no-sufrimiento físico, sino también de bienestar y tranquilidad psicológicos y de adaptación a las condiciones experimentales. Por este motivo, los criterios basados en la escala de severidad para eliminar un animal determinado del experimento y, si se da el caso, sacrificarlo, son más rigurosos que los utilizados en otros tipos de investigación.

Cabe tener especial atención respecto al peso de los animales, ya que los criterios tienen un significado muy diferente si se dan en la fase de Recuperación Postoperatoria o en la Fase Experimental propiamente dicha (cuando el bienestar de los animales, además de ser un objetivo ético, es también un objetivo de validez de los resultados experimentales).

Niveles	Clasificación	Acciones
0-1	Normal	Supervisar el aspecto alterado e intentar devolverlo a la normalidad
2-3	Posible sufrimiento	Supervisar con cuidado. Parar el proceso experimental, si es posible, hasta recuperar la normalidad. Si no se recupera la normalidad o el paro del proceso experimental invalida los resultados, se sacrifica al animal.
4-8	Sufrimiento	IDEM anterior más, valoración mejora con analgésicos o posibilidad de sacrificar al animal independientemente de su necesidad para continuar el experimento
9-16	Sufrimiento Intenso	Sacrificar al animal

NOTA: cuando más de un apartado tenga el valor 3, se considera como un 4; ESCALA: del 0 al 16

**CRITERIOS DE PUNTO FINAL:**

## Cuantitativos:

- puntuación en la Escala de Severidad igual o superior a 8 (sacrificio independientemente de la posibilidad de recuperar al animal, principalmente por su sufrimiento).

## Cualitativos

- presencia de automutilaciones en cualquier momento del proceso experimental.
- estado comatoso en cualquier momento del proceso experimental.
- adipsia y/o afagia durante un periodo superior a 3 días (sin ninguna causa experimental)

- no recuperación del peso anterior a la intervención estereotàxica en un período superior a 10 días (es decir, al inicio de la fase experimental propiamente dicha).
- cuando un animal aguante, sin hacer ninguna respuesta de huida, un shock en las patas en la jaula de condicionamiento durante más de 5 ensayos seguidos.

### CRITERIOS DE VALORACIÓN

ASPECTO DEL ANIMAL	
0	Normal
1	Pelo en mal estado
2	Pelo en mal estado + secreciones
3	Postura anormal

CONDUCTA NO-PROVOCADA Automutilaciones, vocalizaciones extremas	
0	Ausencia
3	Presencia

CONDUCTA EN RESPUESTA A ESTÍMULOS	
0	Normal
3	Estado Agresivo / Comatoso

PESO (*)	
0	Crecimiento normal
1	-10%
2	-10%-20%, posible alteración de las heces
3	-20%, no ingesta de agua y/o de comida

(\*) el control del peso se realiza diariamente incluso a lo largo de la Fase Experimental ( se apunta en el protocolo individualizado de cada sujeto, en el cual se identifica cada animal, se registra el grupo y las características experimentales, y también se anotan los resultados de las pruebas).