

TESIS DOCTORAL

POTENCIACIÓN DEL APRENDIZAJE Y
LA MEMORIA POR
AUTOESTIMULACIÓN ELÉCTRICA
INTRACRANEAL EN RATAS:
CAMBIOS MORFOLÓGICOS EN
NEURONAS HIPOCAMPALES

JACOBO CHAMORRO LÓPEZ

Dirigida por:

Dr. Ignacio Morgado Bernal y Dra. Pilar Segura Torres

Departamento de Psicobiología

Instituto de Neurociencias

Universidad Autónoma de Barcelona

INDICE

Contenido

I.	INDICE	3
II.	PLANTEAMIENTO Y OBJETIVO GENERAL.....	6
1	PLANTEAMIENTO Y OBJETIVO GENERAL.....	7
III.	MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES EXPERIMENTALES	10
1	LA AUTOESTIMULACIÓN ELÉCTRICA INTRACRANEAL.....	11
1.1	INTRODUCCIÓN	11
1.2	Mecanismos Neurales del Refuerzo por AEIC.....	12
1.2.1	Haz prosencefálico medial (HPM)	14
1.3	Neuroquímica del refuerzo por AEIC: El papel de la dopamina y otros neurotransmisores	15
2	La memoria espacial.....	19
2.1	INTRODUCCIÓN	19
2.2	NEUROANATOMÍA DEL APRENDIZAJE ESPACIAL	19
2.2.1	Otras estructuras implicadas en el aprendizaje espacial	21
2.3	SISTEMAS DE NEUROTRANSMISIÓN Y APRENDIZAJE ESPACIAL	22
3	EL LABERINTO ACUÁTICO DE MORRIS.....	23
3.1	INTRODUCCIÓN	23
3.2	CONSIDERACIONES METODOLÓGICAS	24
3.2.1	protocolo estándar de entrenamiento	24
3.2.2	El ensayo de prueba	26
3.2.3	Procedimientos de control habituales.....	26
3.2.4	Variaciones sobre el protocolo básico	27
3.2.5	Parámetros analizados.....	27
4	MEMORIA Y MICROESTRUCTURA en el hipocampo	29
4.1	BASES NEURALES DE LA MEMORIA.....	29
4.2	Función de las espinas dendríticas	34

5	modulación de la consolidación de la MEMORIA ESPACIAL por aeic en el hpm.....	36
5.1	INTRODUCCIÓN	36
5.2	EL SUSTRATO NERVIOSO DE LA MEMORIA ESPACIAL Y LA AEIC	38
5.2.1	AEIC y activación de regiones relacionadas con la memoria espacial.....	38
5.2.2	AEIC y cambios en la morfología neuronal.....	39
5.2.3	AEIC y cambios neuroquímicos en el hipocampo.....	40
5.2.4	AEIC y neurogénesis en el hipocampo.....	40
IV.	TRABAJO EXPERIMENTAL	42
III.	TRABAJO EXPERIMENTAL.....	43
1	PLANTEAMIENTO	43
2	EXPERIMENTOS	45
2.1	EXPERIMENTO 1	45
2.1.1	INTRODUCCIÓN	45
2.1.2	material Y PROCEDIMIENTO	45
2.1.3	resultados	50
2.2	EXPERIMENTO 2	52
2.2.1	INTRODUCCIÓN	52
2.2.2	MATERIAL Y PROCEDIMIENTO	53
2.2.3	resultados	56
2.3	EXPERIMENTO 3	60
2.3.1	INTRODUCCIÓN	60
2.3.2	material Y PROCEDIMIENTO	60
2.3.3	resultados	61
	EXPERIMENTO 4	62
2.3.4	INTRODUCCIÓN	62
2.3.5	material Y PROCEDIMIENTO	63
2.3.6	resultados	63
	Fig. 14. Análisis de la supervivencia. Criterio: latencia media en una sesión <25s.	65
	Fig. 15. Análisis de la supervivencia. Criterio: latencia media en una sesión <15s	66
2.4	EXPERIMENTO 5	68
2.4.1	INTRODUCCIÓN	68

2.4.2	material Y PROCEDIMIENTO	68
2.4.3	resultados	69
Fig. 19.	Análisis de la supervivencia. Criterio: una sesión con media inferior a 25s	70
V.	DISCUSIÓN.....	75

I. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVO GENERAL

1 PLANTEAMIENTO Y OBJETIVO GENERAL

Desde su descubrimiento en 1954 (James Olds and Peter Milner 1954), la autoestimulación eléctrica intracraneal (AEIC) se ha confirmado repetidamente como un tratamiento capaz de facilitar consistentemente la adquisición del aprendizaje y la consolidación de la memoria en una amplia variedad de paradigmas experimentales, tanto de memoria implícita (Coulombe and N White 1980; Coulombe and N. White 1982; D. Redolar-Ripoll et al. 2003; Ruiz-Medina, D. Redolar-Ripoll, et al. 2008) como de memoria explícita (Ramkumar et al. 2008; Ruiz-Medina, I. Morgado-Bernal, et al. 2008; Soriano-Mas et al. 2005), en ratas. Nuestro laboratorio de la Universidad Autónoma de Barcelona ha sido uno de los pioneros en el uso de esta técnica para investigar las bases psicobiológicas de los procesos de aprendizaje y memoria.

Por otro lado, en humanos las enfermedades neurodegenerativas que cursan con deterioro cognitivo afectan cada vez a un porcentaje mayor de la población, consumiendo una parte importante de los recursos sanitarios en los países desarrollados (Hebert et al. 2003). La mayoría de estas enfermedades tiene una etiopatogenia desconocida y carece de tratamiento curativo en la actualidad, por ello una buena parte de estos recursos se destina al tratamiento sintomático de los déficits y alteraciones asociadas a las mismas. En esta línea, una de las técnicas que está ganando terreno como alternativa terapéutica en aquellos casos en que otros tratamientos menos invasivos no son efectivos, es la estimulación eléctrica directa de áreas cerebrales profundas, conocida por las siglas DBS (del inglés *Deep Brain Stimulation*). Su uso es ya habitual en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson y se está extendiendo al tratamiento de otras patologías, como el trastorno obsesivo compulsivo, la enfermedad de Huntington o patologías de tipo afectivo como la depresión mayor (Bewernick et al. 2010; Lozano et al. 2012; Mayberg et al. 2005).

En 2008 un equipo del Toronto Western Hospital and *Research Institute de Toronto*, dirigido por Andrés Lozano (Hamani et al. 2008), implantó un electrodo de DBS en el hipotálamo ventral, como último recurso en el tratamiento de un paciente que padecía obesidad mórbida y que no respondía a tratamientos convencionales. Tras la intervención no se observaron efectos claros sobre el apetito del paciente, pero, para sorpresa del equipo médico, pronto se pusieron de manifiesto una serie de efectos muy llamativos sobre la

memoria. En primer lugar, al encender el estimulador conectado al electrodo y dar inicio a la estimulación eléctrica se activó una memoria lejana y el paciente recordó de forma muy vívida una escena de juventud. Posteriormente, tras mantener activado el estimulador de forma continuada durante varias semanas, se observó una mejora en las puntuaciones en diversos test de memoria verbal y de asociación espacial. Este descubrimiento llevó a la puesta en marcha del primer ensayo clínico en el que la DBS ha sido aplicada a pacientes diagnosticados de Alzheimer con un grado de severidad moderado (Laxton et al. 2010), en un intento por revertir o retrasar la aparición de los déficits de memoria que caracterizan esta enfermedad. Tras 12 meses de estimulación continua a través de electrodos alojados en el fórnix, a su paso por el hipotálamo lateral, no se han observado efectos secundarios negativos. En cuanto a efectos positivos, aún cuando los resultados no son concluyentes, debido a lo limitado de la muestra y a la ausencia de controles *sham* (pacientes a los que se hubiera implantado un electrodo de estimulación pero que no hubieran recibido estimulación eléctrica), parece que la DBS provoca un incremento en el metabolismo de la glucosa en regiones temporales y parietales (disminuido en este tipo de pacientes) a la vez que ralentiza e incluso revierte parcialmente el deterioro cognitivo progresivo, según se infiere de los resultados en distintos tests de memoria.

El equipo de Andrés Lozano en Toronto, ha seguido nuestro trabajo de investigación con AEIC, un tipo de DBS en ratas, poniendo de manifiesto el interés de esta técnica como un procedimiento experimental para la modulación cognitiva y el estudio de sus fundamentos fisiológicos en animales como la rata. De ahí que el tipo de investigación que realizamos en nuestro laboratorio cobre una importancia especial en el ámbito terapéutico y vaya por tanto más allá de lo que significa descubrir las bases neurales del aprendizaje y la consolidación de la memoria. Es por ello que esta vez y como contenido fundamental de esta tesis nos hemos propuesto seguir avanzando en el conocimiento de los cambios que induce la AEIC en el sistema nervioso de los animales y que pudieran relacionarse con sus efectos facilitadores del aprendizaje y la memoria. Es decir, dada la posible aplicación terapéutica en humanos de tratamientos derivados de la experiencia experimental con la AEIC, creemos que es fundamental profundizar en la comprensión de los mecanismos neurales subyacentes a la facilitación de la memoria mediante esta técnica. Esto es especialmente relevante en lo que se refiere a la memoria explícita, la forma de memoria más dramáticamente afectada en muchas de las enfermedades neurodegenerativas mencionadas anteriormente.

En investigación con animales una de las formas de memoria explícita más ampliamente estudiada es la memoria espacial. La facilitación de una tarea de este tipo mediante AEIC ha sido observada previamente en nuestro laboratorio (Ruiz-Medina, I. Morgado-Bernal, et al. 2008). El mecanismo a través del cual la AEIC origina esa facilitación todavía no es conocido, pero podría relacionarse con los cambios morfológicos (complejidad de arborización y densidad de espinas dendríticas) y funcionales (genes, neurotransmisores, neurogenesis) que ese tipo de tratamiento produce en el hipocampo, una estructura del encéfalo de los mamíferos necesaria para la formación de la memoria explícita.

En el presente trabajo hemos querido profundizar en el conocimiento de dichos mecanismos mediante 5 experimentos sucesivos que estudian 1) la persistencia a largo plazo de la memoria facilitada por la AEIC y 2) si los cambios morfológicos que la AEIC induce en el hipocampo de la rata se asocian a la facilitación del aprendizaje y la memoria que también origina. Todo ello en paradigmas de condicionamiento espacial y relacional en el laberinto acuático de Morris (LAM). Para analizar los cambios morfológicos en las neuronas hemos utilizado la técnica más sistemática y consistente actualmente disponible, es decir, la inyección intracelular con amarillo lucifer, con posterior marcaje inmunohistoquímico con 3-3' diaminobencidina (DAB).

II. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES EXPERIMENTALES

1 LA AUTOESTIMULACIÓN ELÉCTRICA INTRACRANEAL

1.1 INTRODUCCIÓN

En 1954 los científicos James Olds y Peter Milner, en la McGill University del Canadá, decidieron estimular eléctricamente el sistema reticular activador ascendente del cerebro de la rata para estudiar su relación con procesos motivacionales. Uno de los electrodos implantados quedó desplazado de su destino, lo que llevó a un descubrimiento que despertó un gran interés entre los neurocientíficos: tras la administración de pequeñas cantidades de corriente eléctrica a través de ese electrodo, la rata mostraba preferencia por el lugar del campo abierto en que se encontraba mientras era estimulada. El hallazgo fue seguido de una serie de experimentos en los que se pusieron de manifiesto algunas de las características más llamativas de este fenómeno. En un laberinto en forma de T se utilizó la corriente para reforzar los giros de la rata en uno u otro sentido. Se observó además que los animales privados de comida preferían permanecer en la región central del laberinto si allí recibían la estimulación que seguir hasta el final del brazo donde había comida. Más tarde se dio a las ratas la posibilidad de autoadministrarse ellas mismas la corriente apretando la palanca de una caja de Skinner. Esto permitía además traducir la fuerza del deseo del animal a frecuencia de respuesta, una variable que podía ser objetivamente medida y observada. En cada sesión los animales se autoestimulaban de forma continuada hasta que se cortaba la corriente y entonces, tras unas cuantas respuestas sin refuerzo, la conducta se extinguía (James Olds and Peter Milner 1954). El fenómeno fue reconocido e identificado como autoestimulación eléctrica intracraneal (AEIC).

La conducta de AEIC no presenta saciedad. Es tan persistente que si no se retira la palanca o se corta la corriente puede mantenerse hasta el punto de que las ratas pueden morir de agotamiento, inanición y falta de sueño. Prefieren además este tipo de refuerzo que el relacionado con motivaciones homeostáticas, como la comida cuando están privadas de ella (Routtenberg and Lindy 1965), el calor en una situación de hipotermia (Carlisle and Ellen Snyder 1970) e incluso el sexo (M E Olds and Fobes 1981; James Olds 1958). Más aún, están dispuestas a sufrir incluso descargas eléctricas en sus patas para poder acceder a la AEIC (James Olds 1958). Podemos decir entonces que la AEIC es un reforzador más

poderoso que los reforzadores naturales. No muestra, por otro lado, ningún signo de conducta adictiva y, como ya hemos dicho, es una conducta fácilmente extinguida (James Olds 1958). La conducta de AEIC se ha observado en todos los vertebrados estudiados: ratas, perros, palomas, peces y primates (Rolls 1975, 1999a), incluido el ser humano (BISHOP et al. 1963), aunque se estudia principalmente en ratas y ratones (Carlezon and Chartoff 2007).

Desde su descubrimiento, la conducta de AEIC ha sido utilizada para estudiar el sustrato nervioso del refuerzo (SNC) en el cerebro de los animales pues desde el principio se pensó que la estimulación eléctrica cerebral reforzante podría activar los mismos circuitos que activaban los refuerzos naturales, como la comida y el sexo (R a Wise 1996). La AEIC se utiliza también para analizar procesos emocionales y cognitivos (Easterling et al. 2000; Ikeda et al. 2001; Nielsen et al. 2000; A.G. Phillips and H.C. Fibiger 1989), particularmente, en nuestro caso, para facilitar procesos de aprendizaje y formación de la memoria, como veremos más adelante.

1.2 MECANISMOS NEURALES DEL REFUERZO POR AEIC

La conducta de AEIC se obtiene implantando los electrodos en diferentes localizaciones encefálicas. En el caso de la rata esas localizaciones conforman la quinta parte del volumen total de su cerebro, pero la región donde se obtiene con más facilidad y potencia es el haz prosencefálico medial (HPM), en su paso por el hipotálamo lateral (HL). Otras áreas de AEIC incluyen regiones rostrales como el córtex prefrontal (CPF) o el bulbo olfatorio (BO) y caudales, como el bulbo raquídeo 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.

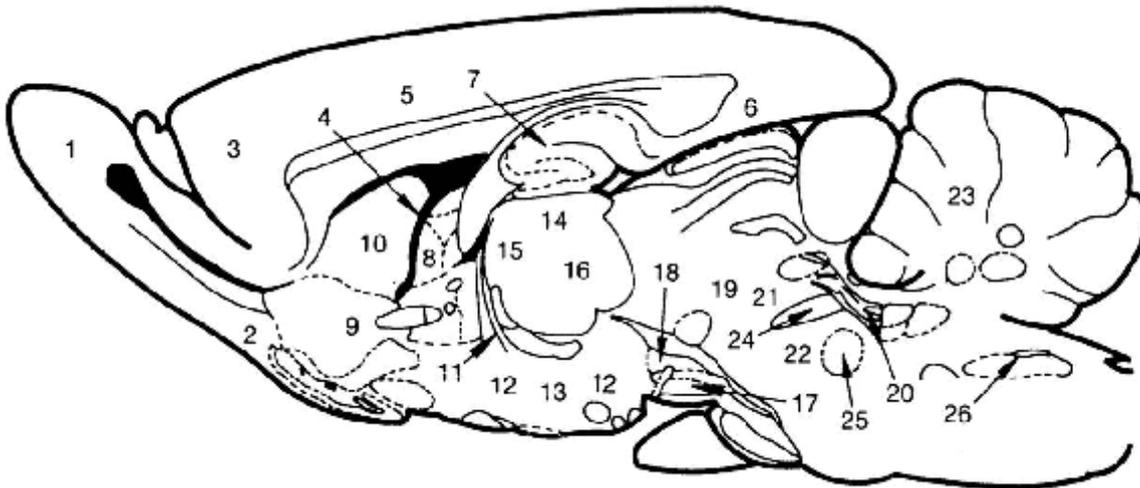


Fig. 1. Resumen de las principales áreas en el cerebro de ratona donde se puede obtener la conducta de AEIC. TELENCÉFALO: 1. Bulbo olfatorio, 2. Córtex prepiriforme, 3. Córtex prefrontal medial, 4. Órgano subfornical, 5. Córtex cingulado, 6. Córtex entorrinal, 7. Hipocampo, 8. Séptum, 9. Núcleo accumbens,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

En la determinación del sustrato neural del refuerzo, inicialmente se supuso que la AEIC era un fenómeno unitario dependiente de un determinado sistema neural, y que sus propiedades eran las mismas con independencia del lugar concreto de estimulación. No obstante, los resultados de experimentos posteriores pusieron de manifiesto que la estimulación reforzante del cerebro era un fenómeno extremadamente complejo que implicaba diferentes sistemas independientes (Peter Milner 1991; Anthony G. Phillips 1984; A.G. Phillips and H.C. Fibiger 1989; Robertson 1989). Actualmente se han identificado 4 sistemas que podrían considerarse como sustratos independientes del refuerzo: el sistema del haz prosencefálico medial (HPM), un circuito originado en el Córtex Prefrontal (CPF), el sistema locomotor mesolímbico-estriatopálido-mesencefálico, y un circuito del cerebro posterior relacionado con la conducta refleja oral gustativa. Describiremos a continuación el sistema del HPM ya que es el que nosotros hemos estimulado en el presente trabajo.

1.2.1 HAZ PROSENCEFÁLICO MEDIAL (HPM)

El HPM está compuesto por un conjunto de axones dispuestos en un eje caudal-rostral, desde el mesencéfalo hasta el prosencéfalo basal (PB). Incluye 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 observado que los axones ascendentes son dopaminérgicos, noradrenérgicos y serotoninérgicos (Nieuwenhuys et al. 1982). Las neuronas noradrenérgicas conectan mayoritariamente estructuras del hemisferio contralateral mientras que las neuronas dopaminérgicas mantienen una posición mayoritariamente ipsilateral (Fuxe et al. 1985). Las proyecciones descendentes son básicamente de naturaleza dopaminérgica, y parecen muy relacionadas con la producción del propio efecto reforzante (Roy A. Wise 1980; R a Wise 1996).

Los axones descendentes se originan principalmente en el área septal, el hipocampo, la banda diagonal de Broca (BDB) y las células circundantes de los islotes de Calleja (A.G. Phillips and H.C. Fibiger 1989), y, en menor proporción en el neostriado, el núcleo accumbens (Acc), el córtex piriforme el córtex olfatorio, el córtex orbitofrontal, el núcleo del lecho de la estría terminal (BST), la sustancia innominata (SI), el núcleo dorsomedial del hipotálamo y los núcleos dorsomedial y paraventricular del tálamo (J.R. Stellar and E. Stellar 1985; Rompre and Miliareisis 1985). La mayoría de los fascículos descendentes convergen en el área preóptica del hipotálamo (AP) y en el HL (A.G. Phillips and H.C. Fibiger 1989), proyectando también en el área tegmental ventral (ATV) (Fuxe et al. 1985) y, de forma más reducida, en 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 los centros autónomos preganglionares del bulbo y la médula espinal.

La estimulación del HL y del ATV a lo largo del HPM resulta altamente reforzante y es donde esta conducta presenta tasas de respuestas más altas y con mayor estabilidad a lo largo del tiempo (Rolls 1975; Ikemoto and Panksepp 1999). Todo indica que el circuito neuroanatómico responsable de la AEIC en el HPM se origina en el área preóptica medial (APM) y en el HL. Las neuronas de estos núcleos hipotalámicos envían axones que sinaptan con las del área tegmental ventral del mesencéfalo (ATV), que a su vez, envían axones dopaminérgicos que ascienden hasta el núcleo accumbens en el prosencéfalo basal

(Yeomans 1990). Se trata, en definitiva del conocido como sistema mesolímbico dopaminérgico (figura 2).

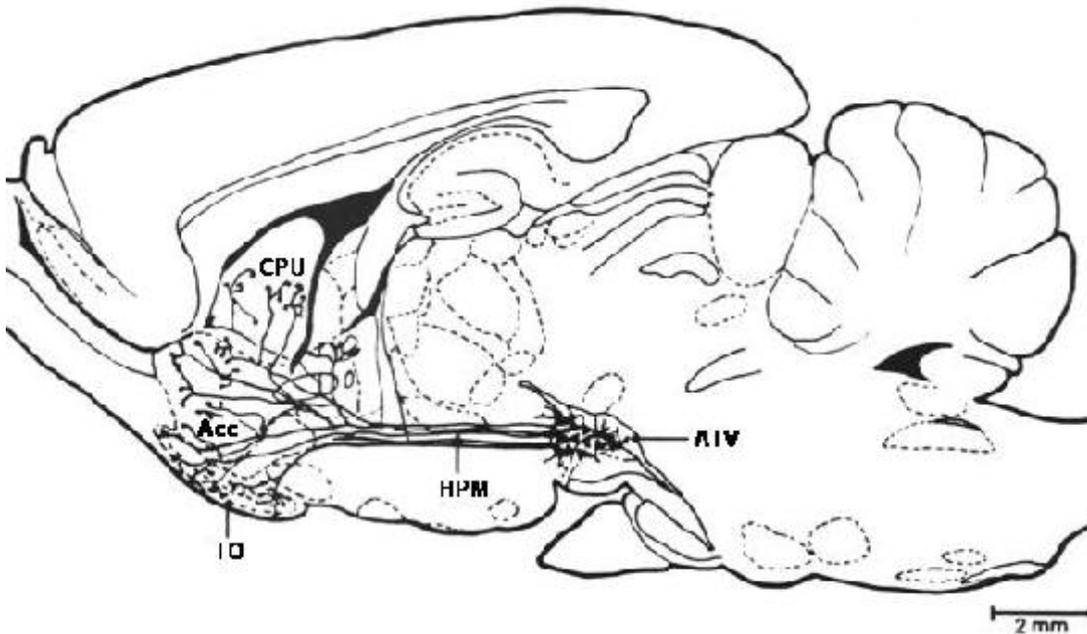


Fig. 2. Sistema mesolímbico dopaminérgico. Acc: núcleo accumbens; ATV: área tegmental ventral; CPU: complejo caudado-putamen; HPM: haz prosencefálico medial; TO: tubérculo olfatorio. Adaptado de Yeomans (1990).

1.3 NEUROQUÍMICA DEL REFUERZO POR AEIC: EL PAPEL DE LA DOPAMINA Y OTROS NEUROTRANSMISORES

La mayoría de localizaciones mesencefálicas donde se obtienen tasas estables de AEIC coinciden con estructuras neuronales dopaminérgicas o con sus proyecciones telencefálicas (Dale Corbett and Roy A. Wise 1980; Crow 1972; A.G. Phillips and H.C. Fibiger 1989), por lo que se ha sugerido la implicación de la dopamina (DA) en los efectos reforzantes generados por la estimulación eléctrica del HPM (Ikemoto and Panksepp 1999; Nakahara et al. 2000; R.A. Wise and M.A. Bozarth 1982; R A Wise 1996; R a Wise 1996; Roy A. Wise and Michael A. Bozarth 1984). Además, la estimulación eléctrica reforzante del HPM incrementa los niveles de DA en el núcleo Acc, tanto si los animales se autoadministran la corriente estimulante (Blaha and Anthony G. Phillips 1990; A. G. Phillips et al. 1992; Rada et al. 1998; Taber and H C Fibiger 1995) como si es el experimentador el que se la administra (Gratton et al. 1988; Luis Hernandez and Bartley G. Hoebel 1988; Rada et al. 1998). Más aún, se ha

podido comprobar que las lesiones selectivas de las neuronas dopaminérgicas disminuyen la conducta de AEIC (H C Fibiger and Jakubovic 1987; A.G. Phillips and H.C. Fibiger 1989) y que la manipulación farmacológica de la neurotransmisión dopaminérgica tiene efectos significativos sobre la misma (Dale Corbett 1990; Fouriezos and Roy A. Wise). Así, los agonistas y antagonistas dopaminérgicos, respectivamente, facilitan y deterioran la conducta de AEIC del HPM (Colle and Roy A. Wise 1988; Mogenson et al. 1979; James R. Stellar and Dale Corbett 1989; J R Stellar et al. 1983).

Otros trabajos han estudiado los diferentes tipos de receptores para la DA y su relación con los sistemas de refuerzo cerebral. Se ha visto que los receptores D_1 y D_2 pueden estar implicados de diferente manera en la AEIC del HL y del ATV. Mientras que la administración de antagonistas D_1 en el Acc facilita la conducta de AEIC del HL y del ATV, la activación de los receptores D_2 tiene efectos opuestos (Singh et al. 1997). En general, parece existir una relación positiva entre la transmisión dopaminérgica, en especial la relacionada con los receptores D_1 y el efecto reforzante.

Como consecuencia de todo ello, 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. Esta hipótesis es respaldada por los resultados de diferentes estudios farmacológicos que muestran que la autoadministración de drogas psicoestimulantes adictivas como la amfetamina o la cocaína, además de incrementar la liberación de DA en el núcleo accumbens (Di Chiara et al. 1995; G. F. Koob 1997; R A Wise 1996), aumentan también de forma paralela la tasa de AEIC (Blaha and Anthony G. Phillips 1990; Peter Milner 1991; Rolls 1999b; Colle and Roy A. Wise 1988). Otros trabajos experimentales apoyan 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 (A. G. Phillips et al. 1992; Graybiel 1990; Hope et al. 1992; G F Koob and Bloom 1988; Norman et al. 1993; Persico et al. 1993).

No obstante, existen también resultados experimentales que han cuestionan el papel crítico de la DA en los efectos reforzantes de la AEIC. Por ejemplo, se ha obtenido conducta de AEIC con estímulos eléctricos que no activan axones dopaminérgicos (Murray and Shizgal 1994) o en condiciones en las que no se ha observado una liberación continua de DA (Garris et al. 1999; Giovanni Hernandez et al. 2006). En esta línea, trabajos de microdiálisis *in vivo* (Garris et al. 1999; M.R Kilpatrick et al. 2000) han mostrado que la liberación de DA se produce durante los ensayos iniciales de AEIC, atenuándose de forma

progresiva con la autoestimulación 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 et al. 1996).

En otros experimentos se ha observado también que las neuronas dopaminérgicas del HPM se activan ante estímulos salientes y no específicamente reforzantes (Berridge and Robinson 1998; McClure et al. 2003; P Read Montague 1996; W Schultz et al. 1997; W Schultz 1998; Wolfram Schultz 2000). 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 and Botterblom 1996; Horvitz et al. 1997; Ljungberg et al. 1992; Owesson-White et al. 2008), 2) los estímulos aversivos incrementan la tasa de respuesta de una parte (3-49 %) de neuronas putativas dopaminérgicas (Guarraci and Kapp 1999; Mantz et al. 1989; W Schultz and Romo 1987) y 3. la liberación de DA aumenta lentamente tras la presentación de estímulos aversivos (Horger and Roth 1996). Un trabajo de Nelly 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 (Neill et al. 2002).

En los últimos años, otros trabajos experimentales han intentado relacionar el efecto reforzante producido por la AEIC con otros sistemas de neurotransmisión diferentes al dopaminérgico. Entre ellos están los que relacionan con el glutamato (Bespalov and Zvartau 1997; Segal et al. 1995). 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 and Roy A. Wise 1993; Herberg and Rose 1989). Herberg y Rose (1990) han mostrado también que la infusión en el ATV de un antagonista específico del receptor NMDA, el 2-AP5, no modifica la AEIC del HPM, sin embargo las microinyecciones de NMDA en esta misma área disminuyen la AEIC de forma significativa (Herberg and Rose 1990). Por tanto, se ha sugerido que 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 con períodos refractarios que entran dentro del rango determinado para las fibras directamente estimuladas por la AEIC en ese haz (Lassen et al. 2007; S C Steffensen et al. 1998). Además, su tasa de respuesta aumenta con la AEIC en el HPM (S C

Steffensen et al. 2001; Lassen et al. 2007) y 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 et al. 2001). Otros resultados han mostrado que 1) que la administración de antagonistas gabaérgicos disminuye las tasas de respuesta de AEIC del HPM y aumenta los umbrales de la misma (Macey et al. 2001; Singh et al. 1997; Willick 1995) y 2) que la AEIC del HPM incrementa la expresión de la proteína *Fos* en diferentes grupos de células gabaérgicas del tronco del encéfalo (Nakahara et al. 2000; Ishida et al. 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 (S C Steffensen et al. 1998).

En conclusión, aunque la idea de que la DA es el neurotransmisor crítico para el efecto reforzante de la AEIC ha sido ampliamente confirmada en numerosos trabajos experimentales, no podemos descartar la participación en el mismo de otros sistemas de neurotransmisión, como el glutamatérgico, el gabaérgico y el opioide.

2 LA MEMORIA ESPACIAL

2.1 INTRODUCCIÓN

La memoria espacial es un componente fundamental de la memoria episódica , aquella que se refiere a hechos que tuvieron lugar en un determinado tiempo y espacio. A su vez, la memoria episódica forma parte de la llamada memoria declarativa. Los sistemas cerebrales de procesamiento de la información espacial utilizan al menos dos estrategias diferentes. La primera, denominada egocéntrica, se basa en información sobre la orientación del propio cuerpo en el espacio y no depende de señales externas. La segunda, denominada allocéntrica, se basa en el espacio exterior y depende por tanto de señales externas. En el procesamiento espacial podemos distinguir además la memoria a corto plazo o de trabajo, que almacena una cantidad limitada de información, y la memoria a largo plazo,.

Uno de los instrumentos más utilizados en la evaluación, características y mecanismos neuronales de la memoria espacial es el laberinto acuático de Morris (LAM).

2.2 NEUROANATOMÍA DEL APRENDIZAJE ESPACIAL

El hipocampo es una estructura críticamente implicada en el procesamiento y la memoria de información espacial y contextual. El hipocampo de la rata contiene células especiales, llamadas células de lugar (*place cells*), las cuales se activan específicamente cuando el animal se encuentra en una localización precisa de un ambiente particular. Su hallazgo (O'Keefe and Dostrovsky 1971) hizo que, en 1978, O'Keefe y Nadel (O'Keefe and Nadel 1978) 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, el animal, gracias a su hipocampo, podría establecer una representación cerebral de las relaciones espaciales de su entorno apreciando distancias y relaciones entre estímulos. Los resultados de experimentos con animales en el LAM apoyan 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. Estudios mediante un simulador virtual del laberinto acuático (Astur et al. 2002) han puesto también de manifiesto que, en humanos, la lesión de esta estructura provoca graves déficits de orientación espacial.

La implicación del sistema hipocampal en la formación de asociaciones o representaciones complejas entre estímulos (Eichenbaum et al. 1999; D'Hooge and De Deyn 2001) resulta avalada no sólo por estudios conductuales, sino también por experimentos neuroanatómicos y neurofisiológicos que muestran cómo el hipocampo integra funcionalmente 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 et al. 2006; Kessels et al. 2001). Quizás por ello, el LAM resulta un instrumento particularmente sensible a los efectos de las lesiones hipocampales, en ratas (B L McNaughton et al. 1996; R Morris 1984; B Poucet et al. 2000). 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 (ver sobre el LAM más adelante). Además, las ratas con lesión hipocampal son capaces de localizar la plataforma escondida si ésta se encuentra siempre a la misma distancia y dirección de una clave visible (Pearce et al. 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 (E Moser et al. 1993). 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 and Holland 1992) o una tarea de discriminación basada en la aversión al gusto (Skinner et al. 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 et al. 2007). 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 et al. 2007). 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.

2.2.1 OTRAS ESTRUCTURAS IMPLICADAS EN EL APRENDIZAJE ESPACIAL

Diferentes trabajos han puesto de manifiesto que el mecanismo neurobiológico subyacente al aprendizaje espacial podría implicar la acción coordinada del hipocampo con otras estructuras cerebrales constituyendo una red neural funcionalmente integrada.

McNaughton, Leonard y Chen (1989) descubrieron unas células en el córtex 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 el córtex 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 el córtex parietal con las proximales (Cressant et al. 1997). La contribución de el córtex parietal al procesamiento de la información espacial podría depender del grado de funcionalidad del hipocampo (Thinus-Blanc et al. 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 córtex parietal, presentan déficits en la adquisición del aprendizaje en el LAM (Mogensen et al. 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 and Bruno Poucet 1995; Mogensen et al. 1995).

Por otro lado, se ha visto también que las lesiones del núcleo accumbens, que actúa como una especie de «puente» entre los sistema límbico y motor (Ploeger et al. 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). Las lesiones cerebelosas deterioran también la ejecución en el laberinto de agua, sugiriendo su implicación en los aspectos procedimentales de la tarea (D'Hooge and De Deyn 2001). Finalmente, otra región cerebral como el tálamo participaría en el aprendizaje espacial actuando como principal estación de relevo (Conway 1998).

2.3 SISTEMAS DE NEUROTRANSMISIÓN Y APRENDIZAJE ESPACIAL

Aunque se han estudiado diversos sistemas de neurotransmisión en relación con el aprendizaje y la memoria espaciales, el glutamato y la acetilcolina han sido los más investigados (Myhrer 2003). 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 (Robert K. McNamara and Ronald W. Skelton 1993; Rison and Stanton 1995). 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 et al. 1990; Wesierska et al. 1990). Muy pronto Morris mostró que el AP5 (antagonista de los NMDA-r) bloqueaba la LTP (dependiente de NMDA) en el GD e impedía el aprendizaje espacial en el LAM. Además, la PLP en la mayoría de las sinapsis del hipocampo depende de la actividad de dichos receptores (D P Cain 1998). Cain y sus colaboradores a lo largo de diferentes estudios (1997; 1997; 1996), mostraron que los antagonistas NMDA deterioran la ejecución en el LAM a través de la inducción de defectos sensoriomotores e hiperactividad más que a través de déficits en el aprendizaje espacial propiamente dichos. Aunque en el caso del glutamato también hay estudios que apuntan a una participación más controvertida de este neurotransmisor en el aprendizaje espacial, siendo posible que su actividad no sea siempre esencial (Holscher and Hölscher 1999). Como se ha dicho, estos dos neurotransmisores son los más claramente implicados en este tipo de procesamiento cognitivo. Sin embargo no se puede descartar la participación de otros sistemas de neurotransmisión, como el GABA (Robert K. McNamara and Ronald W. Skelton 1993), el de las aminas biogénicas (Hatfield and McGaugh 1999; Ploeger et al. 1994; R K McNamara and R W Skelton 1991) o el de los neuropéptidos (Fitzgerald and Dokla 1989; Itoh et al. 1994).

3 EL LABERINTO ACUÁTICO DE MORRIS

3.1 INTRODUCCIÓN

El laberinto acuático de Morris (LAM) consiste en una piscina circular llena de agua en la que los animales, generalmente ratas o ratones, tienen que nadar hasta encontrar una plataforma ligeramente sumergida sobre la que acaban situándose para evitar seguir nadando. La temperatura del agua oscila entre 18 y 27 °C, lo que hace que los animales quieran escapar sin sentirse tan estresados como para que se inhiba su conducta de búsqueda de la plataforma. El aprendizaje se mide a partir de la latencia de escape, es decir, el tiempo que la rata tarda en encontrar la plataforma en cada ensayo de entrenamiento. Una menor latencia se interpreta como un mayor aprendizaje. El agua puede hacerse opaca con leche o alguna sustancia no tóxica para que el animal no vea la plataforma, aunque se ha demostrado que eso no es necesario ya que el animal nada con la cabeza por encima del agua, lo que le impide ver la plataforma. El entorno del LAM suele ser rico en referencias ambientales, llamadas claves espaciales (luces, cajas, muñecos, cepillos de dientes, etc), que ayudan a los animales a orientarse espacialmente en su búsqueda de la plataforma. Ello permite ejecutar desde tareas simples a complicados protocolos de entrenamiento que implican mecanismos también diferentes de navegación, aprendizaje y memoria.

El LAM es actualmente una de las pruebas más utilizadas en neurociencia de la conducta, particularmente para el estudio de los procesos de aprendizaje y memoria espacial. Fue desarrollado por Richard G.M. Morris en 1981, en la Universidad escocesa de St Andrews. La observación de grandes tanques que albergaban diferentes criaturas marinas indujo a Morris a pensar en la posibilidad de utilizar un tanque de agua a modo de "laberinto", para estudiar la navegación espacial y la función de las entonces recientemente descubiertas células de lugar (ver más arriba, en el apartado de Memoria espacial). El LAM fue descrito por primera vez en dos publicaciones a principios de los años 80. En los años siguientes la prueba se hizo popular en gran parte por el trabajo alimentado de rivalidad entre el grupo escocés y otro canadiense dirigido por Ian Whishaw, Bryan Kolb y Robert Sutherland (Bryan Kolb et al. 1982, 1983, 1984). Aunque a menudo se habla del LAM como de una tarea no se trata más que de un instrumento muy sencillo en el que pueden llevarse

a cabo múltiples tareas. Tampoco se trata de un laberinto en el sentido convencional, aunque lo es en tanto que el animal ha de buscar un objetivo relativamente pequeño y oculto, la plataforma, como única salida . Su sensibilidad a diferentes manipulaciones experimentales ha hecho que las tareas posibles en el LAM sean incluidas en baterías de pruebas conductuales como herramienta para evaluar el impacto de diferentes alteraciones del sistema nervioso (daño cerebral, envejecimiento, neurodegeneración) o de nuevas drogas terapéuticas. Sin duda, una de las razones de su éxito es su relativa simplicidad y el hecho de que evita muchos de los problemas generados por los estímulos o señales olfativas que se acumulan en los laberintos de brazos tradicionales.

3.2 CONSIDERACIONES METODOLÓGICAS

Los estudios realizados en el LAM han puesto de manifiesto que la ejecución de los sujetos puede verse afectada por diversos factores, como son el peso, el desarrollo físico, la edad, el género y la especie o cepa de los animales. Además, algunos estudios han demostrado que el aprendizaje espacial puede verse severamente afectado en animales estresados, enfermos, desnutridos o viejos. Asimismo la experiencia previa de aprendizajes de distinto tipo también puede modificar la velocidad de adquisición de una nueva tarea espacial en el LAM. A continuación pasamos a hacer una breve revisión del protocolo básico de entrenamiento y algunas de las variaciones y procedimientos de control más habituales así como de las variables de medición que se toman en consideración con más frecuencia.

3.2.1 PROTOCOLO ESTÁNDAR DE ENTRENAMIENTO

El protocolo básico de aprendizaje es el de memoria referencial: con una plataforma escondida, en posición fija respecto de las pistas de la habitación; los animales son introducidos en el agua, de cara a la pared del tanque, desde diferentes puntos de entrada, y progresivamente van teniendo latencias más bajas y trayectorias más directas hacia la plataforma .

En la mayoría de los estudios conductuales podemos distinguir tres fases del aprendizaje: la de habituación a la piscina, la de adquisición y la de retención de la respuesta. A esta última se le llama también prueba o test de retención. En la fase de habituación se introduce al animal en la piscina y se le deja nadar libremente durante 60-120

segundos. Se ejecutan así varios ensayos con la plataforma en su posición de sumergida pero sin que las claves espaciales estén presentes. De ese modo 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 en el agua de igual manera que en la fase de habituación y se le deja nadar libremente durante unos 60-120 segundos para que busque la plataforma. En estos ensayos las claves que le permiten orientarse en el espacio están presentes. Se considera que el sujeto ha encontrado la plataforma cuando permanece en ella al menos unos 5 o 10 segundos. En caso de no encontrarla, el animal es guiado por el experimentador hacia la plataforma donde se le ayuda a subir y se le deja en ella unos 30 segundos. Después, 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 sesiones de 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 un ensayo de prueba o test de retención en el que se retira la plataforma de la piscina. En este ensayo se permite al animal nadar, típicamente durante 60 segundos, y se registran distintas variables. 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, mostrará una trayectoria centrada en el emplazamiento previo de la plataforma.

Durante los ensayos de entrenamiento las ratas pueden usar básicamente 3 estrategias diferentes de nado para alcanzar la plataforma (Brandeis et al. 2009). 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). Además de visuales, las claves pueden ser también olfativas. Las ratas Sprague-Dawley son capaces de usar trazas de olor para localizar la plataforma en un LAM (Means et al. 1992). Además, como han demostrado Dalm y colaboradores (2000), un animal podría utilizar tanto estrategias práxicas como claves espaciales para localizar la plataforma incluso cuando las posiciones de salida del animal sean aleatorias.

3.2.2 EL ENSAYO DE PRUEBA

Una disminución de la latencia de escape pueden ser debida de la adopción por parte de la rata de estrategias no espaciales, como nadar en círculos concéntricos a cierta distancia de la pared hasta hallar la plataforma (Maei et al. 2009). Incluso las ratas ciegas pueden mostrar disminuciones notables en la latencia de escape durante la fase de entrenamiento . Por ello, para discriminar entre estrategias espaciales y no espaciales, generalmente se lleva a cabo el que hemos denominado ensayo de prueba, que consiste en retirar la plataforma para comprobar si las ratas cuando nadan la buscan en el cuadrante del LAM donde debería estar según el entrenamiento precedente. Ese cuadrante se denomina cuadrante objetivo. Sólo los animales que durante el entrenamiento han utilizado una estrategia espacial centrarán su búsqueda cerca de la localización habitual de la plataforma. Una de las incorporaciones tecnológicas del LAM es la plataforma elevable , que permanece en el fondo de la piscina y sólo asciende al nivel en que es asequible al animal si este permanece nadando sobre ella durante un lapso de tiempo previamente estipulado (de varios segundos, normalmente). De esta forma se descarta una reducción de las latencias de escape que no responda al uso de una estrategia espacial.

En algunos protocolos se administran varios ensayos de prueba a lo largo de la fase de entrenamiento con el fin de conocer la evolución del proceso de consolidación de la memoria, ya que esos ensayos permiten visualizar la emergencia progresiva de la preferencia de la rata por el cuadrante objetivo a lo largo de las sesiones y días de entrenamiento . No obstante, estos ensayos pueden originar extinción de la respuesta aprendida y enlentecer el condicionamiento de la misma.

3.2.3 PROCEDIMIENTOS DE CONTROL HABITUALES

Dado el amplio rango de efectos que tienen muchas de las intervenciones que se llevan a cabo en estudios que utilizan el LAM, es fundamental en muchos casos llevar a cabo los controles adecuados para descartar que una pobre ejecución pueda deberse a problemas sensoriales, de coordinación motora o de motivación en lugar de a déficit en el aprendizaje . En ese sentido pueden resultar útiles procedimientos como, por ejemplo, evaluar previamente la capacidad de nado de los animales en un canal recto de agua , o hacer pruebas previas sin claves contextuales y con la plataforma claramente visible . La velocidad de nado es una variable valiosa ya que nos informa tanto de la capacidad de nado de los animales como de su motivación por escapar de la piscina. También conviene controlar

variables como el nivel de tigmotaxis, es decir, el nado del animal en torno a las paredes de la piscina sin alejarse de ellas, lo que puede significar que no asume debidamente la resolución de la tarea. Así mismo la presencia en fases avanzadas del entrenamiento de conductas extrañas en el grupo experimental, como, por ejemplo, encontrar la plataforma pero no subir a ella o saltar desde ella de nuevo al agua, pueden informar de déficits o alteraciones no relacionados con la capacidad de aprendizaje espacial. El propio ensayo de prueba es en sí mismo, como se ha dicho, una medida de control del nivel de aprendizaje conseguido en las sesiones de entrenamiento.

3.2.4 VARIACIONES SOBRE EL PROTOCOLO BÁSICO

El protocolo básico de entrenamiento puede incluir también una prueba *reversal* adicional en la que la plataforma se traslada a otro cuadrante, generalmente el opuesto al de los ensayos de entrenamiento, sin variar nada el escenario general de la piscina. Esta prueba mide la evolución de las latencias de escape cuando el animal aprende la nueva localización de la plataforma y nos informa de la habilidad genérica que el animal ha adquirido con el entrenamiento precedente para realizar este tipo de aprendizaje (Wenk 2004). La prueba de *reversal* se ha realizado también reduciendo el tamaño de la plataforma. Algunos estudios utilizan protocolos más complejos que incluyen sucesivas fases de entrenamiento variando la posición de la plataforma en cada una de ellas, memoria de trabajo, pruebas de equiparación con la muestra, uso de varias plataformas y/o protocolos mixtos de adquisición y retención (Brandeis et al. 2009; Richard Morris 2008).

3.2.5 PARÁMETROS ANALIZADOS

La medida de aprendizaje más utilizada en los ensayos de adquisición es la latencia de escape de los animales, ya que es una variable poco sensible a los cambios ambientales (Crabbe 1999). Durante el ensayo de prueba se pueden valorar además distintos parámetros: exactitud del ángulo de la cabeza, porcentaje del camino recorrido en el cuadrante de entrenamiento o número de cruzamientos sobre el lugar donde se localizaba habitualmente la plataforma. Maei et al. (2009) revisaron un amplio número de estudios que utilizaban el LAM y observaron que en la mayoría de ellos se analizaba la proporción de tiempo en el cuadrante en que estaba la plataforma, variable que ya había sido presentada por Morris en 1981 (G M Morris 1981). El resto de estudios (un 18%) combinaban esa proporción con el número de cruzamientos sobre el lugar donde se localizaba habitualmente

la plataforma, o utilizan esta última en solitario (8%). Mediante este y otros estudios, los mismos investigadores llegaron a la conclusión de que la medida más discriminativa de aprendizaje es la distancia media al objetivo o lugar de la plataforma. Posteriormente propusieron una nueva medida consistente en un complejo cálculo matemático del nivel de entropía de la trayectoria y concluyeron que era la más discriminativa de todas las probadas.

4 MEMORIA Y MICROESTRUCTURA EN EL HIPOCAMPO

4.1 BASES NEURALES DE LA MEMORIA

Junto a la selección natural, el aprendizaje y la memoria son el principal medio a través del cual los seres vivos se adaptan a un medio cambiante e incierto. El aprendizaje es uno de los procesos clave a través del cual la experiencia produce cambios duraderos en el sistema nervioso que se expresan en la conducta del organismo. La memoria es el fenómeno habitualmente inferido de tales cambios (I. Morgado-Bernal 2011).

El estudio de los procesos de aprendizaje y consolidación de memoria se ha valido de distinto tipo de tareas para revelar una serie de principios generales que se aplican a múltiples especies, incluidos los humanos. Gran parte de estos estudios se han llevado a cabo en el hipocampo por tratarse de una estructura fundamental en la memoria declarativa, cuya red de conexiones se conoce bien y que permite además una gran versatilidad experimental. Sobre esta estructura, por ejemplo, se han centrado principalmente los estudios de potenciación a largo plazo (PLP), el fenómeno descubierto en 1973 por Terje Lømo y Timothy Bliss (Bliss and Lomo 1973), y que es el modelo más estudiado de plasticidad sináptica. La PLP (o su inversa, la depresión a largo plazo) es una forma de plasticidad sináptica que se piensa pone en juego los mismos mecanismos celulares que son responsables de la formación de la memoria, por lo que su estudio y el de los cambios moleculares y estructurales involucrados en este fenómeno ha sido objeto de un amplio estudio.

La plasticidad en el hipocampo depende de las espinas dendríticas, unas pequeñas protusiones protoplasmáticas que son el lugar sobre el que se producen la mayor parte de los contactos excitatorios en el cerebro de los vertebrados. Las espinas dendríticas recubren los árboles dendríticos de las principales neuronas en la mayoría de regiones cerebrales. Las encontramos, por ejemplo, en las neuronas piramidales del córtex, las neuronas medias espinosas de los ganglios basales, las neuronas granulares del hipocampo o las neuronas de Purkinje, en el cerebelo. Fueron observadas ya en el siglo XIX y, cuando muchos creían que no eran más que artefactos resultantes del método de tinción de Golgi, Santiago Ramón y Cajal tuvo la intuición de que podrían jugar un papel esencial como base de la memoria (Javier DeFelipe 2006).

A pesar de su pequeño tamaño, las espinas dendríticas tienen una estructura enormemente compleja, habiéndose identificado más de 70 familias de moléculas que son específicas de estos apéndices dendríticos (Zhang and Benson 2000). Se trata de la estructura más rica en actina del cerebro (H. Kasai, Fukuda, et al. 2010) y, como hemos dicho antes, constituye el principal lugar de input excitatorio del córtex. Esencialmente, cada espina dendrítica forma una sinapsis con un botón terminal (J I Arellano, Espinosa, et al. 2007), aunque también hay un pequeño porcentaje de botones y espinas que no forman sinapsis, y algunos botones terminales que participan en más de una sinapsis (Holtmaat and K. Svoboda 2009; Hering and Sheng 2001). En las neuronas piramidales del hipocampo, por ejemplo, la relación entre espinas y sinapsis es de 1:1, de modo que la densidad de espinas es un buen indicador de la densidad sináptica (Alvarez and B. L. Sabatini 2007). La densidad de espinas es variable y depende de la región, el tipo celular y la especie. En humanos se estima que sólo en la arborización basal de las neuronas piramidales de la capa III del córtex frontal existen aproximadamente unas 15.000 espinas (G N Elston et al. 2001).

Las espinas dendríticas se observan alteradas en muchas de las patologías que cursan con afectación cognitiva. En muchos casos esto se traduce en una disminución del número y en formas inmaduras (von Bohlen Und Halbach 2009; Hering and Sheng 2001), como ocurre en la depresión mayor, la epilepsia, el síndrome de frágil X, el síndrome de Down y otras formas de retraso mental (H. Kasai, Fukuda, et al. 2010).

En el hipocampo, particularmente en las neuronas piramidales de CA1, se ha puesto de manifiesto que ciertos tipos de aprendizaje, junto a formas artificiales como la PLP, pueden producir un incremento en las espinas dendríticas o cambios en su morfología (Geinisman 2000; Leuner et al. 2003; Nimchinsky et al. 2002; Rafael Yuste and Tobias Bonhoeffer 2004) dando lugar a nuevas sinapsis o fortaleciendo las sinapsis preexistentes. Estos cambios parecen depender de la experiencia y reflejar cambios en la fuerza de la transmisión sináptica (von Bohlen Und Halbach 2009), lo que ha llevado a pensar en las espinas como en un buen candidato para el sustrato físico de la memoria (Haruo Kasai, Hayama, et al. 2010). Las espinas, a la vez que presentan un gran dinamismo, pueden persistir durante días en cortes hipocampales en cultivo y durante años en el córtex in vivo, lo que fundamenta la idea de que la plasticidad estructural es el mecanismo celular central que está detrás de la formación de la memoria (Haruo Kasai, Hayama, et al. 2010).

Se ha comprobado que la activación de sinapsis relevantes (para una revisión ver Morgado-Bernal 2011) puede generar, en el intervalo de milisegundos, una liberación presináptica de glutamato que activa receptores AMPA (alfa-amino-3-hidroxy-5-metil-4-isoxazole propionic acid) produciendo un influjo de Na⁺ que despolariza la neurona

postsináptica. Esta despolarización hace que los receptores de coincidencia asociativa NMDA (N-metil-D-aspartato) se liberen de los iones de Mg^{+} que los bloquean, produciéndose un fuerte influjo postsináptico de Ca^{2+} a través de los canales de esos receptores y de otros ligados a receptores de glutamato dependientes de voltaje. Esta entrada masiva de Ca^{2+} activa sucesivamente diferentes proteínquinas (Ca^{2+} /Calmodulina Proteína Kinasa, CaMKs, Proteín Kinasa Calcio-Fosfolípido dependiente, PKC, Kinasa regulada por señales extracelulares, ERK, entre otras) que, modulando determinados sustratos, ponen en marcha distintos procesos. Por un lado la unión del Ca^{2+} intracelular al sensor de calcio calmodulina (CaM) y la activación por este complejo (Ca^{2+} -CaM) de diferentes calmodulina-quinasas resulta en la inducción de cambios morfológicos en el citoesqueleto de la neurona, afectando a la complejidad de la arborización dendrítica, el surgimiento de nuevas espinas dendríticas o el alargamiento de otras preexistentes. Por otro lado se activan factores de transcripción de ARNm y síntesis de proteínas receptoras AMPA, las cuales migran hacia los lugares modificados y, en el plazo de horas, se insertan en la membrana y contribuyen a la estabilización de los cambios habidos en el citoesqueleto de la neurona postsináptica (Lamprecht and LeDoux 2004). El influjo de Ca^{2+} además activa la proteína regulada por calcio y de base actínica miosina Vb, que captura y moviliza endosomas de reciclado que aportan receptores AMPA y membrana plasmática extra. De esta forma se produce el anclaje de nuevos receptores AMPA a la membrana postsináptica y el crecimiento de la espina, y nos provee de un enlace mecánico entre la inducción y la expresión de plasticidad postsináptica (Wang et al. 2008). La inserción de los receptores AMPA se produce en la densidad postsináptica (PSD), uno de los componentes principales de la espina. Se trata de una estructura de gran complejidad que contiene una gran variedad de moléculas cuyo rol específico aun no es del todo conocido (von Bohlen Und Halbach 2009). La densidad postsináptica ocupa aproximadamente el 10% de la superficie de la espina y está alineada con precisión respecto de la zona activa presináptica, y aunque en la mayor parte de las espinas la PSD es continua, en algunas se observa perforada (Hering and Sheng 2001). Esta inserción de receptores AMPA en la PSD parece fundamental en el proceso de estabilización de la dinámica de la espina. Una vez insertados, la activación de estos receptores disminuye la motilidad de la espina y estabiliza su forma (Fischer et al. 2000). A través de esta sucesión de complejas cascadas moleculares resulta sorprendente la celeridad con la que el aprendizaje puede provocar cambios morfológicos y funcionales en las sinapsis y, por tanto en el sistema nervioso.

Trabajos recientes muestran, asimismo, que en los cambios del citoesqueleto que acabamos de mencionar parecen desempeñar un papel crítico las Rho GTPasas, enzimas también implicadas en los cambios morfológicos de dendritas y axones durante el desarrollo

embriológico del SN. Estas enzimas se sitúan en el centro de la compleja cascada molecular postsináptica que se desencadena durante la PLP. Pueden activarse o desactivarse por las diferentes señales moleculares que tienen su origen en la membrana postsináptica y, a su vez, mediante otras señales moleculares activadoras y desactivadoras, controlan la polimerización de la actina, proteína esta última implicada críticamente en los cambios estructurales del citoesqueleto. La actina, además de proporcionar un andamiaje para las sinapsis, presenta un equilibrio entre dos formas moleculares (F y G) que determinan el tamaño de las espinas dendríticas. En el hipocampo de la rata, la estimulación eléctrica de alta frecuencia (tetánicas) derivan el equilibrio hacia la forma F, lo que alarga las dendritas e incrementa la zona de ligamiento postsináptico. Las bajas frecuencias de estimulación tienen el efecto contrario, derivando el equilibrio hacia la forma G y disminuyendo la longitud de las espinas, por lo que el mecanismo de plasticidad parece ser bidireccional (Okamoto et al. 2004). En definitiva, para establecer el aprendizaje, el SN utiliza parte de los mismos mecanismos que conforman la estructura básica de las neuronas durante el desarrollo embrionario. La activación de los receptores NMDA promueve la dinámica de la actina y los consecuentes cambios morfológicos en el citoesqueleto que, estabilizados posteriormente por la inducción de nuevos receptores AMPA que se insertan en la membrana, mantienen la PLP y hacen posible la consolidación de la memoria (Lamprecht and LeDoux 2004).

La memoria a corto plazo o retención de una información durante un tiempo breve se basa en cambios efímeros, eléctricos o moleculares, en las redes neurales implicadas. Pero la repetición de la experiencia o la relevancia emocional de la misma puede dar lugar a cambios persistentes, para lo cual se activaría la maquinaria anteriormente descrita y produciéndose síntesis de nuevas proteínas y cambios estructurales. Un diálogo, en definitiva, entre genes y sinapsis (Kandel 2002), denominado proceso de consolidación de la memoria. Su resultado es el establecimiento de una memoria a largo plazo basada en cambios estructurales persistentes, como las nuevas espinas dendríticas (Engert and T Bonhoeffer 1999).

Las espinas varían enormemente en forma y tamaño, así como en número. Su volumen puede ir desde 0.001 a 1 micrómetros cúbicos (Holtmaat and K. Svoboda 2009) y su longitud puede incluirse en un rango que va desde 0.5 a 6 micrometros (Hering and Sheng 2001). Se han hecho diversas propuestas de clasificación morfológica de las espinas. La más habitual (Peters and Kaiserman-Abramof 1970) diferencia entre espinas fungiformes, que presentan una cabeza desarrollada y un cuello fino, espinas finas, que tienen un cuello fino y una cabeza apenas marcada, y espinas chatas, con cabeza bulbosa pero sin cuello. Posteriormente se ha señalado alguna otra categoría, como los filopodios, que presentan una altísima motilidad y baja supervivencia y son observables sobretodo en etapas

tempranas del desarrollo (Alvarez and B. L. Sabatini 2007), o las espinas ramificadas, que fueron descubiertas en el hipocampo y que se caracterizan por presentar varias cabezas, que establecen contacto con botones terminales diferentes, a partir de un origen común (von Bohlen Und Halbach 2009).

No obstante estos intentos clasificatorios han sido discutidos. Diversos investigadores defienden que habría que hablar, más bien, de un continuum morfológico y que el intento de encajar las múltiples formas observadas en unas pocas categorías fijas es reduccionista y subestima la gran heterogeneidad morfológica. Da además una visión estática errónea, que no tiene en cuenta el gran dinamismo que presentan estas estructuras, que pueden variar de forma en minutos y a lo largo de prolongados periodos (Jon I. Arellano, Ruth Benavides-Piccione, et al. 2007; Hering and Sheng 2001; Parnass et al. 2000). Estas protusiones aparecen y desaparecen a un ritmo variable a lo largo del desarrollo y parece que sólo un pequeño porcentaje de ellas llegan a estabilizarse en formas duraderas. Así, teniendo en cuenta que la mayor parte de ellas tiene una vida media de sólo días y que es relativamente raro en el cerebro adulto que una nueva espina se estabilice, se ha propuesto, por ejemplo, que si una espina perdura por 4 días es porque ha formado una sinapsis (Alvarez and B. L. Sabatini 2007). Además, incluso las espinas más estables en el tiempo presentan un tipo de fluctuación intrínseco, no dependiente de actividad, cuya función podría ser la de mantenimiento de la sinapsis (H. Kasai, Fukuda, et al. 2010).

Tomando en consideración la relación entre morfología, motilidad y función se ha puesto énfasis en la diferencia entre las espinas pequeñas y las grandes. El hecho es que parece haber una correlación clara entre volumen de la cabeza, tamaño de la PSD, número de receptores AMPA y estabilidad y longevidad; siendo las espinas grandes las más estables, las que tienen una cabeza más voluminosa y las que tienen una PSD mayor con una proporción mayor de receptores AMPA (Hering and Sheng 2001). Por ello se ha llamado a las espinas grandes *espinas de memoria*, y se han propuesto como sustrato de memorias ya consolidadas. En cambio, las espinas pequeñas, más inmaduras, se han denominado *espinas de aprendizaje*, por su gran disposición a cambiar de forma y tamaño y a pasar a una configuración más madura de mayor estabilidad (Lamprecht and LeDoux 2004). Las espinas pequeñas son, además, el lugar preferencial para la inducción de potenciación a largo plazo (PLP) (von Bohlen Und Halbach 2009). Son algo así como "sinapsis silenciosas", que expresan receptores NMDA pero muy pocos receptores AMPA, y que muestran fuertes incrementos de Ca^{2+} citosólico inducido por estimulación de los receptores NMDA (H. Kasai, Fukuda, et al. 2010). La frecuencia de cambios estructurales actividad-dependiente es mucho mayor en las espinas pequeñas que en las grandes. La actividad sináptica (del tipo del que se da durante la inducción de LTP) da lugar a espinas de tipo medio, actuando

preferentemente sobre espinas pequeñas y se considera probable que el crecimiento de la espina correlacione con el fortalecimiento de la transmisión sináptica.

Las espinas grandes se forman gradualmente. Esto parece respaldar la idea de Ebbinghaus de que las memorias más viejas son más persistentes. La edad de una espina se refleja en su volumen: las espinas viejas tienden a ser grandes y a tener una expectativa de vida mayor (H. Kasai, Fukuda, et al. 2010). El alargamiento de las espinas está asociado, como se ha dicho, con un incremento en la expresión funcional de receptores AMPA; pero probablemente hay otros cambios asociados al alargamiento espinal que aún están por descubrir (H. Kasai, Fukuda, et al. 2010). Por ejemplo, la polimerización masiva de actina genera una fuerza expansiva que actúa con seguridad en los tejidos circundantes; así es probable que esta fuerza mecánica actúe, bien sobre espinas vecinas, bien sobre la propia presinapsis potenciando su función (está probado que la simple fuerza mecánica sobre la membrana plasmática promueve la exocitosis). En conjunto esto supondría que la propia espina, al crecer, ejercería control sobre otras sinapsis o sobre la neurona presináptica (H. Kasai, Fukuda, et al. 2010).

4.2 FUNCIÓN DE LAS ESPINAS DENDRÍTICAS

La espina dendrítica es pues un compartimento altamente especializado del árbol dendrítico, que aglutina prácticamente en exclusiva los receptores postsinápticos y que contiene una gran variedad de proteínas específicas cuya única función parece ser la de asegurar el adecuado funcionamiento y morfología de estas estructuras. Por todo ello hay gran consenso en considerar que las espinas dendríticas cumplen un rol fundamental en el procesamiento neural (von Bohlen Und Halbach & Oliver, 2009; Yuste, 2011). No obstante su función específica no es del todo bien comprendida. Desde que Ramón y Cajal afirmó que las espinas aumentaban la superficie de contacto de las dendritas (Rafael Yuste 2011) se han propuesto diferentes explicaciones al hecho de que, pudiendo producirse directamente sobre el asta dendrítica, casi la totalidad de los contactos excitatorios se produzcan sobre espinas. El conjunto de funciones que han sido propuestas pueden incluirse en 3 grandes grupos (Rafael Yuste 2011).

En primer lugar se ha propuesto que las espinas podrían servir para potenciar la conectividad sináptica al servir de extensiones de la rama dendrítica que permitirían a ésta contactar con los distintos axones que atraviesan la neurópila. Dado que la mayor parte de los axones dibujan una trayectoria marcadamente recta, sin desviaciones aproximativas a

los árboles dendríticos circundantes, las espinas podrían ayudar a la dendrita a conectar con los axones cercanos estableciendo una especie de ampliación cilíndrica virtual en torno a las dendritas que permitiría acceder a la mayor cantidad de neurópila circundante posible. De esta forma los axones excitatorios establecerían contacto con el mayor número de neuronas posible, y las neuronas espinosas establecerían contacto a su vez con el máximo de axones posible.

En segundo lugar se ha propuesto que las espinas pudieran actuar como compartimentos eléctricos, filtrando los potenciales sinápticos, y aislando los distintos inputs entre ellos. La superficie dendrítica puede recibir una gran cantidad de inputs simultáneos y una característica deseable en todo circuito nervioso es minimizar la interferencia entre todos ellos y evitar la saturación de la respuesta de la neurona en situaciones de mucha estimulación. El cuello de la espina podría realizar la función de aislante eléctrico, filtrando el paso de cada potencial postsináptico a la membrana del asta madre.

Por último se ha defendido que las espinas podrían ser compartimentos bioquímicos que permitirían plasticidad sináptica específica para cada input. La espina actuaría compartimentando la entrada de Ca^{2+} aislando la actividad química en la cabeza respecto del asta dendrítica madre (Hering and Sheng 2001). Esto sería posible, nuevamente, gracias a las propiedades del cuello de la espina, que en espinas de cabeza desarrollada es fino y de unas micras de largo, de forma que los niveles de Ca^{2+} asociados a cada input puedan provocar cambios específicos, permitiendo plasticidad sináptica a largo plazo en sinapsis individuales.

Yuste (2011) defiende que estas 3 características o funciones son complementarias y han de integrarse en una concepción amplia. Las espinas, con su compartimentación de Ca^{2+} , el aislamiento eléctrico que proporciona el cuello y el aumento en el acceso a la neurópila circundante, reúnen un conjunto de características que las convierten en las estructuras ideales para aumentar la plasticidad sináptica y regular la fuerza de las sinapsis de forma específica para cada input (Rafael Yuste 2011).

5 MODULACIÓN DE LA CONSOLIDACIÓN DE LA MEMORIA ESPACIAL POR AEIC EN EL HPM

5.1 INTRODUCCIÓN

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 HPM 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 evitación activa en dos sentidos 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 (L Aldavert-Vera et al. 1996). Algunos autores proponen que la AEIC post-entrenamiento podría provocar un fortalecimiento retroactivo de las asociaciones establecidas por el aprendizaje (Coulombe and N White 1980; Major and N 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 HPM 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 and Mary-S. Oitzl 1989). No obstante, existen también pruebas de que el efecto facilitador de la AEIC sobre la consolidación de la memoria podría ser independiente de su carácter reforzante. De este modo, se ha observado que la estimulación del HPM a intensidades subumbral de refuerzo es capaz también de facilitar la retención de diferentes tareas de condicionamiento (Destrède and 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 (N M White and P M 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 anatómicamente y funcionalmente relacionado con los sistemas de activación general, otros autores sugieren que el factor crítico para la modulación del aprendizaje por AEIC podría ser el incremento artificial de la activación general del sistema nervioso durante el período crítico del procesamiento de la información (Destrède and Jaffard 1978). Los sistemas de arousal central promueven la excitabilidad de las neuronas del córtex y de otras estructuras telencefálicas, como la amígdala, el hipocampo o el estriado, facilitando, de esta manera, el procesamiento de la información (Marrocco 1994). De hecho la estimulación eléctrica en regiones no directamente ligadas al refuerzo, como el córtex entorrinal, también puede ser facilitadora en la adquisición de una tarea espacial (Stone et al. 2011). 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 and 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 and McGaugh 1998; Nielson et al. 1996), como la reactivación de memorias previamente adquiridas (Jean Przybylski and Susan J Sara 1997; S J Sara et al. 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 and Connors 1996). En definitiva, el tratamiento de AEIC podría facilitar la consolidación de la memoria mediante la producción de un incremento de la

activación del sistema nervioso, en general, y de algunas estructuras cerebrales que forman parte de los sistemas de memoria, en particular.

5.2 EL SUSTRATO NERVIOSO DE LA MEMORIA ESPACIAL Y LA AEIC

El tratamiento de AEIC del HPM y del ATV-SN es capaz de facilitar la adquisición y retención de diferentes tareas espaciales, como han evidenciado diversos estudios (Ramkumar et al. 2011; Soriano-Mas et al. 2005; Ruiz-Medina, I. Morgado-Bernal, et al. 2008). Ruiz-Medina et al. (2008) mostraron que el tratamiento postentrenamiento con AEIC en el HPM hacía que los animales que recibían el tratamiento fueran capaces de aprender una tarea espacial en el LAM que, por las condiciones de entrenamiento, resultaba demasiado difícil para los animales Control. Esta facilitación en la conducta es coherente con los resultados provenientes de diversos estudios que ponen en evidencia cambios a distintos niveles (neuroanatómicos, neuroquímicos, en neurogénesis) resultantes del tratamiento con AEIC, en áreas del cerebro claves para la navegación espacial como, por ejemplo, el hipocampo. A continuación veremos con más detalle algunos de estos cambios.

5.2.1 AEIC Y ACTIVACIÓN DE REGIONES RELACIONADAS CON LA MEMORIA ESPACIAL

La AEIC del HPM provoca la activación de múltiples áreas cerebrales, entre ellas algunas relacionadas directamente con la memoria espacial. Por ejemplo, Huguet et al. (Huguet et al. 2009) llevaron a cabo un análisis inmunohistoquímico para detección de c-fos, un gen de expresión temprana. Tras una única sesión de AEIC observaron niveles superiores de c-fos en CA3 y diversas subregiones de GD en los animales que recibían el tratamiento en comparación con aquellos que no lo recibían. Estos datos quedaron confirmados mediante un estudio posterior por micro-array de nucleótidos, en el que se demuestra que el tratamiento de AEIC, en las mismas condiciones y parámetros que el usado para facilitar la memoria, modula la expresión en el hipocampo de un conjunto significativo de genes implicados en vías de señalización intracelular y relacionados con aprendizaje y memoria y neuroplasticidad. Dada la complejidad de componentes de la conducta de AEIC (en la que una respuesta operante es precisa para obtener estimulación eléctrica en áreas del refuerzo, involucrando diferentes componentes conductuales y sistemas cerebrales) resulta difícil disociar cuál de estos componentes es responsable de la activación de diferentes subregiones del hipocampo. El patrón de activación observado es

además llamativo, no siendo general de la región (como ocurre con animales que convulsionan durante el tratamiento con AEIC) sino de células específicas. Esto podría indicar un patrón celular específico de respuesta a la AEIC, en el que redes asociadas a aprendizaje y memoria fueran las que se activaran de forma diferencial.

5.2.2 AEIC Y CAMBIOS EN LA MORFOLOGÍA NEURONAL

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 observado: que tras ser tratadas durante 10 días con AEIC del HPM y del ATV-SN se observan: 1) aumentos de la longitud (B S Rao et al. 1994) y de la arborización dendrítica (B. S. Rao et al. 1993; Bindu and Desiraju 1990; Ramkumar et al. 2008, 2011) en neuronas del HL, de la SN, de la CPF, de la zona CA3 del hipocampo y de la capa V del córtex motor; 2) un incremento en la densidad numérica de sinapsis, tanto en la región CA3 como en la capa molecular del córtex motor (Shankaranarayana Rao et al. 1997); 3) 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 (Shankaranarayana Rao, T. R. Raju, and B. L. Meti 1998c, 1998a; Shankaranarayana Rao et al. 1999). Estos cambios son atribuidos a la experiencia de autoestimulación y no a los efectos de la mera estimulación eléctrica (B. S. Rao et al. 1993). Además, son duraderos, perdurando en el tiempo incluso 60 días después de la finalización del tratamiento de AEIC (Shankaranarayana Rao, T. R. Raju, and B. L. Meti 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 et al. 1998) y revierte el efecto negativo sobre el aprendizaje producido por protocolos experimentales de estrés crónico (Ramkumar et al. 2011, 2008). 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 and 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 por la inducción de la PLP consecuente a la estimulación eléctrica reforzante del tejido nervioso. Por otro

lado, los cambios encontrados en el córtex motor, 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 et al. 1993).

5.2.3 AEIC Y CAMBIOS NEUROQUÍMICOS EN EL HIPOCAMPO

Teniendo en cuenta que los fenómenos de plasticidad neural pueden incluir cambios neuroquímicos (S J Martin et al. 2000), se ha podido comprobar que la AEIC del HPM 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, T. R. Raju, and B. L. Meti 1998a). Asimismo 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 et al. 2009). De esta manera, 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, T. R. Raju, and B. L. Meti 1998a), e incluso del efecto facilitativo mostrado sobre las capacidades cognitivas de los animales (Yoganarasimha et al. 1998; Yoganarasimha and B L Meti 1999). En esta línea podemos decir que resultados recientes de nuestro laboratorio señalan que en el stratum oriens y en el radiatum, del área CA1, la AEIC produce un incremento significativo en la expresión y síntesis de la proteína Arc, una proteína codificada por un gen efector de expresión temprana, relacionado con la dinámica de polimerización de la proteína actina y, por tanto, de gran relevancia en los procesos de plasticidad asociados al aprendizaje y la memoria (Korb and Finkbeiner 2011; Pevzner et al. 2012; Kádár et al. 2010).

5.2.4 AEIC Y NEUROGÉNESIS EN EL HIPOCAMPO

Otro de los efectos del tratamiento con AEIC que ha sido observado es un incremento en los niveles de neurogénesis en el giro dentado hipocampal. Takahashi et al. (2009) dieron una sesión de 1h de AEIC en el HPM durante 3 días consecutivos. Sacrificaron los animales tras la última sesión y observaron un aumento significativo en el número de nuevas células en el giro dentado, comprobando, además, que se trataba de neuronas que maduraban y más tarde se integraban en circuitos funcionales, interviniendo en los procesos asociados a la adquisición de un aprendizaje espacial en el LAM. Resultados semejantes han sido

obtenidos mediante estimulación eléctrica dada por el experimentador en otras regiones cerebrales, como el córtex entorrinal (Stone et al. 2011) o el núcleo anterior del tálamo (Toda et al. 2008). Si bien el mecanismo es incierto se ha sugerido la participación de factores neurotróficos liberados en el hipocampo (Laxton et al. 2010).

III. TRABAJO EXPERIMENTAL

III. TRABAJO EXPERIMENTAL

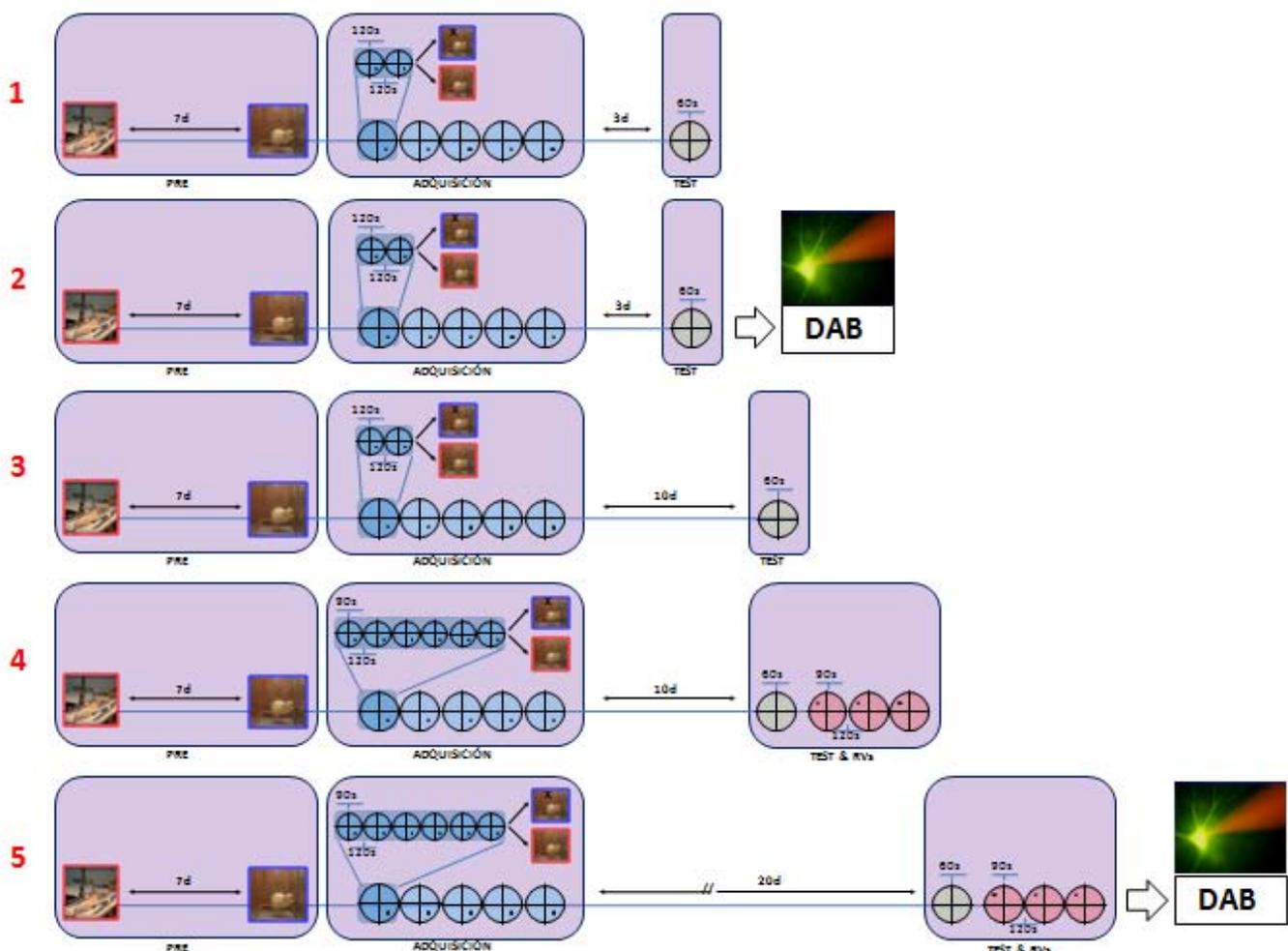
1 PLANTEAMIENTO

La finalidad de este trabajo es continuar y profundizar en el estudio del efecto facilitador asociado al tratamiento de AEIC postentrenamiento en una tarea espacial en el LAM, demostrado previamente en nuestro laboratorio (Ruiz-Medina, I. Morgado-Bernal, et al. 2008). Concretamente nos proponemos estudiar cómo evoluciona la memoria facilitada por AEIC cuando el intervalo entre la fase de adquisición y el ensayo de prueba se incrementa a 10 ó 20 días. Además nos proponemos estudiar la relación de esta facilitación observada en la conducta con cambios morfológicos en la microestructura de neuronas del hipocampo, tanto a corto como a largo plazo.

Para ello hemos llevado a cabo 5 experimentos consecutivos con ratas Wistar macho. En cada uno de ellos, los sujetos experimentales realizaron 5 sesiones de adquisición en días sucesivos. En cada ensayo los sujetos experimentales eran introducidos en el LAM desde una de las 4 posibles posiciones de entrada. Las ratas debían nadar en la piscina hasta localizar la plataforma escondida, guiándose por un conjunto de señales de referencia situadas en el exterior de los muros de la piscina. La cantidad de ensayos por sesión y la duración de los mismos variaron según el experimento, como se explica a continuación. En los tres primeros experimentos se llevaron a cabo sesiones de 2 ensayos de una duración máxima de 120s, con un intervalo entre ensayos de 2 minutos. En los dos últimos experimentos el número de ensayos por sesión se incrementó hasta 6, acortando su duración a 90s y manteniendo la duración del intervalo entre ensayos en 2 minutos. Inmediatamente después de cada sesión de adquisición los sujetos del grupo AEIC recibieron el tratamiento de AEIC. Los sujetos Control no recibieron el tratamiento de AEIC pero permanecieron también en una caja de AEIC por un tiempo equivalente al que tardaban los sujetos AEIC en administrarse el tratamiento. El ensayo de prueba, consistente en dejar nadar al animal durante 60 segundos en un LAM idéntico al de la adquisición pero del que se había retirado la plataforma, fue realizado tras un intervalo de entre 3 y 20 días, según el experimento. En los experimentos 1 y 2 el ensayo de prueba se realizó a los 3 días de la finalización de la fase de adquisición. En los experimentos 3 y 4 este intervalo se amplió hasta 10 días. Por último, en el experimento 5 el ensayo de prueba se llevó a cabo a

los 20 días de la fase de adquisición. En los experimentos 4 y 5, a continuación del ensayo de prueba, se incluyó una fase *reversa*, consistente en 3 ensayos, idénticos a los de la fase de adquisición, en los que la plataforma se volvió a situar en el interior de la piscina pero en el cuadrante opuesto al que había ocupado durante la adquisición. Finalmente, para responder al objetivo de analizar posibles cambios morfológicos implicados en la facilitación de la memoria, tras la finalización de los experimentos 2 y 5 se llevó a cabo un estudio mediante la técnica de inyección intracelular con Amarillo Lucifer y posterior marcaje con 3,3'-Diaminobencidina (DAB) de la arborización dendrítica y densidad de espinas en las neuronas piramidales de CA1.

A continuación se incluye una figura en la que se esquematiza de forma comparativa el conjunto de experimentos llevados a cabo y sus correspondientes fases y procedimientos.



EXPERIMENTOS

2.1 EXPERIMENTO 1

2.1.1 INTRODUCCIÓN

Nuestro primer objetivo fue establecer un paradigma experimental que pusiera de manifiesto el potencial facilitador del tratamiento con AEIC en una tarea de memoria explícita en el LAM. Partiendo del trabajo previo presentado por Ruiz-Medina et al. (2008), queríamos contar con un modelo en el que el nivel de aprendizaje mostrado por los animales AEIC en el ensayo de prueba fuera más robusto. Para ello conservamos el procedimiento de entrenar a los animales en el LAM durante 5 sesiones en días consecutivos, pero incrementamos la cantidad de entrenamiento de un ensayo por sesión a dos. El diseño resultante, si bien permite un aprendizaje de la tarea espacial más consistente, continúa presentando un nivel de dificultad elevado, condición que, según resultados previos de nuestro laboratorio (Ruiz-Medina, D. Redolar-Ripoll, et al. 2008), parece favorecer la expresión del potencial facilitador de la AEIC sobre la adquisición y consolidación de la memoria de distintos tipos de aprendizaje.

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 4465. 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 40 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, 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 los trabajos experimentales con las ratas se realizaron 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.

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 pretendió 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 150 μm (S.0005) 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 and Watson 2007) (ver figura X).

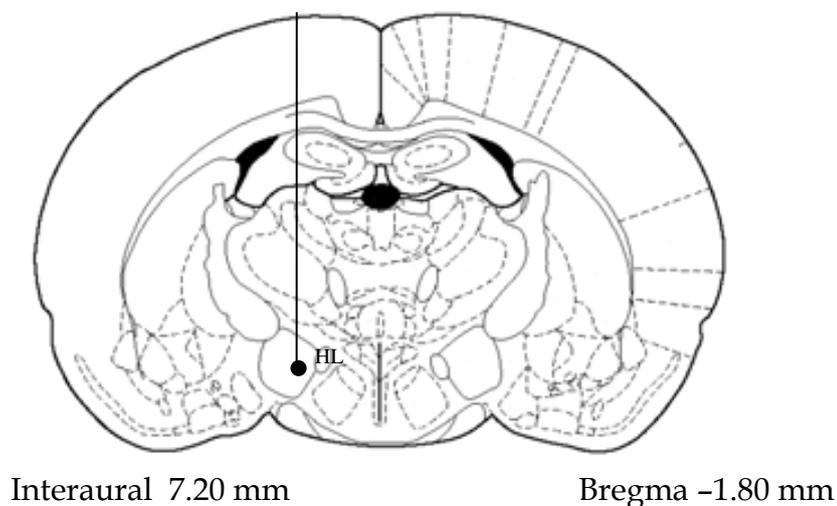


Figura X. Corte coronal del cerebro de la rata en el que puede verse el lugar de implantación del electrodo.

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 estaba soldado a un conector de material plástico que, tras fijarse el electrodo en el tejido cerebral, fue fijado mediante resina acrílica autopolimerizable (vértex self-curing, Dentimex, Nederland) sobre 4 tornillos anclados en la superficie del cráneo. El electrodo de referencia consistió en un hilo de cobre soldado a uno de los 4 tornillos de anclaje y a uno de los bornes del conector plástico.

La duración de la intervención de cada uno de los animales fue de aproximadamente 45 minutos. Los animales fueron anestesiados profundamente con una combinación de Ketamina (Imalgene, 150 mg/Kg, Merial, Lyon, Francia) y Xilacina (Rompun 8 mg/kg, Bayer, Barcelona, España). Al realizar la incisión y al aplicar los puntos de sutura, se administró de forma tópica el anestésico local lidocaína. Durante las intervenciones se mantuvo la temperatura corporal de los sujetos mediante una almohadilla térmica. Una vez finalizada la intervención se aplicó 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 siguió 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. Para ello se utilizó una caja operante de Skinner (25x20x20cm.) formada por una pared (la delantera) de cristal y tres (laterales) de metacrilato (Campden Instruments, Ltd.). La palanca se encontraba situada en una de las paredes laterales y una luz se encendía de manera contingente a cada tren de corriente estimulante.

El equipo de estimulación consistió en un generador de corriente de onda sinusoidal. Para controlar la corriente administrada a los sujetos se utilizó un osciloscopio Hameg (HM 412-5). La estimulación consistió en trenes de 0.3s de duración, de corriente sinusoidal de 50 Hz de frecuencia a una intensidad entre 50 μ A y 250 μ A. Todos los parámetros de la corriente estimulante, excepto la intensidad de la misma, se mantuvieron fijos durante todo el experimento.

2.1.2.5 Asignación a grupos experimentales y Modelamiento de la conducta de AEIC

Los sujetos fueron distribuidos aleatoriamente en 2 grupos experimentales, uno de los cuales recibiría tratamiento de AEIC postentrenamiento (grupo AEIC) y otro no (grupo Control). En los animales asignados al grupo AEIC, se procedió a modelar la conducta de

AEIC, con el objetivo de establecer la intensidad mínima de corriente que diera lugar a una respuesta estable de 250 palancadas en 5 min. Para ello, se empleó un procedimiento de modelamiento en la caja de Skinner para, en primer lugar, instaurar en cada sujeto experimental la respuesta de apretar la palanca, a través de la que se autoadministraban trenes de corriente eléctrica en el HL a través del electrodo crónicamente implantado. El procedimiento consistía en reforzar de forma diferencial las aproximaciones sucesivas a la palanca y a la conducta meta (apretar la palanca). Una vez la conducta de autoestimulación quedaba instaurada, se dejó que el animal se autoestimulase hasta alcanzar los 1000 refuerzos.

2.1.2.6 Laberinto acuático de Morris

2.1.2.6.1 Aparato

La tarea espacial se realizó en una piscina circular elevada (diámetro, 2 m; altura 0.60 m), llena de agua hasta una altura de 0.45 m, y a una temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$. 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. Las diferentes señales de orientación fueron colocadas en el exterior de la piscina, suspendidas del falso techo. Fueron distribuidas alrededor de la piscina una pelota de playa a rayas de colores (50cm Ø), una caja blanca con rayas negras horizontales (20x10x5cm), un oso de peluche marrón (50cm de alto) y una caja blanca (20x20x5cm) iluminada desde dentro y con una ventana en forma de cruz griega cubierta por una pantalla de papel. La plataforma, en plexiglas negro, de 11cm de diámetro, fue situada en el centro de uno de los cuadrantes virtuales en los que se dividió la piscina y sumergida unos 2cm por debajo de la superficie del agua. Un circuito cerrado de video se montó a 1.75 m sobre el centro de la piscina dentro del falso techo y sus grabaciones fueron registradas, mediante un software especializado (SMART Video Tracking System, Version 2.5.2, Panlab), en un ordenador que se encontraba en la misma habitación.

2.1.2.6.2 Adquisición

Tres días después de la sesión de modelamiento, los animales fueron entrenados en una tarea espacial en el LAM. El paradigma general de entrenamiento consistió en 5 sesiones consecutivas (una sesión diaria) de 2 ensayos cada una. En cada ensayo el animal era introducido desde uno de los puntos cardinales que se toman como referencia habitualmente en el LAM, en orden aleatorio (N, S, E u O). Cuando la rata no encontraba la plataforma en los 2 minutos que duraba el ensayo, se guiaba al animal manualmente hasta

la plataforma, en la que se le dejaba durante 15s. El intervalo entre ensayos fue de 2 minutos.

2.1.2.6.3 Tratamiento de AEIC

Inmediatamente después de finalizar cada una de las sesiones de adquisición en el LAM, los sujetos del grupo AEIC recibieron el tratamiento de autoestimulación eléctrica, consistente en la autoadministración de 2500 trenes de corriente estimulante a la intensidad previamente establecida en la misma caja de Skinner donde habían realizado el modelamiento. Los sujetos del grupo Control también fueron colocados tras cada sesión de adquisición en el LAM en la misma caja operante de Skinner durante 45 min, pero sin recibir tratamiento.

2.1.2.6.4 Ensayo de prueba

Tres días después de finalizar la última sesión de adquisición, los sujetos experimentales realizaron el ensayo de prueba o test de transferencia. Esta prueba consistió en un único ensayo de 60 segundos de duración en el que se había retirado la plataforma. Durante este tiempo se registró el tiempo que cada sujeto pasaba en cada uno de los cuadrantes de la piscina, así como otras variables relevantes.

2.1.2.6.5 Análisis estadístico

El procesamiento de los datos se realizó a través del paquete estadístico SPSS 19.0. Las pruebas principales se hicieron mediante un análisis mixto de la varianza (Modelo Lineal General-medidas repetidas), 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; 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 nivel de azar (25% del total del ensayo); 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.

2.1.2.6.6 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 post-fijación 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 micrótopo 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

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

2.1.3.2 Adquisición

La fig. 1 muestra la media de latencia de escape de cada grupo a lo largo de las 5 sesiones de adquisición. Se realizaron dos análisis de forma independiente; por una parte se analizó la evolución del aprendizaje entre la primera y la segunda sesión de adquisición, para ver el efecto neto de la primera sesión de tratamiento AEIC, y por otra, se analizó la evolución entre las sesiones 2 a la 5, para estudiar el efecto del tratamiento sobre la evolución del aprendizaje. El análisis de la variancia entre las sesiones 1 y 2 (MANOVA) muestra un efecto dependiente de la sesión [factor interacción grupo*sesión $F(1, 38)=7,81$; $P=0,008$]. Observamos que en la primera sesión la latencia media de ambos grupos fue igual. En la segunda sesión las diferencias fueron significativas [$F(1, 38)=10,40$, $P=0,003$]. El grupo Control no mostró mejora entre ambas sesiones mientras que el grupo AEIC sí lo hizo ($F(1, 38)=28,33$, $P=0,000$). El análisis mediante MANOVA de la evolución del aprendizaje entre las sesiones 2 y 5 muestra que el grupo AEIC presentó, considerando todas las sesiones en conjunto, latencias significativamente más bajas [factor grupo $F(1, 38)=13,89$, $P=0,001$]. Aunque este efecto fue independientes de la sesión, el análisis de los efectos simples muestra que estas diferencias son especialmente acusadas en la última sesión de aprendizaje [$F(1, 38)=6,53$, $P=0,015$]. En resumen, los animales del grupo AEIC mostraron

latencias significativamente más bajas a lo largo del conjunto de sesiones posteriores a la introducción del tratamiento con AEIC (sesiones 2-5). La diferencia respecto del grupo Control fue especialmente marcada en las sesiones 2 y 5.

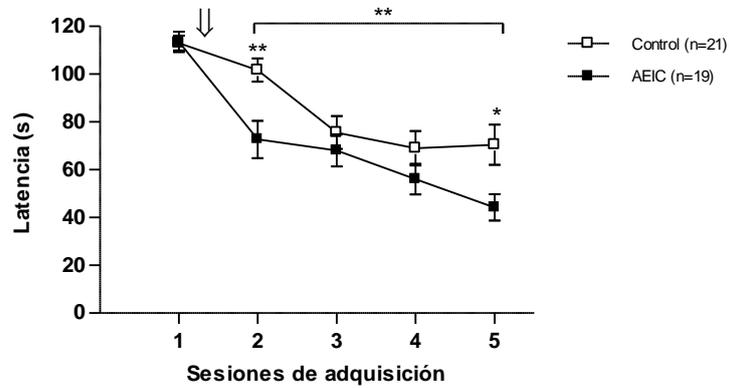


Fig. 1. Latencia media de escape (\pm S.E.) de los animales Control y AEIC en cada una de las sesiones de adquisición en el experimento 1. Tras la primera sesión de adquisición, la flecha señala el momento de administración de la primera de las sesiones de AEIC. Puede observarse que el factor grupo es significativo para el conjunto de sesiones posteriores al inicio del tratamiento (sesiones 2 a 5) (* $P < 0,05$; ** $P < 0,005$).

2.1.3.3 Ensayo de prueba

El análisis mediante *t*-test muestra que el grupo AEIC dedicó un porcentaje de tiempo significativamente superior a nadar en el cuadrante target respecto del grupo Control [$t=2,148$, $P=0,038$]. Además, sólo el grupo AEIC nadó en el cuadrante target un porcentaje de tiempo estadísticamente diferente al nivel de azar [$t=3,512$, $P=0,002$].

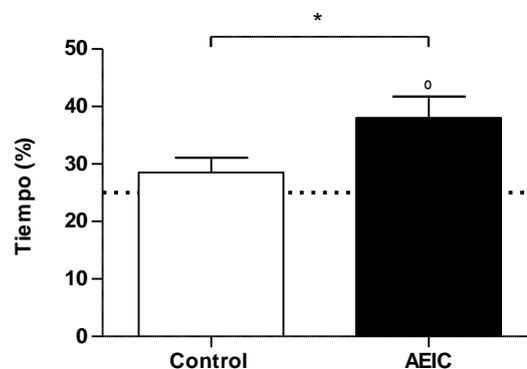


Fig. 2. Porcentaje del total del tiempo del ensayo de prueba (60s) dedicado a nadar en el cuadrante donde había estado la plataforma por cada uno de los grupos. El grupo AEIC dedicó un porcentaje significativamente superior a nadar en este cuadrante que el Control. Este porcentaje fue, además, estadísticamente superior al 25% que, por azar, correspondería a cada uno de los cuadrantes [$P < 0,05$ entre grupos; $^{\circ}P < 0,005$ respecto de la probabilidad de azar (marcada con línea punteada)].

2.1.3.4 Variables de control en el LAM

No se observaron diferencias significativas entre grupos en la distancia media de nado, la velocidad media de nado o el tiempo medio de nado en paredes, ni en la fase de adquisición ni durante el ensayo de prueba.

2.1.3.5 Parámetros AEIC e histología

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 espacial 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 adquisición 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 (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.

Teniendo en cuenta estos resultados, que se ven avalados por la larga experiencia previa de nuestro laboratorio de una ausencia total de relación entre las coordenadas de implantación del electrodo, las variables de AEIC y las variables conductuales en el LAM, en el resto de experimentos se prescindió de este análisis.

2.2 EXPERIMENTO 2

2.2.1 INTRODUCCIÓN

En el Experimento1 observamos un efecto de facilitación por AEIC de la adquisición y la retención de una tarea espacial. Ahora bien, como muestra el hecho de que los animales

Control no parecen recordar la tarea en el ensayo de prueba realizado a los 3 días, el diseño utilizado parece establecer las condiciones de dificultad elevada que como se ha dicho previamente permiten que se haga visible el efecto facilitador de la AEIC. Contando pues con un paradigma validado de facilitación de una tarea espacial en el LAM por AEIC, nuestro siguiente objetivo fue estudiar sus efectos sobre la estructura de las neuronas piramidales de CA1, una región hipocampal de gran relevancia en este tipo de aprendizaje. Para ello llevamos a cabo un nuevo experimento utilizando el mismo paradigma que en el experimento anterior, en el que se estudió no sólo el efecto conductual de la AEIC sino que también se llevó a cabo un estudio comparativo de la neuroanatomía de las neuronas piramidales de CA1 entre las ratas Control y las tratadas con AEIC, que muestran una retención facilitada.

2.2.2 MATERIAL Y PROCEDIMIENTO

Se utilizaron un total de 19 ratas Wistar, de 92.8 días (D.S.=3.87) de edad y peso medio de 367.95g (D.S.=21.78) al inicio del experimento. Todo lo referente a ética y bienestar animal, tipo y procedencia de los animales experimentales, procedimiento quirúrgico y coordenadas de implantación de los electrodos, aparato de estimulación, análisis estadístico de los datos, modelamiento y asignación a grupos experimentales, tratamiento AEIC y aparato de LAM se realizó de forma idéntica al experimento 1.

Tras la finalización del ensayo de prueba los animales fueron eutanasiados y sus cerebros extraídos y almacenados durante 24h en paraformaldehído para el posterior tratamiento mediante la técnica de la inyección intracelular con Amarillo Lucifer y posterior marcaje con DAB.

2.2.2.1 Técnica de inyección intracelular con Amarillo Lucifer

Las neuronas piramidales de CA1 del hipocampo del hemisferio derecho, el mismo en el que estaba implantado el electrodo de AEIC, fueron procesadas mediante la técnica de inyección intracelular con amarillo lucifer. Los métodos de inyección y reconstrucción celular han sido descritos en detalle previamente (G N Elston and Rosa 1997; R. Benavides-Piccione et al. 2005). Brevemente: mediante vibrátomo se obtuvieron cortes coronales (200 µm) que fueron pre-marcados con 4,6-diamidino-2-phenylindole (D9542; Sigma, St Louis, MO). Las neuronas fueron inyectadas mediante el uso de una corriente continua con Amarillo Lucifer (8% in 0.1 M Tris buffer, pH 7.4) hasta que las dendritas individuales de cada célula pudieron ser trazadas hasta el final abrupto en sus puntas más distales, y las

espinas dendríticas fueron claramente visibles. Después de inyectar las neuronas, los cortes fueron procesados, primero con un anticuerpo de conejo para amarillo lucifer producido en el Instituto Cajal (1:400 000 in stock solution: 2% bovine serum albumin [A3425; Sigma], 1% Triton X-100 [30632; BDH Chemicals, Poole, UK], and 5% sucrose in PB), y luego con un anticuerpo secundario biotinizado anticonejo de burro (1:200 in stock solution; RPN1004; Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK). Las células inmunomarcadas fueron visualizadas con un complejo biotina—horseradish peroxidasa (1:200 in PB; RPN1051; Amersham Pharmacia Biotech) utilizando DAB como cromogen.

2.2.2.2 Reconstrucción celular y análisis morfológico

Para el análisis de la arborización basal sólo aquellas células que quedaron completamente rellenas y contenidas en su totalidad en el interior de la sección fueron incluidas. Para el análisis de los árboles dendríticos apicales sólo aquellos cuya dendrita apical principal fue visible a lo largo de todo el stratum radiatum, llegando hasta el stratum lacunosum, fueron utilizadas. Estas neuronas fueron luego reconstruidas en 3 dimensiones utilizando el programa informático NeuroLucida (MicroBrightField, Williston, USA; Fig. 2), y varios parámetros morfológicos fueron medidos, incluyendo los siguientes rasgos tanto de la arborización basal como de la apical:

- área y volumen de la arborización tanto basal como apical, calculada como el área incluida dentro de un polígono bidimensional o tridimensional, respectivamente, que unía los puntos más distales de los procesos dendríticos
- complejidad de la ramificación mediante análisis de Sholl (número de bifurcaciones dendríticas que intersectan esferas concéntricas en el cuerpo celular a incrementos de 20 μm del radio como una función de la distancia del soma). Los parámetros analizados fueron la longitud dendrítica total, el número de bifurcaciones, las intersecciones y los finales de rama por distancia.
- longitud total de los árboles dendríticos

Analizamos la morfología apical de 124 células piramidales y la morfología basal de 147 células piramidales de CA1, todas provenientes de 19 ratas Wistar, analizando un mínimo de 6 células por animal.

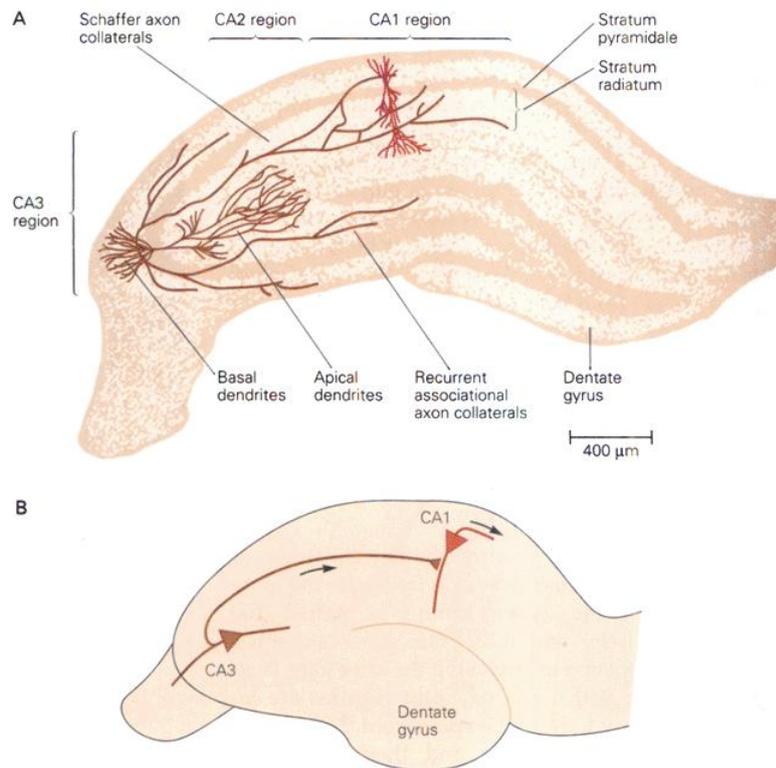


Fig. 3. Diagrama del hipocampo en el que pueden verse las diferentes capas y la disposición de una neurona piramidal tipo en el área CA1. Puede verse que la arborización basal de la neurona queda dispuesta hacia la región externa ocupando el stratum oriens mientras que el árbol apical se extiende a través del stratum radiatum hasta el lacunosum-moleculare (extraído de: Kandel, Schwartz, & Jessell, 2000).

2.2.2.3 Densidad de espinas

La densidad de espinas dendríticas en las células marcadas se determinó contando el número total de espinas de ramas, seleccionadas al azar, que derivaban horizontalmente desde neuronas piramidales de CA1 (objetivo x100 de sumersión en aceite). La reconstrucción comenzaba en el soma (o el asta dendrítica de la que surgía la rama estudiada) y continuaba hasta la punta distal (p.e. ver Eayrs and Goodhead, 1959; Valverde, 1967). No se distinguió entre tipos morfológicos de espinas (Arellano et al., 2007b). Las espinas fueron contadas de un total de 215 dendritas que proyectaban horizontalmente seleccionadas de células distintas: 112 ramas apicales y 103 ramas basales.

2.2.2.4 Análisis estadístico

La comparación de parámetros morfológicos fue realizada mediante una prueba t de medidas repetidas con significación bilateral. Se analizaron los parámetros de área y

volumen, complejidad de la arborización, longitud dendrítica y número total de espinas. Un MANOVA fue utilizado para analizar los patrones de arborización, la longitud por distancia y la densidad de espinas por distancia. Todos los análisis estadísticos fueron llevados a cabo mediante el paquete estadístico SPSS v. 19.0 (SPSS Science).

2.2.3 RESULTADOS

2.2.3.1 Sujetos

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

2.2.3.2 Adquisición

La Fig. 4 muestra la media de latencia de escape de cada grupo a lo largo de las 5 sesiones de adquisición. El análisis estadístico se llevó a cabo como en el Experimento1. El análisis de la variancia entre las sesiones 1 y 2 (MANOVA) muestra que ambos grupos tuvieron latencias iguales en la primera sesión. El análisis mediante MANOVA del comportamiento entre las sesiones 2 y 5 muestra un efecto del tratamiento, independiente de la sesión [factor grupo $F(1, 17)=4,66$, $P=0,046$]. El análisis de los efectos simples muestra que las diferencias entre grupos fueron especialmente marcadas en la última sesión de aprendizaje [$F(1, 17)=4,24$, $P=0,05$]. En resumen, los animales del grupo AEIC mostraron latencias significativamente más bajas a lo largo del conjunto de sesiones posteriores a la introducción del tratamiento con AEIC (sesiones 2-5). La diferencia respecto del grupo Control fue especialmente marcada en la sesión 5.

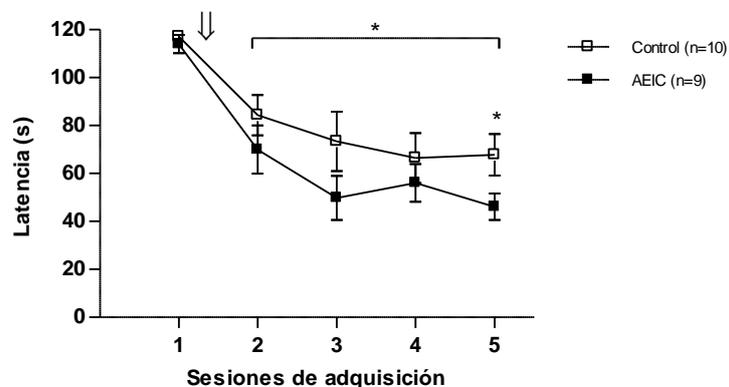


Fig. 4. Latencia media de escape (\pm S.E.) de los animales Control y AEIC en cada una de las sesiones de adquisición en el experimento 2. Tras la primera sesión de adquisición la flecha señala el momento de administración de la primera de las sesiones de AEIC. Puede observarse que el factor grupo es significativo para el conjunto de sesiones posteriores al inicio del tratamiento (sesiones 2 a 5) (* $P < 0,05$).

2.2.3.3 Ensayo de prueba

Un *t*-test mostró que el grupo AEIC dio muestras de una mayor preferencia por el cuadrante target [$t=2,731$, $P=0,014$]. Nuevamente sólo el grupo AEIC dedicó un porcentaje de tiempo estadísticamente superior al del azar a nadar en este cuadrante [$t=3,393$, $P=0,009$].

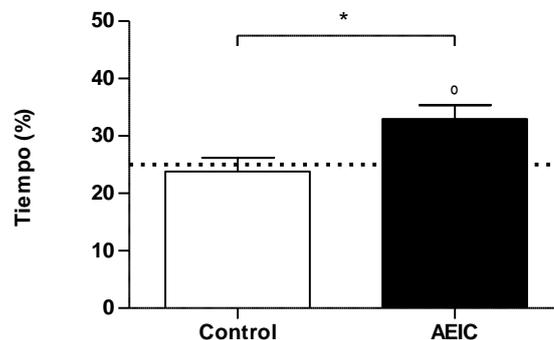


Fig. 5. Porcentaje del total del tiempo del ensayo de prueba (60s) dedicado a nadar en el cuadrante target. El grupo AEIC dedicó un porcentaje significativamente superior al Control a nadar en este cuadrante. Este porcentaje fue estadísticamente superior al 25% que, por azar, correspondería a cada uno de los cuadrantes [$*P < 0,05$ entre grupos; $^{\circ}P < 0,01$ respecto de la probabilidad de azar (marcada con línea punteada)].

2.2.3.4 Variables de control en el LAM

No se observaron diferencias significativas entre grupos en relación a la distancia media de nado, la velocidad media de nado o el tiempo medio de nado en paredes, ni en la fase de adquisición ni durante el ensayo de prueba.

2.2.3.5 Estructura celular en las piramidales de CA1

Un análisis morfométrico fue llevado a cabo para examinar los efectos de la AEIC sobre las estructuras apical y basal de neuronas piramidales del hipocampo. Este análisis incluyó: área y volumen total de la arborización, longitud de las ramificaciones, análisis de la complejidad dendrítica mediante análisis de Sholl y densidad media y distribución de las espinas dendríticas.

2.2.3.5.1 Tamaño del árbol dendrítico

La cuantificación del área del árbol dendrítico apical reveló que las células de los animales AEIC eran mayores que las de los animales Control (media \pm SD: $57.81 \pm 2.42 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ y $50.06 \pm 2.14 \times 10^3 \mu\text{m}^2$, respectivamente). Una prueba t para muestras independientes reveló que esta diferencia era significativa ($t=2.404$, $P=0.029$). El volumen total del árbol apical también fue mayor en animales AEIC ($42.02 \pm 3.25 \times 10^5 \mu\text{m}^3$ y $32.06 \pm 2.12 \times 10^5 \mu\text{m}^3$, respectivamente). No se encontraron diferencias significativas en el análisis del área o el volumen de la arborización basal entre los dos grupos.

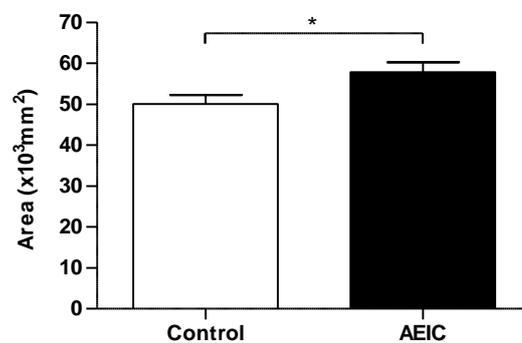


Fig. 6. Área de la arborización apical. Puede verse que la de los animales AEIC es mayor que la de los animales Control. Esta diferencia fue estadísticamente significativa [$*P<0,01$ entre grupos]

2.2.3.5.2 Patrón de arborización y longitud de las ramificaciones

La longitud total de las ramificaciones dendríticas basales y apicales también fue analizada. Como puede verse en la figura 7, el árbol dendrítico apical de CA1 en los animales AEIC fue significativamente más largo que el de los animales Control ($3.83 \pm 0.21 \times 10^3 \mu\text{m}$ y $3.09 \pm 0.14 \times 10^3 \mu\text{m}$, respectivamente; $t=2.970$, $P=0.009$). No se observaron diferencias significativas en la longitud de las ramas dendríticas basales entre ambos grupos.

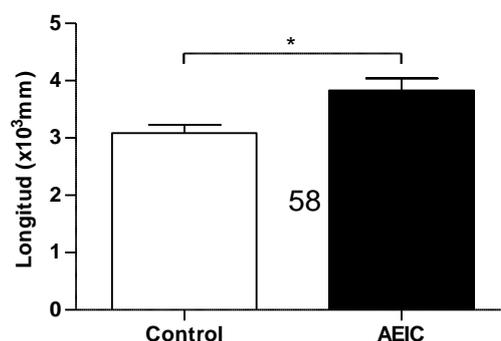


Fig. 7. Longitud media de la arborización apical. Puede verse que la de los animales AEIC es mayor que la de los animales Control. Esta diferencia fue estadísticamente significativa [$*P<0,01$ entre grupos]

El número de ramas fue también significativamente superior en los animales AEIC tanto en la arborización apical (35.31 ± 1.43 y 26.86 ± 1.69 , respectivamente; $t=2.582$, $P=0.003$) como en la basal (12.75 ± 0.26 y 9.92 ± 0.77 , respectivamente; $t=3.453$, $P=0.030$).

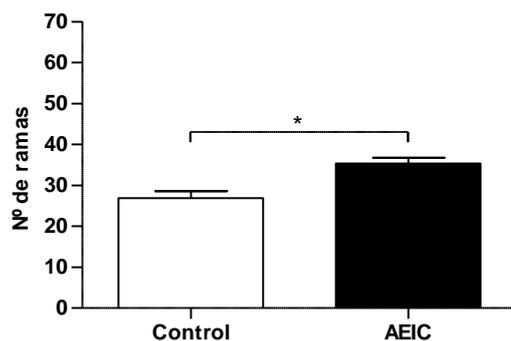


Fig. 8. Número de ramas de la arborización apical. Puede verse que la de los animales AEIC es mayor que la de los animales Control. Esta diferencia fue estadísticamente significativa [$*P<0,05$ entre grupos]

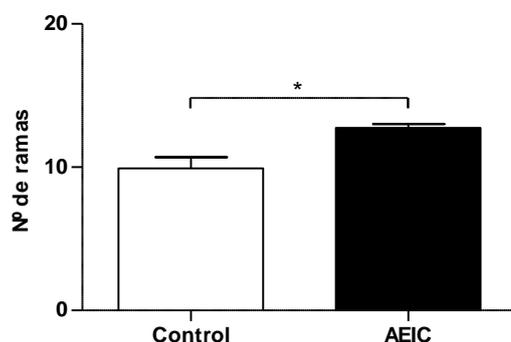


Fig. 9. Número de ramas de la arborización basal. Puede verse que la de los animales AEIC es mayor que la de los animales Control. Esta diferencia fue estadísticamente significativa [$*P<0,05$ entre grupos]

2.2.3.5.3 Densidad y distribución de las espinas

La densidad de espinas fue significativamente superior en los animales tratados con AEIC, tanto en arborización dendrítica apical ($t_{2.654}$; $P_{0.018}$) como en la basal ($t_{2.359}$; $P_{0.036}$)

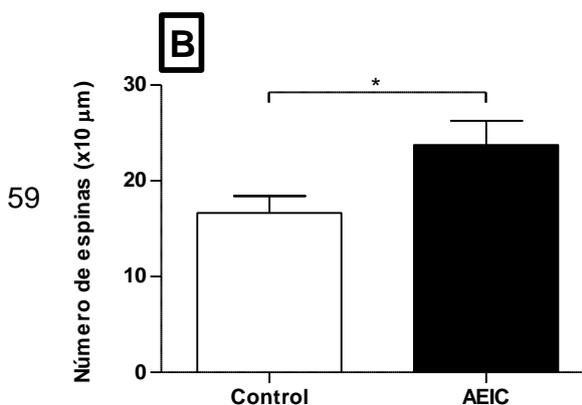
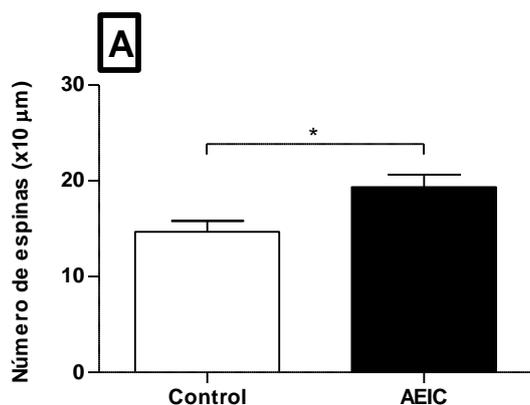


Fig. 10. A. Densidad media de espinas dendríticas apicales. B. Densidad media de espinas dendríticas basales. Puede verse que en ambos casos en los animales AEIC es mayor [* $P < 0,05$ entre grupos]

2.3 EXPERIMENTO 3

2.3.1 INTRODUCCIÓN

Los resultados previos muestran que la facilitación observada del aprendizaje espacial en el LAM va acompañada de cambios estructurales en las neuronas hipocampales, en términos de complejidad de arborización y de densidad de espinas dendríticas a los 3 días. La pregunta que nos hicimos a continuación fue en qué medida estos cambios, en la conducta y en la microestructura neuronal, se mantendrían a más largo plazo. Para comprobar los efectos del tratamiento con AEIC a largo plazo llevamos a cabo un nuevo experimento en el que medimos la retención a los 10 días. En todo lo demás se siguió el mismo paradigma de aprendizaje utilizado en los dos experimentos previos.

2.3.2 MATERIAL Y PROCEDIMIENTO

Se utilizaron un total de 26 ratas Wistar, de 90.84 días de edad (D.S.=5.60) y peso medio de 409.5g (D.S.=22.10) 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, tratamiento AEIC y aparato de LAM se realizó de forma idéntica a los anteriores, con la única diferencia de que el ensayo de prueba se llevó a cabo a los 10 días de la última sesión de adquisición en el LAM .

2.3.3 RESULTADOS

2.3.3.1 Sujetos

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

2.3.3.2 Adquisición

La Fig. 5 muestra la media de latencia de escape de cada grupo a lo largo de las 5 sesiones de adquisición. El análisis de la variancia entre las sesiones 1 y 2 (MANOVA) muestra que la interacción entre los factores grupo y sesión presenta una tendencia a la significación [$F(1, 24)=3,30$ $P=0,082$]. Mientras que ambos grupos se comportaron igual en la primera sesión, el análisis de los efectos simples muestra diferencias significativas entre grupos en la segunda sesión [$F(1, 24)=4,33$ $P=0,048$], teniendo el grupo AEIC una latencia media significativamente inferior al Control. Además, el grupo AEIC mejoró su ejecución tras la primera sesión de tratamiento, entre las sesiones 1 y 2 [$F(1, 24)=16,08$ $P=0,001$], mientras que el grupo Control no lo hizo. El análisis mediante MANOVA del comportamiento entre las sesiones 2 y 5 muestra un efecto facilitador significativo del tratamiento, que es independiente de la sesión [$F(1, 24)=4,57$, $P=0,043$]. Además, el análisis de efectos simples dentro de cada sesión pone de manifiesto que las diferencias entre grupos fueron más marcadas en la cuarta sesión [$F(1, 24)=4,28$, $P=0,05$]. En resumen, los animales tratados con AEIC mostraron latencias medias significativamente más bajas en el conjunto de sesiones posteriores al inicio de tratamiento, diferencia que fue especialmente marcada en la cuarta sesión.

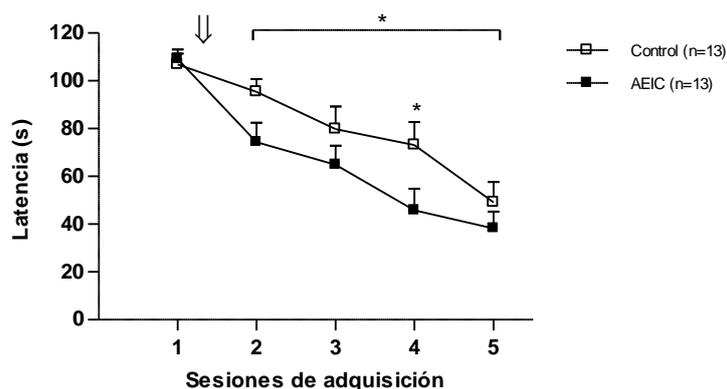


Fig. 11. Latencia media de escape (\pm S.E.) de los animales Control y AEIC en cada una de las sesiones de adquisición en el experimento 3. Tras la primera sesión de adquisición la flecha señala el momento de

administración de la primera de las sesiones de AEIC. Puede observarse que el factor grupo es significativo para el conjunto de sesiones posteriores al inicio del tratamiento (sesiones 2 a 5) (* $P < 0,05$).

2.3.3.3 Ensayo de prueba

Un *t*-test muestra que, tras 10 días de la última sesión de adquisición no se observaron diferencias significativas entre los dos grupos en el tiempo dedicado a nadar en el cuadrante target. Tampoco ninguno de los dos grupos dedicó a nadar en este cuadrante un tiempo significativamente superior al de nivel de azar. Podemos concluir pues que, al cabo de 10 días, ninguno de los dos grupos pareció recordar la tarea previamente aprendida.

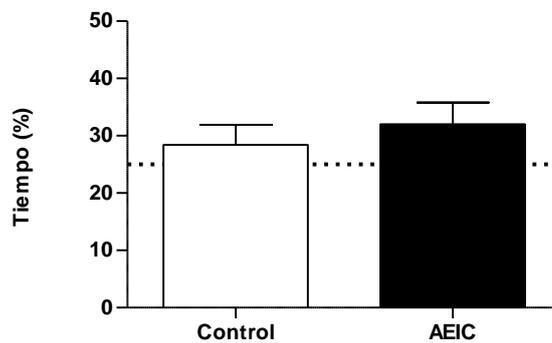


Fig. 12. Porcentaje del total del tiempo del ensayo de prueba (60s) dedicado a nadar en el cuadrante target. Ambos grupos dedicaron un tiempo similar a nadar en el cuadrante target, que no fue estadísticamente diferente, además, del nivel de azar (señalado con línea punteada).

EXPERIMENTO 4

2.3.4 INTRODUCCIÓN

En el previo experimento, a pesar de mostrar diferencias en las sesiones de adquisición, ninguno de los grupos mostró una clara retención del aprendizaje a los 10 días. Una posible explicación a este resultado es que el entrenamiento llevado a cabo hubiera resultado insuficiente para ocasionar un nivel de aprendizaje suficiente para ser mantenido (retenido) al cabo de 10 días. Partiendo de que un mayor entrenamiento proporciona, en condiciones normales, una memoria más consolidada y, por tanto, capaz de ser recuperada a más largo plazo, nos planteamos incrementar la cantidad de entrenamiento para intentar conseguir poner de manifiesto efectos del tratamiento a largo plazo. Para ello llevamos a cabo un

nuevo experimento en el que se intensificara la cantidad de entrenamiento. En este cuarto experimento los sujetos realizaron nuevamente 5 sesiones de adquisición en días consecutivos, pero en esta ocasión cada sesión constó de 6 ensayos de 90s de duración. El intervalo entre ensayos fue de 120s. El ensayo de prueba, igual que en el experimento anterior, se realizó a los 10 días. Además, en este experimento, tras el ensayo de prueba, se llevó a cabo una fase de *reversal* consistente en 3 ensayos consecutivos de 90s, con un intervalo entre ensayos de 120s, en la que la única diferencia respecto de la fase de adquisición fue la posición de la plataforma, que ocupó el cuadrante opuesto.

2.3.5 MATERIAL Y PROCEDIMIENTO

Se utilizaron un total de 27 ratas Wistar, de 92.04 días (D.S.=3.17) de edad y peso medio de 406g (D.S.=16.36) 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, tratamiento AEIC y aparato de LAM se realizó de forma idéntica a la realizada en los experimentos previos. En esta ocasión, además, se realizó un análisis de la supervivencia según el método de Kaplan-Meier, comparando las curvas de ambos grupos experimentales mediante la prueba de Breslow.

2.3.6 RESULTADOS

2.3.6.1 Sujetos

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

2.3.6.2 Adquisición

La Fig. 7 muestra la media de latencia de escape de cada grupo a lo largo de las 5 sesiones de adquisición. El análisis de la variancia entre las sesiones 1 y 2 (MANOVA) muestra una interacción entre los factores grupo y sesión que no llega a ser significativa [$F(1, 25)=2.62$ $P = 0.1$] ya que ambos grupos presentaron una mejora muy significativa [AEIC $F(1, 25)=49.67$ $P<0.001$; Control $F(1, 25)=29.75$ $P<0.001$]. A pesar de ello, el análisis de los efectos simples dentro de cada sesión muestra que ambos grupos partieron de

medias similares en la sesión 1 y que se diferenciaron significativamente en la sesión 2 [$F(1, 25)=7.42$ $P=0.012$]. El análisis mediante MANOVA del comportamiento entre las sesiones 2 y 5 muestra que, aunque el factor grupo fue significativo considerando el conjunto de sesiones [$F(1, 25)=7.69$, $P=0.010$], el factor interacción grupo por sesión también lo fue [$F(3, 75)=3.033$, $P=0.034$]. Así, el mayor efecto del tratamiento se observa en la sesión 2, a partir de la cual se da una progresiva disminución de las diferencias entre grupos, a medida que va aumentando el número de ensayos acumulado. En resumen, los animales tratados con AEIC mostraron latencias medias significativamente más bajas en el conjunto de sesiones posteriores al inicio de tratamiento, diferencia que fue especialmente marcada en la segunda sesión.

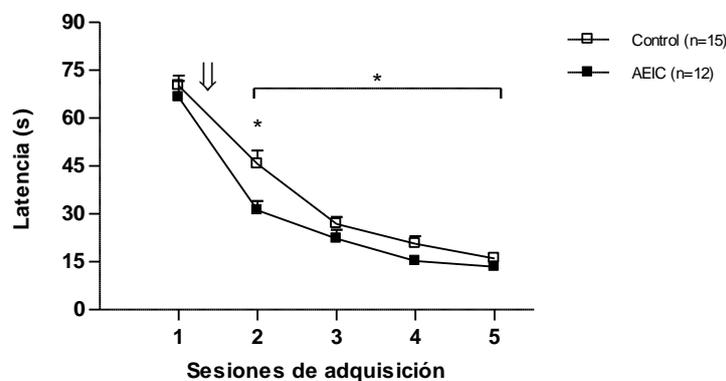


Fig. 13. Latencia media de escape (\pm S.E.) de los animales Control y AEIC en cada una de las sesiones de adquisición en el experimento 0 (* $P<0.05$). Tras la primera sesión de adquisición la flecha señala el momento de administración de la primera de las sesiones de SS. Puede observarse que el factor grupo fue significativo para el conjunto de sesiones posteriores al inicio del tratamiento (sesiones 2 a 5) (* $P<0.05$).

Para estudiar de forma más detallada la evolución del aprendizaje a lo largo de las 5 sesiones de adquisición en cada uno de los grupos experimentales llevamos a cabo un análisis de la supervivencia. Los resultados muestran diferencias significativas entre grupos en la adquisición del criterio de aprendizaje previamente establecido (latencia media para el conjunto de una sesión igual o inferior a 25s) (Breslow $\chi^2 =7.277$ $P=0.007$). El 100% de los animales de ambos grupos consiguieron alcanzar el criterio de aprendizaje en algún momento durante la adquisición, pero los del grupo AEIC lo hicieron en un menor número de sesiones de adquisición. En la Figura X, podemos ver como, por ejemplo, en la sesión 2, cuando aún ningún animal Control había logrado cumplir con el criterio de aprendizaje, ya un

25% de los sujetos AEIC lo había hecho (porcentaje que en el grupo Control no se alcanza hasta la sesión 4). También observamos que al final de la sesión 3 sólo un 16.7% de los sujetos AEIC presenta latencias medias muy altas, superiores a 25s, en comparación al 66.7% de los Control. Por tanto, aunque al final el total de los sujetos de ambos grupos alcanzó el criterio fijado, los animales del grupo AEIC lo adquirieron significativamente antes, con un menor entrenamiento, que los del grupo Control.

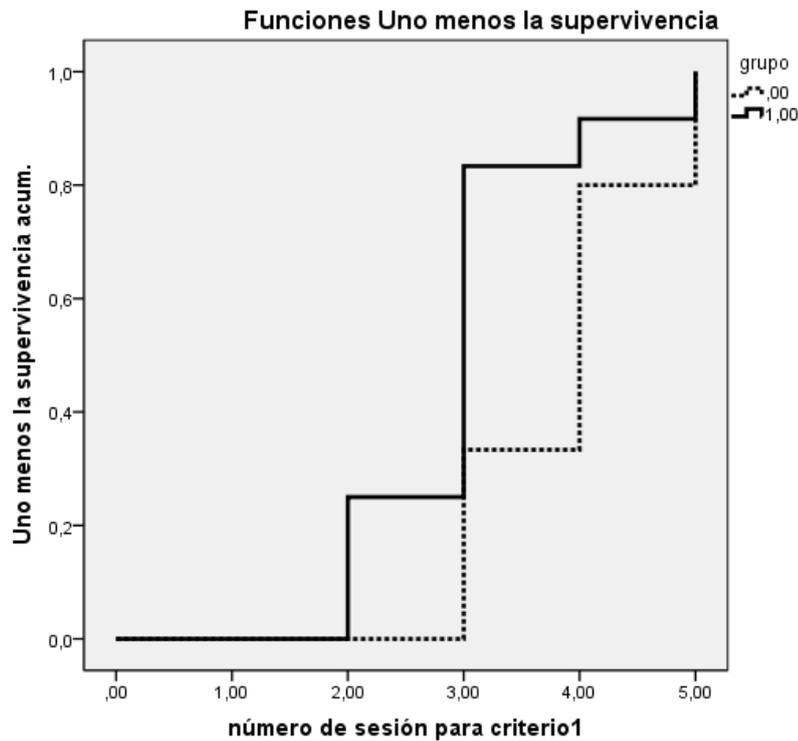


Fig. 14. Análisis de la supervivencia. Criterio: latencia media en una sesión <25s.

Este efecto facilitador se hace aún más manifiesto cuando escogemos un criterio de aprendizaje más restrictivo (Breslow $\chi^2 = 6.103$ $P=0.013$). Por ejemplo, si establecemos 15s de latencia media por sesión como criterio de aprendizaje, observamos que no solo se da una aceleración del aprendizaje. Además observamos que el porcentaje final de animales que alcanzan el criterio fue mayor en el grupo AEIC: un 83.3% frente a un 53.3% de animales del grupo Control. De igual forma podemos ver que en la tercera sesión, cuando ningún animal del grupo Control ha alcanzado aún el criterio, casi un 20% de los animales AEIC ya lo ha hecho. O que en la cuarta sesión, cuando sólo un 20% de los animales Control ha presentado latencias medias inferiores a 15s ya más de un 65% de los AEIC las

ha alcanzado. Estos resultados muestran por tanto que los animales AEIC adquirieron antes la tarea y en mayor proporción que los animales Control no tratados.

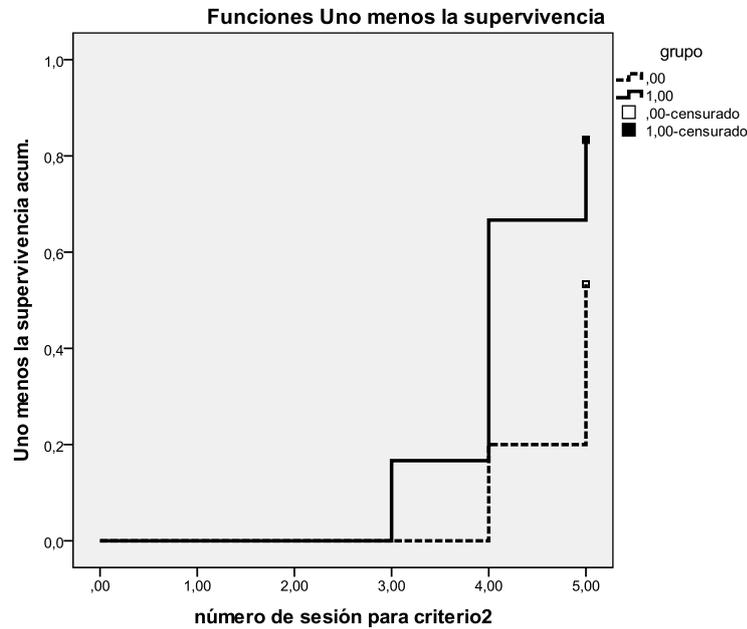


Fig. 15. Análisis de la supervivencia. Criterio: latencia media en una sesión <15s

2.3.6.3 Ensayo de prueba

El análisis mediante *t*-test muestra que aunque el porcentaje de tiempo dedicado por ambos grupos a nadar en el cuadrante target fue significativamente diferente al azar [Control $t=3,520$, $P=0,003$; AEIC $t=10,441$, $P=0,000$], el del grupo AEIC fue significativamente superior al del grupo Control [$t=2,357$, $P=0,028$]. Ambos grupos mostraron pues un nivel de retención significativamente superior al de azar pero el del grupo AEIC fue significativamente superior al del grupo Control.

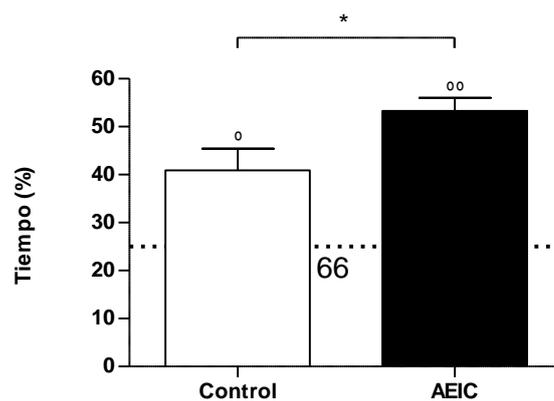


Fig. 16. Porcentaje del total del tiempo del ensayo de prueba (60s) dedicado a nadar en el cuadrante target. El grupo AEIC dedicó un porcentaje significativamente superior al Control a nadar en este cuadrante. Ambos grupos nadaron en este cuadrante un tiempo significativamente superior al azar [$*P<0,05$ entre grupos; $^{\circ}P<0,005$, $^{\circ\circ}P<0,001$ respecto de la probabilidad de azar (marcada con línea punteada)].

2.3.6.4 Test Reversal

Un MANOVA muestra diferencias entre ambos grupos, independientemente de la sesión [F(1, 25)=5,26, P=0,031]. A pesar de ello, el análisis de los efectos simples muestra que esta diferencia fue especialmente marcada en la primera de las tres sesiones [F(1, 25)=6,74, P=0,016], en la que los animales tratados con AEIC tuvieron latencias inferiores.

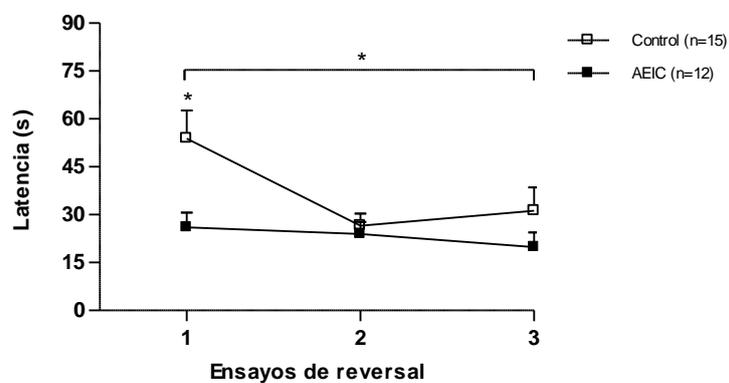


Fig. 17. Latencia media de escape (\pm S.E.) de los animales Control y AEIC a lo largo de los 3 ensayos de la sesión de *reversal* en el experimento 4 (* P<0,05).

2.4 EXPERIMENTO 5

2.4.1 INTRODUCCIÓN

El Experimento 4 muestra que en un paradigma con una mayor cantidad de entrenamiento los animales tratados con AEIC adquirieron antes la tarea espacial, y que esta diferencia fue disminuyendo conforme progresó el número de ensayos. Así mismo se observó, en los animales AEIC, una mayor retención del aprendizaje que la presentada por los animales Control en el ensayo de prueba 10 días más tarde. El nivel de retención del grupo Control fue, no obstante, también muy alto. Partiendo de la hipótesis de que la AEIC modula el proceso de consolidación de la memoria, pensamos que la realización del ensayo de prueba aún a más largo plazo acentuaría más las diferencias observadas entre los sujetos tratados con AEIC y sus controles. Para ello llevamos a cabo un último experimento, siguiendo el diseño del Experimento 4, pero realizando el ensayo de prueba a los 20 días. Tras este ensayo de prueba se llevó a cabo una fase de reversal idéntica a la realizada en el experimento 4. Una vez finalizada la fase de conducta, una submuestra de los animales fue escogida al azar para el análisis de la microestructura de las neuronas del hipocampo, siguiendo la misma metodología utilizada en el Experimento 2.

2.4.2 MATERIAL Y PROCEDIMIENTO

Se utilizaron un total de 41 ratas Wistar, de 93.74 días (D.S.=4.99) de edad y peso medio de 408.70g (D.S.=36.74) 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, tratamiento AEIC y aparato de LAM se realizó de forma idéntica a los experimentos previos. Para el análisis de la supervivencia durante la fase de adquisición se siguió lo expuesto para el experimento 4. El estudio de la microestructura de las células piramidales de CA1 se hizo según la metodología detallada en el experimento 2.

2.4.3 RESULTADOS

2.4.3.1 Sujetos

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

2.4.3.2 Adquisición

La Fig. 10 muestra la media de latencia de escape de cada grupo a lo largo de las 5 sesiones de adquisición. El análisis de la variancia entre las sesiones 1 y 2 (MANOVA) muestra un efecto del tratamiento dependiente de la sesión [factor interacción grupo*sesión $F(1, 39)=14,81$; $P=0.000$]. A pesar de que ambos grupos mostraron una mejora significativa en la latencia, el grupo AEIC mejoró más [AEIC $F(1, 39)=59.57$, $P>0.000$; Control $F(1, 39)=8.64$, $P<0.01$], de forma que las diferencias entre los dos grupos en la segunda sesión fueron significativas [$F(1, 39)=6,78$, $P=0,013$]. El análisis mediante MANOVA del comportamiento entre las sesiones 2 y 5 no muestra diferencias significativas entre grupos. En resumen, los animales tratados con AEIC mostraron una reducción significativa de la latencia que se hizo especialmente marcada tras la introducción del tratamiento, en la segunda sesión.

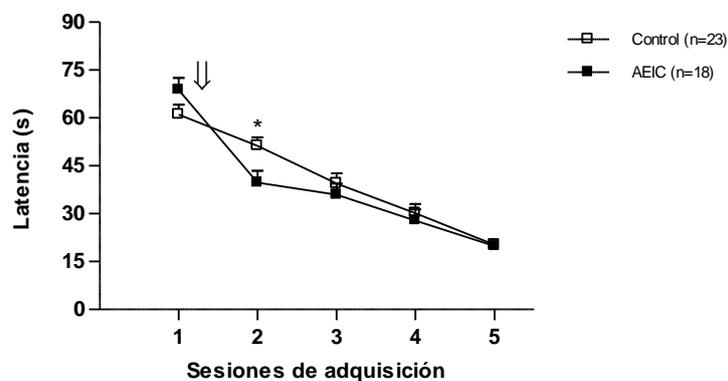


Fig. 18. Latencia media de escape (\pm S.E.) de los animales Control y AEIC en cada una de las sesiones de adquisición en el experimento 0 (* $P<0,05$). Tras la primera sesión de adquisición la flecha señala el momento de administración de la primera de las sesiones de AEIC. Puede observarse que el factor grupo es significativo para el conjunto de sesiones posteriores al inicio del tratamiento (sesiones 2 a 5) (* $P<0,05$).

Se llevó a cabo un análisis de la supervivencia fijando como criterio de aprendizaje una sesión con latencia media igual o inferior a 25s. El análisis muestra que los animales del grupo AEIC adquirieron antes el criterio (Breslow $\chi^2 = 4,081$, $P=0,043$). En la Figura X vemos que el porcentaje final de sujetos que logran el criterio en el conjunto de sesiones fue similar en ambos grupos (de un 83.3% en el grupo AEIC y de un 78.3% en el grupo Control). No obstante vemos también que en la sesión 2 ya un 28% de los animales AEIC había alcanzado el criterio y en la sesión 3 en torno a un 50%, mientras que en esta última sesión sólo un 13% de los animales Control lo había hecho. En resumen, observamos que los animales AEIC adquirieron el criterio de aprendizaje previamente fijado en un menor número de sesiones que los Control.

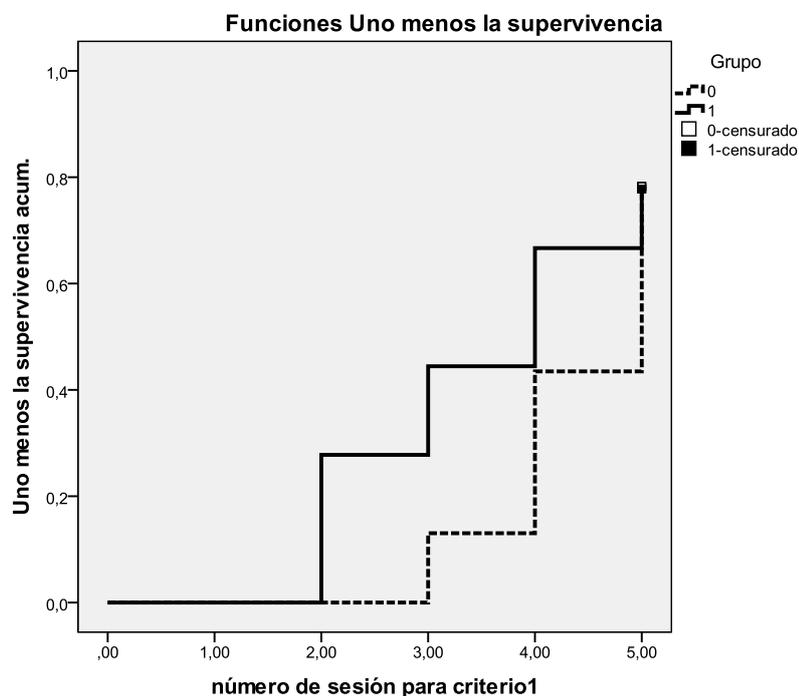


Fig. 19. Análisis de la supervivencia. Criterio: una sesión con media inferior a 25s

2.4.3.3 Ensayo de prueba

El análisis mediante *t*-test muestra que el grupo AEIC dedicó un porcentaje de tiempo significativamente superior a nadar en el cuadrante target respecto del grupo Control [$t=2,821$, $P=0,007$]. En este experimento sólo el grupo AEIC dedicó un porcentaje de tiempo estadísticamente superior al propio del azar a nadar en el cuadrante target [$t=5,338$, $P=0,000$].

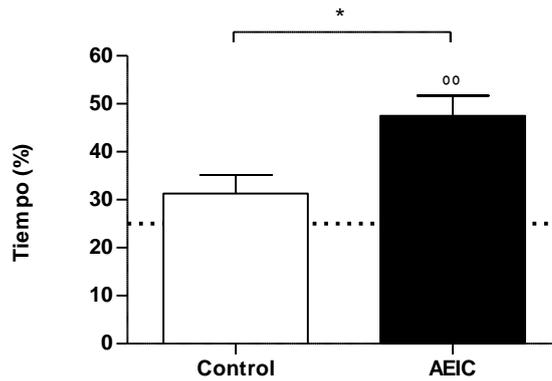


Fig. 20. Porcentaje del total del tiempo del ensayo de prueba (60s) dedicado a nadar en el cuadrante target. El porcentaje de tiempo dedicado por el grupo AEIC fue estadísticamente superior al del grupo Control. Sólo el grupo AEIC dedicó un tiempo significativamente superior al del azar [$*P < 0,05$ entre grupos; $^{\circ}P < 0,01$ respecto de la probabilidad de azar (marcada con línea punteada)].

2.4.3.4 Test Reversal

Un MANOVA no muestra diferencias entre grupos a lo largo de los tres ensayos de la fase *reversal*.

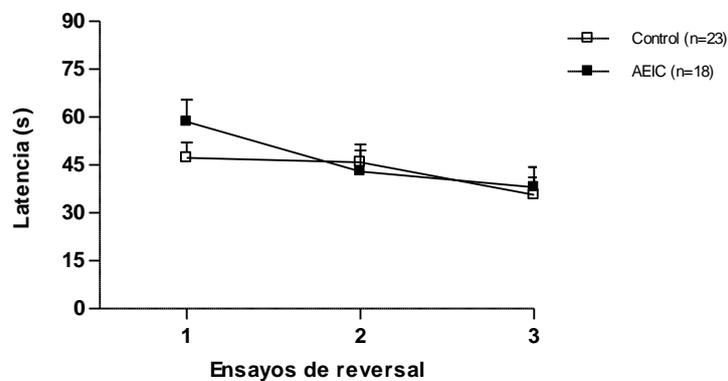


Fig. 21. Latencia media de escape (\pm S.E.) de los animales Control y AEIC a lo largo de los 3 ensayos de la sesión de *reversal* en el experimento 5.

2.4.3.5 Estructura celular en las piramidales de CA1

La submuestra utilizada para el estudio morfológico mediante la técnica de inyección intracelular con amarillo lucifer no difirió de la muestra global en ninguno de los parámetros

de conducta analizados en el LAM. El análisis morfométrico llevado a cabo para examinar los efectos de la AEIC sobre las estructuras apical y basal de neuronas piramidales del hipocampo fue como el detallado en el experimento 2.

2.4.3.5.1 *Tamaño del árbol dendrítico*

La cuantificación del volumen del árbol dendrítico apical reveló que las células de los animales AEIC eran mayores que las de los animales Control (media \pm SD: $33.94 \pm 3.91 \times 10^5 \mu\text{m}^3$ y $24.95 \pm 1.08 \times 10^5 \mu\text{m}^3$, respectivamente). Un análisis de comparación de medias para muestras independientes de dos colas no pareadas reveló que esta diferencia era significativa ($t=6.735$, $P=0.027$). El árbol dendrítico basal también fue mayor en los animales AEIC (media \pm SD: $15.76 \pm 1.42 \times 10^5 \mu\text{m}^3$ y $9.90 \pm 1.06 \times 10^5 \mu\text{m}^3$, respectivamente; $t=0.000$, $P=0.004$).

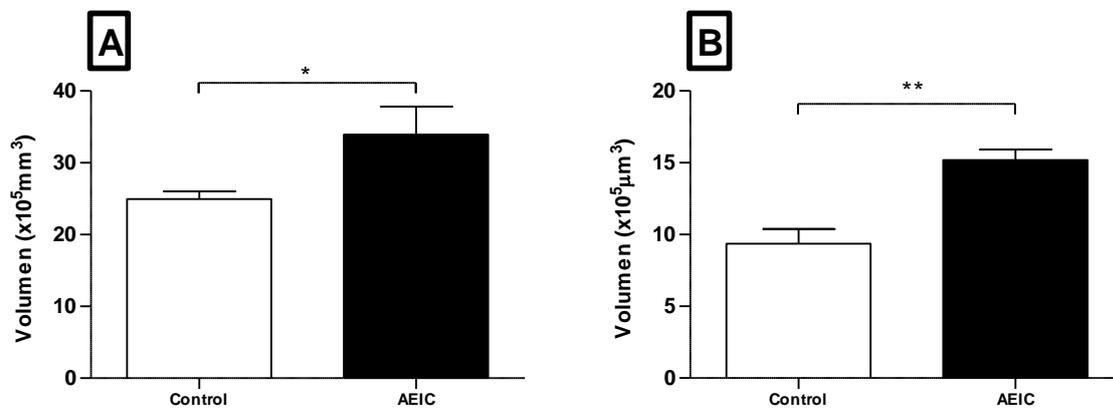


Fig. 22. Volumen de la arborización apical. Puede verse que en las células de los animales AEIC es mayor que en la de los animales Control. Esta diferencia fue estadísticamente significativa [$*P<0,05$; $**P<0,005$ entre grupos]

2.4.3.5.2 *Patrón de arborización y longitud de las ramificaciones*

La longitud total de las ramificaciones dendríticas basales y apicales también fue analizada. Como puede verse en la figura X, el árbol dendrítico apical de CA1 en los

animales AEIC fue significativamente más largo que el de los animales Control ($3.26 \pm 0.28 \times 10^3 \mu\text{m}$ y $2.54 \pm 0.10 \times 10^3 \mu\text{m}$, respectivamente; $t=5.842$, $P=0.018$). La longitud del árbol dendrítico basal también fue superior en los animales AEIC ($1.87 \pm 0.05 \times 10^3 \mu\text{m}$ y $1.46 \pm 0.09 \times 10^3 \mu\text{m}$, respectivamente; $t=2.394$, $P=0.002$). No se observaron diferencias significativas en el número de ramas, ni en la arborización apical ni en la basal.

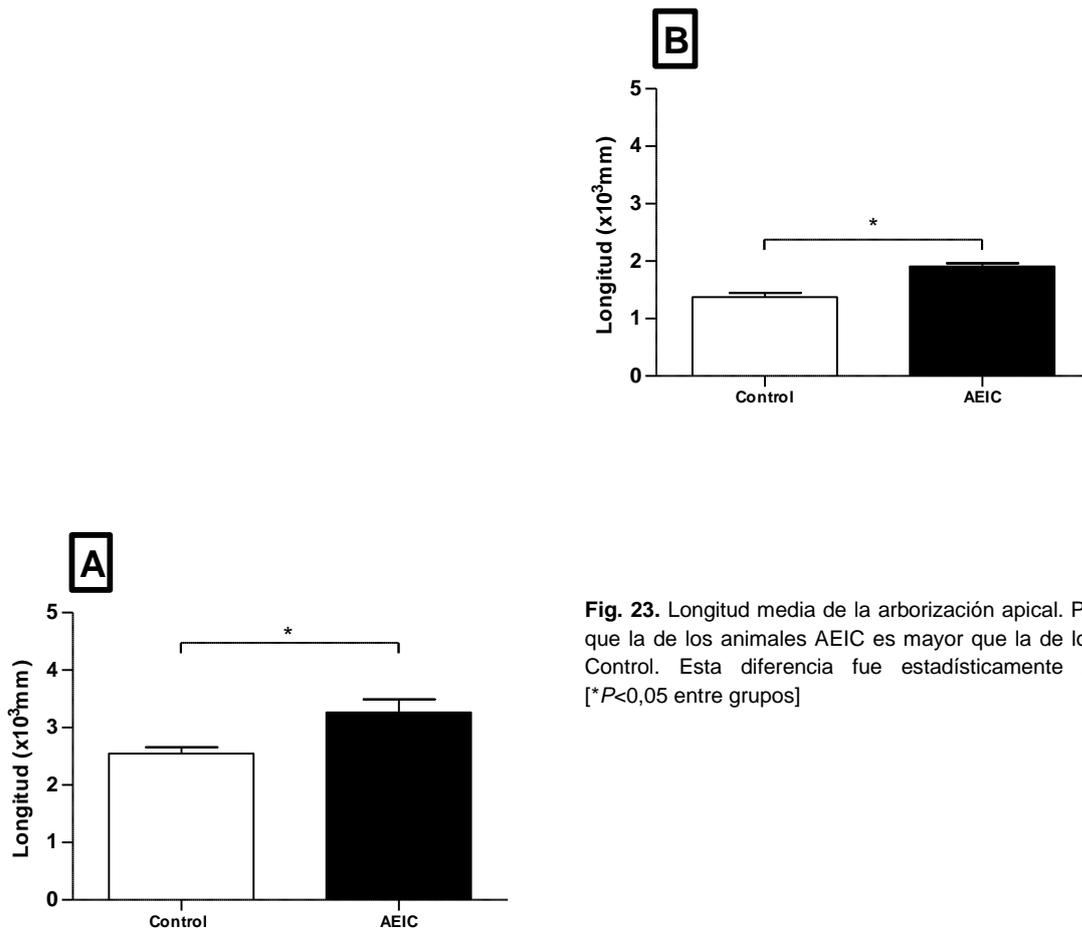
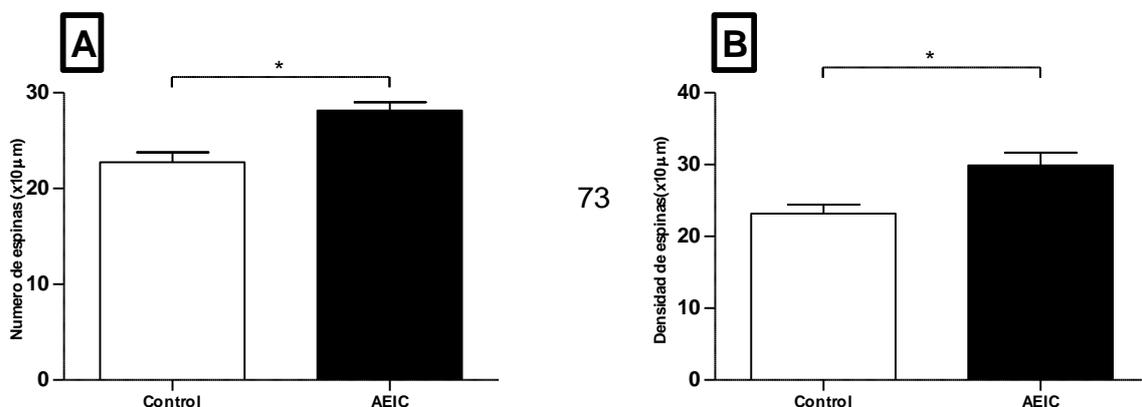


Fig. 23. Longitud media de la arborización apical. Puede verse que la de los animales AEIC es mayor que la de los animales Control. Esta diferencia fue estadísticamente significativa [$*P<0,05$ entre grupos]

2.4.3.5.3 Densidad y distribución de las espinas

La diferencia en la densidad de espinas entre los dos grupos fue significativa. La densidad de espinas fue significativamente superior en los animales tratados con AEIC,



tanto en arborización dendrítica apical (media \pm DS: 2.81 ± 0.08 y 2.27 ± 0.10 , respectivamente; $t=3.756$; $P=0.004$) como en la basal (2.99 ± 0.17 y 2.32 ± 0.12 , respectivamente; $t_{3.221}$; $P_{0.009}$).

Fig. 24. A. Densidad media de espinas dendríticas apicales. B. Densidad media de espinas dendríticas basales. Puede verse que en ambos casos en los animales AEIC es mayor [$*P<0,005$ entre grupos]

IV. DISCUSIÓN

DISCUSIÓN GENERAL

Los resultados obtenidos en los experimentos que hemos realizado confirman la capacidad de la AEIC en el HPM para facilitar el aprendizaje y la consolidación de la memoria. Esto concuerda con resultados previos de nuestro y otros laboratorios que demuestran una facilitación de la memoria relacional en el LAM (Ruiz-Medina, I. Morgado-Bernal, et al. 2008) y en otras tareas hipocampo-dependientes (Soriano-Mas et al. 2005; Yoganarasimha et al. 1998), así como de la memoria implícita evaluada en diferentes paradigmas de condicionamiento (Ruiz-Medina, D. Redolar-Ripoll, et al. 2008; D. Redolar-Ripoll et al. 2002; Coulombe and N. White 1982; Coulombe and N White 1980).

En primer lugar, consideramos que un aspecto del presente trabajo que cabe destacar es que la facilitación se observó en cada uno de los experimentos realizados. Es decir que, a pesar de la alta variabilidad que supone el trabajo con variables cognitivas en psicobiología e incluso en muestras de sujetos relativamente pequeñas, se ha visto claramente replicado en distintas condiciones experimentales. Por ejemplo, al comparar la fase de adquisición de los experimentos 4 y 5, podemos observar como las latencias de escape del grupo Control fueron más altas en el experimento 5, pero a pesar de ello, estas diferencias se reprodujeron entre los grupos AEIC, de forma que los grupos tratados con AEIC siempre fueron superiores a sus respectivos controles.

Otro aspecto relevante que se desprende del conjunto de resultados es que el efecto facilitador de la AEIC sobre el aprendizaje, especialmente sobre la adquisición del mismo, parece depender de la cantidad de entrenamiento a la que se somete a los sujetos. Así observamos que cuando seguimos un protocolo de entrenamiento más intenso como ocurre en los experimentos 4 y 5 (6 ensayos por sesión), la AEIC parece provocar una aceleración de la consolidación de la memoria, haciendo que las ratas tratadas aprendan antes, es decir con un menor número de sesiones, que los animales sin tratamiento. Este efecto se diluye en las últimas sesiones de entrenamiento, cuando los Controles también llegan a aprender, pudiendo igualarse su ejecución a la de los animales tratados. En cambio, cuando el número de ensayos por sesión fue más bajo, como ocurre en los experimentos 1 al 3 (2 ensayos por sesión), vemos que la AEIC parece actuar como un potenciador de la consolidación de la

memoria, permitiendo que los animales tratados lleguen a aprender en unas condiciones experimentales en las que no se consigue sin tratamiento. Estos resultados apoyan la hipótesis de que la AEIC es especialmente útil para facilitar el aprendizaje en condiciones difíciles, como en diseños experimentales de muy poco entrenamiento (Ruiz-Medina, D. Redolar-Ripoll, et al. 2008), o en sujetos que presentan diferentes grados de amnesia para una determinada tarea derivados tanto de la edad (L. Aldavert-Vera et al. 1997) como de lesión cerebral (P. Segura-Torres et al. 1996; D. Redolar-Ripoll et al. 2003; Pilar Segura-Torres et al. 2010).

Por otra parte, estos resultados obtenidos en los experimentos con un número bajo de ensayos por sesión parecen respaldar también la hipótesis de que la AEIC actuaría sobre los procesos de memoria de forma similar a como lo hace el propio entrenamiento (D. Redolar-Ripoll et al. 2002). Es decir, la AEIC activaría una serie de mecanismos que serían comunes a aquellos que activaría el propio entrenamiento en su acción sobre diferentes sistemas de memoria, y sobre el de la memoria explícita del hipocampo específicamente. A favor de ello, estudios de nuestro laboratorio han puesto de manifiesto que la AEIC promueve la expresión de genes relacionados con plasticidad, neuroprotección y aprendizaje y memoria en el hipocampo (Huguet et al. 2009).

Un objetivo importante del trabajo era estudiar la persistencia a largo plazo de la memoria facilitada por AEIC, una cuestión sobre la que prácticamente no hay antecedentes experimentales en lo que se refiere a una tarea de memoria explícita. Nuestros resultados nos han permitido responder afirmativamente a este objetivo, ya que han puesto de manifiesto que la memoria facilitada por AEIC es más duradera y se debilita menos con el paso del tiempo que la de los animales Control. Así, si comparamos los resultados de los experimentos 4 y 5, vemos que al duplicar la longitud del intervalo entre la fase de adquisición y el ensayo de prueba de 10 a 20 días, los animales Control presentaron un debilitamiento muy importante de la memoria, mientras que los animales AEIC mantuvieron a los 20 días un nivel de memoria todavía considerable. Esto confirma resultados previos en que, en una tarea de memoria implícita de evitación activa en dos sentidos, los animales AEIC mostraron una mayor memoria de lo aprendido en un test llevado a cabo a los 30 días (P Segura-Torres et al. 1991).

Finalmente, referente a los resultados conductuales, cabe destacar que los resultados de la prueba *reversal* en el experimento 4 sugieren que la AEIC podría actuar también aumentando la flexibilidad en la aplicación de un aprendizaje previamente adquirido a unas condiciones nuevas. La prueba *reversal* en el LAM admite diferentes interpretaciones, pero

se ha defendido que es una prueba de reaprendizaje, porque en ella los animales tienen que aprender la nueva localización de la plataforma, y que permite evaluar flexibilidad cognitiva. Esto está en la línea de resultados previos en los que la AEIC facilitó la aplicación a una situación de *reversal* de un aprendizaje previo en el laberinto en T (Soriano-Mas et al. 2005). Además hay evidencia de que el tratamiento con AEIC provoca cambios morfológicos en el córtex prefrontal de la rata, que sugieren una posible potenciación de funciones ejecutivas similares a la observada sobre funciones hipocampo-dependientes (Ramkumar et al. 2011). Hay que decir que las diferencias observadas en este experimento no se confirmaron en el experimento 5, cuando el ensayo de prueba y la fase de *reversal* se llevaron a cabo 20 días después de finalizada la adquisición.

El segundo objetivo general planteado fue explorar la asociación entre los posibles cambios morfológicos que la AEIC induce en el hipocampo de la rata y la facilitación del aprendizaje y la memoria que también origina. En relación a este objetivo, se ha observado que la facilitación por AEIC de la tarea espacial en el LAM va acompañada de una serie de cambios morfológicos en las neuronas hipocampales del área CA1. Concretamente, los animales cuyo aprendizaje fue facilitado por la AEIC presentan una mayor complejidad en la arborización y una mayor densidad de espinas dendríticas. Esta modificación en la morfología hipocampal se observa tanto 3 días como 20 días después de la administración de AEIC tras el entrenamiento, por lo que podemos afirmar que, además, este efecto se mantiene a largo plazo. Si bien ambos fenómenos, facilitación de la memoria y cambios morfológicos neuronales, se habían observado por separado (Ruiz-Medina, I. Morgado-Bernal, et al. 2008; Shankaranarayana Rao et al. 1997; Ramkumar et al. 2011; Shankaranarayana Rao, T. R. Raju, and B. L. Meti 1998b) esta es la primera vez que se observa la facilitación de una tarea espacial en el LAM a la vez que cambios morfológicos en una región como el hipocampo, clave para este tipo de aprendizaje. Nuestros resultados confirman otros previos también en neuronas piramidales de hipocampo, aún cuando la mayor parte de estos estudios no incluyeran una prueba de conducta para medir la relevancia funcional de tales cambios (Shankaranarayana Rao et al. 1997, 1993; Shankaranarayana Rao, T. R. Raju, and B. L. Meti 1998b, 1998a). Igualmente concuerdan con el hecho de que la AEIC ha mostrado ser capaz de revertir la atrofia en las neuronas hipocampales y del córtex prefrontal derivada del tratamiento de estrés crónico (Ramkumar et al. 2008, 2011).

Como se vió en el punto 1.5 del Marco Teórico, los efectos de la AEIC sobre el hipocampo son variados, pero en su conjunto respaldan la idea de que la AEIC aumenta las

condiciones de conectividad en esta región. Además de los cambios morfológicos que acabamos de describir, esta idea está apoyada por otras evidencias experimentales. Así, mediante el estudio comparativo de la expresión de genes de expresión temprana, se ha comprobado que la AEIC activa diferencialmente diferentes subáreas de esta estructura (Huguet et al. 2009). Además, la AEIC aumenta los niveles de distintos neurotransmisores (Shankaranarayana Rao, T. R. Raju, and B. L. Meti 1998a) y la expresión de genes (Huguet et al., 2009) involucrados en procesos de aprendizaje y memoria. La AEIC también parece incrementar los niveles de neurogénesis en el giro dentado, un factor que se ha mostrado importante en el mantenimiento a largo plazo de la memoria hipocampo-dependiente. Además, también parece promover la supervivencia e integración de las nuevas neuronas en circuitos activados en una tarea espacial (Takahashi et al. 2009). En este sentido, Snyder et al. (2005) irradiaron a bajas dosis el giro dentado para inhibir la neurogénesis durante la adquisición de una tarea espacial en el LAM. Estos autores observaron que los animales irradiados, aunque no eran diferentes de los Control en un ensayo de prueba a los 7 días, mostraban mucha menor retención en ensayos de prueba a más largo plazo realizados a las 2 y 4 semanas de la adquisición. Finalmente, en nuestro laboratorio recientemente hemos observado que la AEIC promueve un incremento tanto en la expresión del gen como en la síntesis de la proteína Arc (Kádár et al. 2010), muy relacionada con la dinámica de polimerización de la proteína actina, y que se da especialmente en las regiones por las que se extiende la arborización dendrítica de las neuronas piramidales en CA1, pudiendo contribuir así a los cambios morfológicos observados en el presente trabajo.

En conjunto los presentes resultados confirman la hipótesis de que la AEIC facilita el aprendizaje actuando posiblemente sobre diferentes sistemas de memoria, y clara y específicamente sobre el de la memoria explícita hipocampo-dependiente; y que lo hace provocando cambios similares a los del propio aprendizaje como, entre otros efectos, modificando la morfología de las neuronas de las regiones implicadas que afectan a las posibilidades de conectividad de las mismas. Aun con todo, hemos de decir que para seguir avanzando en la hipótesis explicativa del fenómeno observado de facilitación, es interesante otro tipo de estudio que permita, mediante la manipulación experimental de diferentes parámetros, extraer conclusiones de tipo causal entre los efectos conductuales y los efectos observados a nivel morfológico. La presente investigación supone una buena base experimental desde la que llevar a cabo futuros desarrollos. De una parte valoramos la posibilidad de actuar sobre los mecanismos responsables de la dinámica de la actina, bien silenciando algún gen responsable de alguna de las moléculas involucradas en los mecanismos de polimerización de esta proteína, bien directamente bloqueando en algún

punto alguna de las cascadas moleculares implicadas. Por otra parte, otra posible línea de continuación podría ser profundizar aún más en las características concretas de los cambios morfológicos observados, por ejemplo entrando a valorar no sólo la densidad sino también la morfología de las espinas, aspecto que, como se ha visto anteriormente, está fuertemente ligado a la consolidación a largo plazo de la memoria. Otra perspectiva futura pasa por el estudio de la relación entre el tratamiento de AEIC y los cambios en el ritmo de neurogénesis en giro dentado.

Si tomamos en conjunto los resultados de los experimentos aquí presentados y los del trabajo previamente citado (Ruiz-Medina, I. Morgado-Bernal, et al. 2008), y teniendo en cuenta las variaciones en términos de protocolo experimental y de configuración del aparato utilizados, el efecto facilitador de la AEIC no parece restringido a condiciones experimentales demasiado específicas, sino que parece tratarse de un efecto general sobre el proceso de consolidación de la memoria, lo cual puede aumentar el interés de la AEIC desde el punto de vista de la posible extrapolación de los resultados de su investigación al ámbito de la terapia cognitiva en humanos. Ciertamente, el efecto de la estimulación eléctrica parece alterar la morfología hipocampal de tal modo que facilita los procesos fisiológicos que tienen lugar en el lóbulo temporal medial del cerebro para facilitar el aprendizaje y la formación de la memoria. La AEIC podría activar los complicados mecanismos bioquímicos que, como ya explicamos, tienen lugar en los circuitos hipocampales para, activando enzimas y mecanismos de síntesis proteicas en las neuronas correspondientes, generar nuevas espinas dendríticas y conexiones sinápticas implicadas en el proceso de facilitación del aprendizaje y formación de nuevas memorias.

Nuestro objetivo a largo plazo es que, siguiendo un línea de investigación múltiple como la que venimos desarrollando en los experimentos de esta tesis y en los demás que tienen lugar en nuestro laboratorio, contribuir de forma significativa al conocimiento de fundamentos básicos que permita el avance de los tratamientos terapéuticos en curso experimental que se vienen desarrollando para tratar de aliviar los síntomas de las principales enfermedades mentales.

V. REFERENCIAS

REFERENCIAS

- Aldavert-Vera L., Costa-Miserachs D, Massanés-Rotger E, Soriano-Mas C, Segura-Torres P., Morgado-Bernal I., and Massanes-Rotger E. 1997. Facilitation of a distributed shuttle-box conditioning with posttraining intracranial self-stimulation in old rats. *Neurobiology of learning and memory* **67**: 254-8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9159763>.
- Aldavert-Vera L, Segura-Torres P, Costa-Miserachs D, and Morgado-Bernal I. 1996. Shuttle-box memory facilitation by posttraining intracranial self-stimulation: differential effects in rats with high and low basic conditioning levels. *Behavioral neuroscience* **110**: 346-52. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8731061> (Accessed May 11, 2012).
- Alvarez VA, and Sabatini B. L. 2007. Anatomical and physiological plasticity of dendritic spines. *Annual Review of Neuroscience* **30**: 79-97.
- Arellano J I, Espinosa a, Fairén a, Yuste R, and DeFelipe J. 2007. Non-synaptic dendritic spines in neocortex. *Neuroscience* **145**: 464-9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17240073> (Accessed May 10, 2012).
- Arellano Jon I., Benavides-Piccione Ruth, DeFelipe Javier, and Yuste Rafael. 2007. Ultrastructure of Dendritic Spines: Correlation Between Synaptic and Spine Morphologies. *Frontiers in Neuroscience* **1**: 131-143. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2518053/>.
- Astur RS, Taylor LB, Mamelak AN, Philpott L, and Sutherland RJ. 2002. Humans with hippocampus damage display severe spatial memory impairments in a virtual Morris water task. *Behavioural brain research* **132**: 77-84. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11853860>.
- BISHOP MP, ELDER ST, and HEATH RG. 1963. Intracranial self-stimulation in man. *Science (New York, N.Y.)* **140**: 394-396.
- Benavides-Piccione R., Dierssen M, Ballesteros-Yáñez I, Martínez de Lagrán M, Arbonés ML, Fotaki V, DeFelipe J., and Elston G.N. 2005. Alterations in the phenotype of

- neocortical pyramidal cells in the Dyrk1A^{+/-} mouse. *Neurobiology of Disease* **20**: 115-122. <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WKNK-4FX10B5-1/2/734900cdcf64c66be39a0ed6062ee48d> (Accessed February 4, 2011).
- Berridge KC, and Robinson TE. 1998. What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? *Brain research. Brain research reviews* **28**: 309-69. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9858756>.
- Bespalov A, and Zvartau E. 1997. NMDA receptor antagonists prevent conditioned activation of intracranial self-stimulation in rats. *European Journal of Pharmacology* **326**: 109-112. [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-2999\(97\)85403-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-2999(97)85403-9) (Accessed May 29, 2012).
- Bewernick BH, Hurlmann R, Matusch A, Kayser S, Grubert C, Hadrysiewicz B, Axmacher N, Lemke M, Cooper-Mahkorn D, Cohen MX, et al. 2010. Nucleus accumbens deep brain stimulation decreases ratings of depression and anxiety in treatment-resistant depression. *Biological psychiatry* **67**: 110-6. <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T4S-4XPBSNK-1/2/6bf6cecaca8365852c96b84743d066fc> (Accessed February 28, 2011).
- Bindu PN, and 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. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)91079-V](http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993(90)91079-V) (Accessed April 27, 2012).
- Blaha CD, and Phillips Anthony 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. [http://dx.doi.org/10.1016/0165-0270\(90\)90050-P](http://dx.doi.org/10.1016/0165-0270(90)90050-P) (Accessed May 10, 2012).
- Bliss TV, and Lomo T. 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of physiology* **232**: 331-56. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1350458&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (Accessed March 28, 2012).
- von Bohlen Und Halbach O. 2009. Structure and function of dendritic spines within the hippocampus. *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger: official organ of the*

Anatomische Gesellschaft **191**: 518-31. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19783417> (Accessed January 23, 2012).

Brandeis R, Brandys Y, and Yehuda S. 2009. The Use of the Morris Water Maze in the Study of Memory and Learning. <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/00207458909002151> (Accessed May 29, 2012).

Cahill L, and McGaugh JL. 1998. Mechanisms of emotional arousal and lasting declarative memory. *Trends in neurosciences* **21**: 294-9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9683321>.

Cain D P, Saucier D, Hall J, Hargreaves EL, and Boon F. 1996. 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. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8652076> (Accessed May 29, 2012).

Cain D P. 1998. Testing the NMDA, long-term potentiation, and cholinergic hypotheses of spatial learning. *Neuroscience and biobehavioral reviews* **22**: 181-93. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9579310> (Accessed May 29, 2012).

Cain Donald P. 1997. Prior non-spatial pretraining eliminates sensorimotor disturbances and impairments in water maze learning caused by diazepam. *Psychopharmacology* **130**: 313-319. <http://www.springerlink.com/content/8ebuqyepk3nbdy/> (Accessed May 29, 2012).

Cain Donald Peter. 1997. LTP, NMDA, genes and learning. *Current Opinion in Neurobiology* **7**: 235-242. [http://dx.doi.org/10.1016/S0959-4388\(97\)80012-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0959-4388(97)80012-8) (Accessed May 29, 2012).

Carlezon WA, and Chartoff EH. 2007. Intracranial self-stimulation (ICSS) in rodents to study the neurobiology of motivation. *Nature protocols* **2**: 2987-2995. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18007634> (Accessed July 29, 2011).

Carlezon WA, and Wise Roy A. 1993. Morphine-induced potentiation of brain stimulation reward is enhanced by MK-801. *Brain Research* **620**: 339-342. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993\(93\)90177-O](http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993(93)90177-O) (Accessed May 29, 2012).

- Carlisle HJ, and Snyder E. 1970. The interaction of hypothalamic self-stimulation and temperature regulation. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **26**: 1092-1093.
- Castro-Alamancos M a, and Connors BW. 1996. Short-term plasticity of a thalamocortical pathway dynamically modulated by behavioral state. *Science (New York, N.Y.)* **272**: 274-7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8602513>.
- Di Chiara G, Tanda D, Frau R, and 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**: 398-402.
- Colle LM, and Wise Roy A. 1988. Effects of nucleus accumbens amphetamine on lateral hypothalamic brain stimulation reward. *Brain Research* **459**: 361-368. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993\(88\)90653-1](http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993(88)90653-1) (Accessed May 10, 2012).
- Conway EL. 1998. Brain lesions and delayed water maze learning deficits after intracerebroventricular spermine. *Brain research* **800**: 10-20. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9685571>.
- Corbett Dale. 1990. Differences in sensitivity to neuroleptic blockade: Medial forebrain bundle versus frontal cortex self-stimulation. *Behavioural Brain Research* **36**: 91-96. [http://dx.doi.org/10.1016/0166-4328\(90\)90163-9](http://dx.doi.org/10.1016/0166-4328(90)90163-9) (Accessed May 10, 2012).
- Corbett Dale, and Wise Roy A. 1980. Intracranial self-stimulation in relation to the ascending dopaminergic systems of the midbrain: A moveable electrode mapping study. *Brain Research* **185**: 1-15. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993\(80\)90666-6](http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993(80)90666-6) (Accessed May 10, 2012).
- Corbetta M, and Shulman GL. 2002. Control of goal-directed and stimulus-driven attention in the brain. *Nature reviews. Neuroscience* **3**: 201-15. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11994752> (Accessed March 1, 2012).
- Coulombe D, and White N. 1982. The effect of post-training hypothalamic self-stimulation on sensory preconditioning in rats. *Canadian journal of psychology* **36**: 57-66.
- Coulombe D, and White N. 1980. The effect of post-training lateral hypothalamic self-stimulation on aversive and appetitive classical conditioning. *Physiology & Behavior* **25**: 267-272. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7413832> (Accessed July 27, 2010).

- Crabbe JC. 1999. Genetics of Mouse Behavior: Interactions with Laboratory Environment. *Science* **284**: 1670-1672. <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.284.5420.1670> (Accessed March 22, 2012).
- Cressant a, Muller RU, and Poucet B. 1997. Failure of centrally placed objects to control the firing fields of hippocampal place cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **17**: 2531-42. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9065513>.
- Crow TJ. 1972. Catecholamine-containing neurones and electrical self-stimulation. 1. A review of some data. *Psychological medicine* **2**: 414-21. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4348150>.
- Dalm S, Grootendorst J, Kloet ER, and Oitzl MS. 2000. Quantification of swim patterns in the morris water maze. *Behavior Research Methods, Instruments, & Computers* **32**: 134-139. <http://www.springerlink.com/content/n84547v831108670/> (Accessed May 29, 2012).
- Daselaar SM, Fleck MS, and Cabeza R. 2006. Triple dissociation in the medial temporal lobes: recollection, familiarity, and novelty. *Journal of neurophysiology* **96**: 1902-11. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16738210> (Accessed March 6, 2012).
- DeFelipe Javier. 2006. Brain plasticity and mental processes: Cajal again. *Nature reviews. Neuroscience* **7**: 811-7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16988656>.
- Destrade C, and Jaffard R. 1978. Post-trial hippocampal and lateral hypothalamic electrical stimulation. *Behavioral Biology* **22**: 354-374. [http://dx.doi.org/10.1016/S0091-6773\(78\)92441-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0091-6773(78)92441-0) (Accessed May 11, 2012).
- Dieter SE. 1977. Preexposure to situational cues and shock intensity in two-way avoidance learning. *Animal Learning & Behavior* **5**: 403-406. <http://www.springerlink.com/content/0110263408860133/> (Accessed May 29, 2012).
- D'Hooge R, and De Deyn PP. 2001. *Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory*. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165017301000674> (Accessed May 26, 2011).

- Easterling KW, Plovnick RM, and Holtzman SG. 2000. Acute opioid but not benzodiazepine dependence in rats responding for intracranial self-stimulation. *Psychopharmacology* **148**: 263-71. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10755739>.
- Eichenbaum H, Dudchenko P, Wood E, Shapiro M, and Tanila H. 1999. The hippocampus, memory, and place cells: is it spatial memory or a memory space? *Neuron* **23**: 209-26. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10399928>.
- Eichenbaum H, Yonelinas AP, and Ranganath C. 2007. The medial temporal lobe and recognition memory. *Annual review of neuroscience* **30**: 123-52. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2064941&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (Accessed March 6, 2012).
- Elston G N, Benavides-Piccione R, and DeFelipe J. 2001. The pyramidal cell in cognition: a comparative study in human and monkey. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* **21**: RC163. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11511694>.
- Elston G N, and Rosa MG. 1997. The occipitoparietal pathway of the macaque monkey: comparison of pyramidal cell morphology in layer III of functionally related cortical visual areas. *Cerebral cortex (New York, N.Y.: 1991)* **7**: 432-52. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9261573>.
- Engert F, and Bonhoeffer T. 1999. Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature* **399**: 66-70. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10331391>.
- Feenstra MG, and Botterblom MH. 1996. Rapid sampling of extracellular dopamine in the rat prefrontal cortex during food consumption, handling and exposure to novelty. *Brain research* **742**: 17-24. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9117391> (Accessed May 22, 2012).
- Fibiger H C, and Jakubovic A. 1987. The Role of Dopamine Tegmental Area in Intracranial Self-Stimulation of the Ventral. **7**.
- Fischer M, Kaech S, Wagner U, Brinkhaus H, and Matus a. 2000. Glutamate receptors regulate actin-based plasticity in dendritic spines. *Nature neuroscience* **3**: 887-94. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10966619>.

- Fitzgerald LW, and Dokla CPJ. 1989. Morris water task impairment and hypoactivity following cysteamine-induced reductions of somatostatin-like immunoreactivity. *Brain Research* **505**: 246-250. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993\(89\)91450-9](http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993(89)91450-9) (Accessed May 29, 2012).
- Fouriez G, and Wise Roy A. Pimozide-induced extinction of intracranial self-stimulation: Response patterns rule out motor or performance deficits.
- Fuxe K, Kalia LF, Golstein M, Andersson K, and Härfstrand A. 1985. Dopaminergic systems in the brain and pituitary. In *The dopaminergic system* (eds. E. Flückiger, E.E. Müller, and M.O. Thorner), pp. 11-25, Springer-Verlag, Berlin.
- Gallagher M, and Holland PC. 1992. Preserved configural learning and spatial learning impairment in rats with hippocampal damage. *Hippocampus* **2**: 81-8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1308174> (Accessed May 29, 2012).
- Garris PA, Kilpatrick M, Bunin MA, Michael D, Walker QD, and Wightman R M. 1999. Dissociation of dopamine release in the nucleus accumbens from intracranial self-stimulation. *Nature* **398**: 67-9. <http://dx.doi.org/10.1038/18019> (Accessed May 22, 2012).
- Geinisman Y. 2000. Structural synaptic modifications associated with hippocampal LTP and behavioral learning. *Cerebral cortex (New York, N.Y.: 1991)* **10**: 952-62. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11007546>.
- Granon S, and Poucet Bruno. 1995. Medial prefrontal lesions in the rat and spatial navigation: Evidence for impaired planning. *Behavioral Neuroscience* **109**: 474-484.
- Gratton A, Hoffer BJ, and Gerhardt GA. 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. [http://dx.doi.org/10.1016/0361-9230\(88\)90247-X](http://dx.doi.org/10.1016/0361-9230(88)90247-X) (Accessed May 10, 2012).
- Graybiel AM. 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* **87**: 6912-6916. <http://www.pnas.org/cgi/content/abstract/87/17/6912> (Accessed May 22, 2012).

- Guarraci F a, and Kapp BS. 1999. An electrophysiological characterization of ventral tegmental area dopaminergic neurons during differential pavlovian fear conditioning in the awake rabbit. *Behavioural brain research* **99**: 169-79. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10512583>.
- Hamani C, McAndrews MP, Cohn M, Oh M, Zumsteg D, Shapiro CM, Wennberg R a, and Lozano AM. 2008. Memory enhancement induced by hypothalamic/fornix deep brain stimulation. *Annals of neurology* **63**: 119-23. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18232017> (Accessed March 11, 2012).
- Hatfield T, and McGaugh JL. 1999. Norepinephrine infused into the basolateral amygdala posttraining enhances retention in a spatial water maze task. *Neurobiology of learning and memory* **71**: 232-9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10082642> (Accessed May 29, 2012).
- Hebert LE, Scherr PA, Bienias JL, Bennett DA, and Evans DA. 2003. Alzheimer Disease in the US Population. **60**.
- Herberg LJ, and Rose IC. 1990. Excitatory amino acid pathways in brain-stimulation reward. *Behavioural brain research* **39**: 230-9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1978779> (Accessed May 29, 2012).
- Herberg LJ, and Rose IC. 1989. The effect of MK-801 and other antagonists of NMDA-type glutamate receptors on brain-stimulation reward. *Psychopharmacology* **99**: 87-90. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2550989> (Accessed May 29, 2012).
- Hering H, and Sheng M. 2001. Dendritic spines: structure, dynamics and regulation. *Nature reviews.Neuroscience* **2**: 880-888.
- Hernandez G, Hamdani S, Rajabi H, Conover K, Stewart J, Arvanitogiannis A, and Shizgal P. 2006. Prolonged rewarding stimulation of the rat medial forebrain bundle: neurochemical and behavioral consequences. *Behavioral neuroscience* **120**: 888-904. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16893295> (Accessed March 26, 2012).
- Hernandez L, and Hoebel Bartley G. 1988. Feeding and hypothalamic stimulation increase dopamine turnover in the accumbens. *Physiology & Behavior* **44**: 599-606. [http://dx.doi.org/10.1016/0031-9384\(88\)90324-1](http://dx.doi.org/10.1016/0031-9384(88)90324-1) (Accessed May 10, 2012).

- Holscher C, and Hölscher C. 1999. Stress impairs performance in spatial water maze learning tasks. *Behavioural brain research* **100**: 225-35. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10212070>.
- Holtmaat A, and Svoboda K. 2009. Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain. *Nature reviews.Neuroscience* **10**: 647-658.
- Hope B, Kosofsky B, Hyman SE, and Nestler EJ. 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**: 5764-8. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=402098&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Horger BA, and Roth RH. 1996. The role of mesoprefrontal dopamine neurons in stress. *Critical reviews in neurobiology* **10**: 395-418. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8978988> (Accessed May 22, 2012).
- Horvitz JC, Stewart T, and Jacobs BL. 1997. Burst activity of ventral tegmental dopamine neurons is elicited by sensory stimuli in the awake cat. *Brain Research* **759**: 251-258. [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-8993\(97\)00265-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-8993(97)00265-5) (Accessed May 22, 2012).
- Huguet G, Aldavert-Vera L., Kadar E, Pena de Ortiz S, Morgado-Bernal I., and Segura-Torres P. 2009. Intracranial self-stimulation to the lateral hypothalamus, a memory improving treatment, results in hippocampal changes in gene expression. *Neuroscience* **162**: 359-374. http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6T0F-4W74241-5&_user=1517286&_coverDate=08/18/2009&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=search&_sort=d&_docanchor=&view=c&_acct=C000053449&_version=1&_urlVersion=0&_userid=1517286&md5=08eebc481eb7b3e6d3e0219502975603 (Accessed May 20, 2010).
- Huston JP, and Oitzl M-S. 1989. The relationship between reinforcement and memory: Parallels in the rewarding and mnemonic effects of the neuropeptide substance P. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* **13**: 171-180. [http://dx.doi.org/10.1016/S0149-7634\(89\)80027-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0149-7634(89)80027-2) (Accessed May 11, 2012).

- Ikeda K, Moss SJ, Fowler SC, and Niki H. 2001. Comparison of two intracranial self-stimulation (ICSS) paradigms in C57BL/6 mice: head-dipping and place-learning. *Behavioural brain research* **126**: 49-56. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11704251>.
- Ikemoto S, and Panksepp J. 1999. The role of nucleus accumbens dopamine in motivated behavior: a unifying interpretation with special reference to reward-seeking. *Brain research. Brain research reviews* **31**: 6-41. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10611493>.
- Ishida Y, Nakamura M, Ebihara K, Hoshino K, Hashiguchi H, Mitsuyama Y, Nishimori T, and Nakahara D. 2001. Immunohistochemical characterisation of Fos-positive cells in brainstem monoaminergic nuclei following intracranial self-stimulation of the medial forebrain bundle in the rat. *The European journal of neuroscience* **13**: 1600-1608.
- Itoh S, Takashima A, and 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**: 25-9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8012894> (Accessed May 29, 2012).
- Kandel ER. 2002. The molecular biology of memory storage: a dialog between genes and synapses. *Bioscience reports* **24**: 475-522. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16134023>.
- Kandel ER, Schwartz J, and Jessell T. 2000. *Principles of Neural Science*. 4th ed. McGraw-Hill Medical, New York.
- Kasai H., Fukuda M, Watanabe S., Hayashi-Takagi A, and Noguchi J. 2010. Structural dynamics of dendritic spines in memory and cognition. *Trends in neurosciences*.
- Kasai Haruo, Hayama T, Ishikawa M, Watanabe Satoshi, Yagishita S, and Noguchi Jun. 2010. Learning rules and persistence of dendritic spines. *The European journal of neuroscience* **32**: 241-9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20646057> (Accessed March 7, 2012).
- Kessels RP, de Haan EH, Kappelle LJ, and Postma a. 2001. Varieties of human spatial memory: a meta-analysis on the effects of hippocampal lesions. *Brain research. Brain research reviews* **35**: 295-303. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11423159>.

- Kilpatrick M., Rooney M., Michael D., and Wightman R.M. 2000. Extracellular dopamine dynamics in rat caudate–putamen during experimenter-delivered and intracranial self-stimulation. *Neuroscience* **96**: 697-706. [http://dx.doi.org/10.1016/S0306-4522\(99\)00578-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0306-4522(99)00578-3) (Accessed May 22, 2012).
- Kolb Bryan, Mackintosh A, Whishaw IQ, and Sutherland RJ. 1984. Evidence for anatomical but not functional asymmetry in the hemidecorticate rat. *Behavioral Neuroscience* **98**: 44-58.
- Kolb Bryan, Pittman K, Sutherland RJ, and Whishaw IQ. 1982. Dissociation of the contributions of the prefrontal cortex and dorsomedial thalamic nucleus to spatially guided behavior in the rat. *Behavioural Brain Research* **6**: 365-378. [http://dx.doi.org/10.1016/0166-4328\(82\)90018-3](http://dx.doi.org/10.1016/0166-4328(82)90018-3) (Accessed May 4, 2012).
- Kolb Bryan, Sutherland RJ, and Whishaw IQ. 1983. A comparison of the contributions of the frontal and parietal association cortex to spatial localization in rats. *Behavioral Neuroscience* **97**: 13-27.
- Koob G F, and Bloom FE. 1988. Cellular and molecular mechanisms of drug dependence. *Science (New York, N.Y.)* **242**: 715-23. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2903550>.
- Koob G. F. 1997. Drug Abuse: Hedonic Homeostatic Dysregulation. *Science* **278**: 52-58. <http://www.sciencemag.org/content/278/5335/52.abstract> (Accessed March 15, 2012).
- Korb E, and Finkbeiner S. 2011. Arc in synaptic plasticity: from gene to behavior. *Trends in neurosciences* **34**: 591-8. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3207967&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (Accessed April 1, 2012).
- Kádár E, Aldavert-Vera L., Carreras G, Morgado-Bernal I., Segura-Torres P., and Huguet G. 2010. L'autoestimulació elèctrica intracranial induïx l'expressió de bdnf i altres gens relacionats amb plasticitat sinàptica a l'hipocamp de la rata. In *Simposi de la Societat Catalana de neurobiologia*, Simposi de la Societat Catalana de neurobiologia, Barcelona.
- Lamprecht R, and LeDoux J. 2004. Structural plasticity and memory. *Nature reviews.Neuroscience* **5**: 45-54.

- Lassen MB, Brown JE, Stobbs Sarah H, Gunderson SH, Maes L, Valenzuela CF, Ray AP, Henriksen Steven J, and Steffensen Scott C. 2007. Brain stimulation reward is integrated by a network of electrically coupled GABA neurons. *Brain research* **1156**: 46-58. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17524371> (Accessed March 9, 2012).
- Laxton AW, Tang-Wai DF, McAndrews MP, Zumsteg D, Wennberg R, Keren R, Wherrett J, Naglie G, Hamani C, Smith GS, et al. 2010. A phase I trial of deep brain stimulation of memory circuits in Alzheimer's disease. *Annals of Neurology* **68**: 521-534. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ana.22089/abstract> (Accessed January 16, 2012).
- Lee RS, Steffensen S C, and Henriksen S J. 2001. Discharge profiles of ventral tegmental area GABA neurons during movement, anesthesia, and the sleep-wake cycle. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **21**: 1757-66. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11222665> (Accessed May 29, 2012).
- Leuner B, Falduto J, and Shors TJ. 2003. Associative memory formation increases the observation of dendritic spines in the hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **23**: 659-65. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2740640&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Ljungberg T, Apicella P, and Schultz W. 1992. Responses of monkey dopamine neurons during learning of behavioral reactions. *J Neurophysiol* **67**: 145-163. <http://jn.physiology.org/cgi/content/abstract/67/1/145> (Accessed May 22, 2012).
- Lozano AM, Giacobbe P, Hamani C, Rizvi SJ, Kennedy SH, Kolivakis TT, Debonnel G, Sadikot AF, Lam RW, Howard AK, et al. 2012. A multicenter pilot study of subcallosal cingulate area deep brain stimulation for treatment-resistant depression. *Journal of neurosurgery* **116**: 315-22. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22098195> (Accessed March 9, 2012).
- Macey DJ, Froestl W, Koob G F, and Markou A. 2001. Both GABA(B) receptor agonist and antagonists decreased brain stimulation reward in the rat. *Neuropharmacology* **40**: 676-85. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11311895> (Accessed May 29, 2012).

- Maei HR, Zaslavsky K, Teixeira CM, Frankland PW, and Neuroscience I. 2009. What is the most sensitive measure of water maze probe test performance? *Frontiers in Integrative Neuroscience* **3**: 4. http://www.frontiersin.org/integrative_neuroscience/10.3389/neuro.07.004.2009/pdf/abstract (Accessed May 30, 2011).
- Mahajan DS, and 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. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3350081> (Accessed May 13, 2012).
- Major R, and White N. 1978. Memory facilitation by self-stimulation reinforcement mediated by the nigro-neostriatal bundle☆. *Physiology & Behavior* **20**: 723-733. [http://dx.doi.org/10.1016/0031-9384\(78\)90298-6](http://dx.doi.org/10.1016/0031-9384(78)90298-6) (Accessed May 11, 2012).
- Mantz J, Thierry AM, and 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**: 377-81. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2702475> (Accessed May 22, 2012).
- Marrocco R. 1994. Arousal systems. *Current Opinion in Neurobiology* **4**: 166-170. [http://dx.doi.org/10.1016/0959-4388\(94\)90067-1](http://dx.doi.org/10.1016/0959-4388(94)90067-1) (Accessed May 11, 2012).
- Martin SJ, Grimwood PD, and Morris RG. 2000. Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annual review of neuroscience* **23**: 649-711. http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.neuro.23.1.649?url_ver=Z39.88-2003&rfr_dat=cr_pub=pubmed&rfr_id=ori:rid:crossref.org&journalCode=neuro (Accessed March 8, 2012).
- Mayberg HS, Lozano AM, Voon V, McNeely HE, Seminowicz D, Hamani C, Schwalb JM, and Kennedy SH. 2005. Deep brain stimulation for treatment-resistant depression. *Neuron* **45**: 651-60. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15748841> (Accessed February 28, 2011).
- McClure SM, Daw ND, and Read Montague P. 2003. A computational substrate for incentive salience. *Trends in Neurosciences* **26**: 423-428.

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166223603001772> (Accessed March 2, 2012).

- McLamb RL, Williams LR, Nanry KP, Wilson WA, and Tilson HA. 1990. MK-801 impedes the acquisition of a spatial memory task in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **37**: 41-45. [http://dx.doi.org/10.1016/0091-3057\(90\)90038-J](http://dx.doi.org/10.1016/0091-3057(90)90038-J) (Accessed May 29, 2012).
- McNamara R K, and Skelton R W. 1991. Diazepam impairs acquisition but not performance in the Morris water maze. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* **38**: 651-8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2068203> (Accessed May 29, 2012).
- McNamara Robert K., and Skelton Ronald W. 1993. The neuropharmacological and neurochemical basis of place learning in the Morris water maze. *Brain Research Reviews* **18**: 33-49. [http://dx.doi.org/10.1016/0165-0173\(93\)90006-L](http://dx.doi.org/10.1016/0165-0173(93)90006-L) (Accessed May 29, 2012).
- McNaughton B L, Barnes C a, Gerrard JL, Gothard K, Jung MW, Knierim JJ, Kudrimoti H, Qin Y, Skaggs WE, Suster M, et al. 1996. Deciphering the hippocampal polyglot: the hippocampus as a path integration system. *The Journal of experimental biology* **199**: 173-85. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8576689>.
- McNaughton Bruce L., Leonard B, and Chen L. 1989. Cortical-hippocampal interactions and cognitive mapping: A hypothesis based on reintegration of the parietal and inferotemporal pathways for visual processing. *Psychobiology* **17**: 236-246.
- Means LW, Alexander SR, and O'Neal MF. 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. [http://dx.doi.org/10.1016/0163-1047\(92\)90387-J](http://dx.doi.org/10.1016/0163-1047(92)90387-J) (Accessed May 29, 2012).
- Milner P. 1991. Brain-stimulation reward: a review. *Canadian journal of psychology* **45**: 1-36.
- Mogensen J, Pedersen TK, Holm S, and Bang LE. 1995. Prefrontal cortical mediation of rats' place learning in a modified water maze. *Brain Research Bulletin* **38**: 425-434. [http://dx.doi.org/10.1016/0361-9230\(95\)02009-G](http://dx.doi.org/10.1016/0361-9230(95)02009-G) (Accessed May 29, 2012).
- Mogenson GJ, Takigawa M, Robertson A, and Wu M. 1979. Self-stimulation of the nucleus accumbens and ventral tegmental area of tsai attenuated by microinjections of

- spiroperidol into the nucleus accumbens. *Brain Research* **171**: 247-259. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993\(79\)90331-7](http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993(79)90331-7) (Accessed May 10, 2012).
- Montague P Read. 1996. A Framework for Mesencephalic Predictive Hebbian Learning. **76**: 1936-1947.
- Morgado-Bernal I. 2011. Learning and memory consolidation: linking molecular and behavioral data. *Neuroscience* **176**: 12-9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21215299> (Accessed September 1, 2011).
- Morris GM. 1981. Spatial Localization Does Not Require Local Cues the Presence of. **260**: 239-260.
- Morris R. 1984. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of neuroscience methods* **11**: 47-60. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6471907> (Accessed May 25, 2012).
- Morris Richard. 2008. Morris water maze. *Scholarpedia* **3**: 6315. http://www.scholarpedia.org/wiki/index.php?title=Morris_water_maze&printable=yes (Accessed May 26, 2011).
- Moser E, Moser MB, and Andersen P. 1993. Spatial learning impairment parallels the magnitude of dorsal hippocampal lesions, but is hardly present following ventral lesions. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **13**: 3916-25. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8366351>.
- Murray B, and 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. [http://dx.doi.org/10.1016/0166-4328\(94\)90050-7](http://dx.doi.org/10.1016/0166-4328(94)90050-7) (Accessed May 22, 2012).
- Myhrer T. 2003. Neurotransmitter systems involved in learning and memory in the rat: a meta-analysis based on studies of four behavioral tasks. *Brain Research Reviews* **41**: 268-287. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165017302002680> (Accessed April 7, 2012).
- Nakahara D, Nakamura M, Furukawa H, and 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**: 124-9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10793194>.
- Neill DB, Fenton H, and Justice JB. 2002. Increase in accumbal dopaminergic transmission correlates with response cost not reward of hypothalamic stimulation. *Behavioural Brain Research* **137**: 129-138. [http://dx.doi.org/10.1016/S0166-4328\(02\)00288-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-4328(02)00288-7) (Accessed May 22, 2012).
- Nielsen CK, Arnt J, and 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. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10628727> (Accessed May 2, 2012).
- Nielson K a, Radtke RC, and Jensen R a. 1996. Arousal-induced modulation of memory storage processes in humans. *Neurobiology of learning and memory* **66**: 133-42. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8946406>.
- Nieuwenhuys R, Geeraedts LM, and Veening JG. 1982. The medial forebrain bundle of the rat. I. General introduction. *The Journal of comparative neurology* **206**: 49-81. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6124562> (Accessed April 6, 2012).
- Nimchinsky EA, Sabatini Bernardo L, and Svoboda Karel. 2002. Structure and function of dendritic spines. *Annual review of physiology* **64**: 313-53. <http://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.physiol.64.081501.160008> (Accessed March 13, 2012).
- Norman AB, Lu SY, Klug JM, and Norgren RB. 1993. Sensitization of c-fos expression in rat striatum following multiple challenges withd-amphetamine. *Brain Research* **603**: 125-128. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993\(93\)91308-F](http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993(93)91308-F) (Accessed May 22, 2012).
- Okamoto K-I, Nagai T, Miyawaki A, and Hayashi Y. 2004. Rapid and persistent modulation of actin dynamics regulates postsynaptic reorganization underlying bidirectional plasticity. *Nature neuroscience* **7**: 1104-12. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15361876> (Accessed March 18, 2012).
- Olds J. 1958. Self-Stimulation of Brain. *Science* **127**: 315-324.

- Olds J, and Milner P. 1954. POSITIVE REINFORCEMENT PRODUCED BY ELECTRICAL STIMULATION OF SEPTAL AREA AND OTHER REGIONS OF RAT BRAIN. *Journal of comparative and physiological psychology* **47**: 419-427.
- Olds ME, and Fobes JL. 1981. The central basis of motivation: intracranial self-stimulation studies. *Annual review of psychology* **32**: 523-74. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7015997>.
- Owesson-White CA, Cheer JF, Beyene M, Carelli RM, and Wightman R. M. 2008. Dynamic changes in accumbens dopamine correlate with learning during intracranial self-stimulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 11957-11962.
- O'Keefe J, and Dostrovsky J. 1971. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Research* **34**: 171-175. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993\(71\)90358-1](http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993(71)90358-1) (Accessed March 8, 2012).
- O'Keefe J, and Nadel L. 1978. *The Hippocampus as a Cognitive Map*. Oxford University Press, Oxford.
- Parnass Z, Tashiro A, and Yuste R. 2000. Analysis of spine morphological plasticity in developing hippocampal pyramidal neurons. *Hippocampus* **10**: 561-8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11075826> (Accessed May 15, 2012).
- Paxinos G, and Watson C. 2007. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, Sixth Edition: Hard Cover Edition*. 6th ed. Academic Press <http://www.amazon.com/dp/0123741211>.
- Pearce JM, Roberts ADL, and Good M. 1998. maps but not heading vectors. **62**: 1997-1999.
- Persico AM, Schindler CW, O'Hara BF, Brannock MT, and Uhl GR. 1993. Brain transcription factor expression: effects of acute and chronic amphetamine and injection stress. *Molecular Brain Research* **20**: 91-100. [http://dx.doi.org/10.1016/0169-328X\(93\)90113-4](http://dx.doi.org/10.1016/0169-328X(93)90113-4) (Accessed May 22, 2012).
- Peters A, and Kaiserman-Abramof IR. 1970. The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The perikaryon, dendrites and spines. *The American journal of anatomy* **127**: 321-55. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4985058> (Accessed May 16, 2012).

- Pevzner A, Miyashita T, Schiffman AJ, and Guzowski JF. 2012. Temporal dynamics of Arc gene induction in hippocampus: Relationship to context memory formation. *Neurobiology of learning and memory* **97**: 313-320. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22390855> (Accessed March 22, 2012).
- Phillips A. G., Cury A, Fiorino D, Lepiane FG, Brown E, and 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. <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1749-6632.1992.tb25968.x> (Accessed May 10, 2012).
- Phillips A.G., and Fibiger H.C. 1989. Neuroanatomical bases of intracranial selfstimulation: untangling the Gordian Knot. In *The Neuropharmacological Basis of Reward*. (eds. J.M. Liebman and S.J. Cooper), pp. 66-105, Oxford University Press, New York.
- Phillips Anthony G. 1984. Brain reward circuitry: A case for separate systems. *Brain Research Bulletin* **12**: 195-201. [http://dx.doi.org/10.1016/0361-9230\(84\)90189-8](http://dx.doi.org/10.1016/0361-9230(84)90189-8) (Accessed May 2, 2012).
- Ploeger GE, Spruijt BM, and Cools AR. 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**: 927-34. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7826515> (Accessed May 29, 2012).
- Poucet B, Save E, and Lenck-Santini PP. 2000. Sensory and memory properties of hippocampal place cells. *Reviews in the neurosciences* **11**: 95-111. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10718148> (Accessed May 29, 2012).
- Przybylski Jean, and Sara Susan J. 1997. BEHAVIOURAL Reconsolidation of memory after its reactivation. **84**: 241-246.
- Rada PV, Mark GP, and Hoebel B G. 1998. Dopamine release in the nucleus accumbens by hypothalamic stimulation-escape behavior. *Brain research* **782**: 228-34. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9519267>.
- Ramkumar K, Srikumar BN, Shankaranarayana Rao BS, and Raju T. R. 2008. Self-stimulation rewarding experience restores stress-induced CA3 dendritic atrophy, spatial

memory deficits and alterations in the levels of neurotransmitters in the hippocampus. *Neurochemical research* **33**: 1651-1662.

Ramkumar K, Srikumar BN, Venkatasubramanian D, Siva R, Shankaranarayana Rao BS, and Raju T. R. 2011. Reversal of stress-induced dendritic atrophy in the prefrontal cortex by intracranial self-stimulation. *Journal of Neural Transmission*. <http://www.springerlink.com/content/1078251367173j75/> (Accessed January 25, 2012).

Rao B. S., Desiraju T, and 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. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8298965> (Accessed April 27, 2012).

Rao B S, Desiraju T, Meti B L, and Raju T R. 1994. Plasticity of hippocampal and motor cortical pyramidal neurons induced by self-stimulation experience. *Indian journal of physiology and pharmacology* **38**: 23-8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8132239> (Accessed April 27, 2012).

Rebec G., Grabner C., Johnson M, Pierce R., and Bardo M. 1996. Transient increases in catecholaminergic activity in medial prefrontal cortex and nucleus accumbens shell during novelty. *Neuroscience* **76**: 707-714. [http://dx.doi.org/10.1016/S0306-4522\(96\)00382-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0306-4522(96)00382-X) (Accessed May 22, 2012).

Redolar-Ripoll D., Aldavert-Vera L., Soriano-Mas C, Segura-Torres P., and 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., and 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**: 246-256.

Rison R a, and Stanton PK. 1995. Long-term potentiation and N-methyl-D-aspartate receptors: foundations of memory and neurologic disease? *Neuroscience and biobehavioral reviews* **19**: 533-52. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8684715>.

- Robertson A. 1989. Multiple reward systems and the prefrontal cortex. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* **13**: 163-170. [http://dx.doi.org/10.1016/S0149-7634\(89\)80026-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0149-7634(89)80026-0) (Accessed May 2, 2012).
- Rolls ET. 1999a. *The Brain and Emotions*. Oxford University Press, Oxford.
- Rolls ET. 1999b. *The Brain and Emotions*. Oxford University Press, Oxford.
- Rolls ET. 1975. *The Brain and Reward*. Pergamon, Oxford.
- Romppe P-P, and Miliaressis E. 1985. Pontine and mesencephalic substrates of self-stimulation. *Brain Research* **359**: 246-259. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993\(85\)91435-0](http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993(85)91435-0) (Accessed April 5, 2012).
- Routtenberg A, and Lindy J. 1965. Effects of the availability of rewarding septal and hypothalamic stimulation on bar pressing for food under conditions of deprivation. *Journal of comparative and physiological psychology* **60**: 158-161.
- Ruiz-Medina J, Morgado-Bernal I., Redolar-Ripoll D., Aldavert-Vera L., and Segura-Torres P. 2008. Intracranial self-stimulation facilitates a spatial learning and memory task in the Morris water maze. *Neuroscience* **154**: 424-430. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306452208004703> (Accessed May 30, 2011).
- Ruiz-Medina J, Redolar-Ripoll D., Morgado-Bernal I., Aldavert-Vera L., and Segura-Torres P. 2008. Intracranial self-stimulation improves memory consolidation in rats with little training. *Neurobiology of learning and memory* **89**: 574-581.
- Sara S J, Rouillet P, and Przybyslawski J. 1999. Consolidation of memory for odor-reward association: beta-adrenergic receptor involvement in the late phase. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)* **6**: 88-96. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=311281&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Schultz W. 1998. Predictive reward signal of dopamine neurons. *Journal of neurophysiology* **80**: 1-27. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9658025>.

- Schultz W, Dayan P, and Montague P R. 1997. A neural substrate of prediction and reward. *Science (New York, N. Y.)* **275**: 1593-9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9054347>.
- Schultz W, and Romo R. 1987. Responses of nigrostriatal dopamine neurons to high-intensity somatosensory stimulation in the anesthetized monkey. *Journal of neurophysiology* **57**: 201-17. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3559672> (Accessed April 4, 2012).
- Schultz Wolfram. 2000. MULTIPLE REWARD SIGNALS. **1**.
- Segal DS, Kuczenski R, and Florin SM. 1995. Does dizocilpine (MK-801) selectively block the enhanced responsiveness to repeated amphetamine administration? *Behavioral neuroscience* **109**: 532-46. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7662163> (Accessed May 29, 2012).
- Segura-Torres P, Portell-Cortés I, and Morgado-Bernal I. 1991. Improvement of shuttle-box avoidance with post-training intracranial self-stimulation, in rats: a parametric study. *Behavioural brain research* **42**: 161-7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2059330> (Accessed June 1, 2012).
- Segura-Torres P., Wagner U, Massanes-Rotger E, Aldavert-Vera L., Marti-Nicolovius M, and Morgado-Bernal I. 1996. Tuberomammillary nucleus lesion facilitates two-way active avoidance retention in rats. *Behavioural brain research* **82**: 113-117.
- Segura-Torres Pilar, Aldavert-Vera Laura, Gatell-Segura A, Redolar-Ripoll Diego, and Morgado-Bernal Ignacio. 2010. Intracranial self-stimulation recovers learning and memory capacity in basolateral amygdala-damaged rats. *Neurobiology of learning and memory* **93**: 117-26. <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WNM-4X7GMN6-1/2/f5b249b8132cd2aa4a1606fcbb210d98> (Accessed July 27, 2010).
- Shankaranarayana Rao BS, Desiraju T, and 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. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993\(93\)90324-G](http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993(93)90324-G) (Accessed May 13, 2012).
- Shankaranarayana Rao BS, Raju T. R., and 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**: 320-4. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9757075>.

- Shankaranarayana Rao BS, Raju T. R., and 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**: 95-101. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9766395>.
- Shankaranarayana Rao BS, Raju T. R., and Meti B. L. 1998c. Self-stimulation of lateral hypothalamus and ventral tegmentum increases the levels of noradrenaline, dopamine, glutamate, and AChE activity, but not 5-hydroxytryptamine and GABA levels in hippocampus and motor cortex. *Neurochemical research* **23**: 1053-9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9704594>.
- Shankaranarayana Rao BS, Raju T. R., and Meti B. L. 1999. Self-stimulation rewarding experience induced alterations in dendritic spine density in CA3 hippocampal and layer V motor cortical pyramidal neurons. *Neuroscience* **89**: 1067-77. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10362295>.
- Shankaranarayana Rao BS, Raju T.R., and Meti B.L. 1997. Synaptic plasticity in hippocampus and motor cortex induced by self-stimulation rewarding experience. ... *Conference of Indian Society Aerospace Medicine* **37**: 47-48. [http://scholar.google.es/scholar?hl=es&q=Synaptic plasticity in+hippocampus+and+motor+cortex+induced+by+self-stimulation rewarding experience.+Annual Conference of Indian Society+Aerospace+Medicine.+37:47-48.&btnG=Buscar&lr=&as_ylo=&as_vis=0#0](http://scholar.google.es/scholar?hl=es&q=Synaptic+plasticity+in+hippocampus+and+motor+cortex+induced+by+self-stimulation+rewarding+experience.+Annual+Conference+of+Indian+Society+Aerospace+Medicine.+37:47-48.&btnG=Buscar&lr=&as_ylo=&as_vis=0#0) (Accessed May 13, 2012).
- Singh J, Desiraju T, and Raju T. 1997. Cholinergic and GABAergic Modulation of Self-Stimulation of Lateral Hypothalamus and Ventral Tegmentum: Effects of Carbachol, Atropine, Bicuculline, and Picrotoxin. *Physiology & Behavior* **61**: 411-418. [http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9384\(96\)00452-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9384(96)00452-0) (Accessed May 10, 2012).
- Skinner DM, Martin GM, Harley C, Kolb B, Pridgar A, Bechara A, and 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**: 911-26. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7826514> (Accessed May 29, 2012).

- Snyder JS, Hong NS, McDonald RJ, and Wojtowicz JM. 2005. A role for adult neurogenesis in spatial long-term memory. *Neuroscience* **130**: 843-52. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.10.009> (Accessed March 7, 2012).
- Soriano-Mas C, Redolar-Ripoll D., Aldavert-Vera L., Morgado-Bernal I., and Segura-Torres P. 2005. Post-training intracranial self-stimulation facilitates a hippocampus-dependent task. *Behavioural brain research* **160**: 141-147.
- Steffensen S C, Lee RS, Stobbs S H, and Henriksen S J. 2001. Responses of ventral tegmental area GABA neurons to brain stimulation reward. *Brain research* **906**: 190-7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11430879> (Accessed May 29, 2012).
- Steffensen S C, Svingos AL, Pickel VM, and Henriksen S J. 1998. Electrophysiological characterization of GABAergic neurons in the ventral tegmental area. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* **18**: 8003-15. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9742167> (Accessed May 29, 2012).
- Stellar J R, Kelley AE, and 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**: 433-42. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6835998> (Accessed May 10, 2012).
- Stellar J.R., and Stellar E. 1985. *The neurobiology of motivation and reward*. Springer-Verlag, New York.
- Stellar James R., and Corbett Dale. 1989. Regional neuroleptic microinjections indicate a role for nucleus accumbens in lateral hypothalamic self-stimulation reward. *Brain Research* **477**: 126-143. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993\(89\)91400-5](http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993(89)91400-5) (Accessed May 10, 2012).
- Stone SSD, Teixeira CM, Devito LM, Zaslavsky K, Josselyn S a, Lozano AM, and Frankland PW. 2011. Stimulation of entorhinal cortex promotes adult neurogenesis and facilitates spatial memory. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* **31**: 13469-84. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21940440> (Accessed March 15, 2012).
- Taber MT, and 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 : the official journal of the Society for Neuroscience* **15**: 3896-904. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7751954>.
- Takahashi T, Zhu Y, Hata T, Shimizu-Okabe C, Suzuki K, and Nakahara D. 2009. Intracranial self-stimulation enhances neurogenesis in hippocampus of adult mice and rats. *Neuroscience* **158**: 402-411.
- Thinus-Blanc C, Save E, Rossi-Arnaud C, Tozzi A, and 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. *Behavioural brain research* **80**: 33-40. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8905126> (Accessed May 29, 2012).
- Toda H, Hamani C, Fawcett AP, Hutchison WD, and Lozano AM. 2008. The regulation of adult rodent hippocampal neurogenesis by deep brain stimulation. *Journal of neurosurgery* **108**: 132-8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18173322> (Accessed March 13, 2012).
- Wang Z, Edwards JG, Riley N, Provance DW, Karcher R, Li X-D, Davison IG, Ikebe M, Mercer J a, Kauer J a, et al. 2008. Myosin Vb mobilizes recycling endosomes and AMPA receptors for postsynaptic plasticity. *Cell* **135**: 535-48. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2585749&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (Accessed March 10, 2012).
- Wenk GL. 2004. Assessment of spatial memory using the radial arm maze and Morris water maze. *Current protocols in neuroscience / editorial board, Jacqueline N. Crawley ... [et al.] Chapter 8*: Unit 8.5A. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18428607>.
- Wesierska M, Macias-Gonzalez R, and 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. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2156524> (Accessed May 29, 2012).
- White NM, and Milner PM. 1992. The psychobiology of reinforcers. 443-471.
- Willick M. 1995. The effects of ventral tegmental administration of GABAA, GABAB and NMDA receptor agonists on medial forebrain bundle self-stimulation. *Behavioural Brain*

- Research* **70**: 31-36. [http://dx.doi.org/10.1016/0166-4328\(94\)00181-E](http://dx.doi.org/10.1016/0166-4328(94)00181-E) (Accessed May 29, 2012).
- Wise R A. 1996. Addictive drugs and brain stimulation reward. *Annual review of neuroscience* **19**: 319-40. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8833446> (Accessed February 28, 2011).
- Wise R a. 1996. Neurobiology of addiction. *Current opinion in neurobiology* **6**: 243-51. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8725967>.
- Wise R.A., and Bozarth M.A. 1982. Action of drugs of abuse on brain reward systems: An update with specific attention to opiates. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **17**: 239-243. [http://dx.doi.org/10.1016/0091-3057\(82\)90076-4](http://dx.doi.org/10.1016/0091-3057(82)90076-4) (Accessed May 10, 2012).
- Wise Roy A. 1980. Action of drugs of abuse on brain reward systems. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **13**: 213-223. [http://dx.doi.org/10.1016/S0091-3057\(80\)80033-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0091-3057(80)80033-5) (Accessed May 2, 2012).
- Wise Roy A., and Bozarth Michael A. 1984. Brain reward circuitry: Four circuit elements "wired" in apparent series. *Brain Research Bulletin* **12**: 203-208. [http://dx.doi.org/10.1016/0361-9230\(84\)90190-4](http://dx.doi.org/10.1016/0361-9230(84)90190-4) (Accessed May 10, 2012).
- Yeomans JS. 1990. *Principles of Brain Stimulation*. Oxford University Press, New York.
- Yoganasimha D, and Meti B L. 1999. Amelioration of fornix lesion induced learning deficits by self-stimulation rewarding experience. *Brain research* **845**: 246-51. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10536206>.
- Yoganasimha D, Shankaranarayana Rao BS, Raju T. R., and Meti B. L. 1998. Facilitation of acquisition and performance of operant and spatial learning tasks in self-stimulation experienced rats. *Behavioral neuroscience* **112**: 725-729.
- Yuste Rafael. 2011. Dendritic spines and distributed circuits. *Neuron* **71**: 772-81. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21903072> (Accessed March 1, 2012).
- Yuste Rafael, and Bonhoeffer Tobias. 2004. Genesis of dendritic spines: insights from ultrastructural and imaging studies. *Nature reviews. Neuroscience* **5**: 24-34. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14708001> (Accessed March 12, 2012).

Zhang W, and Benson DL. 2000. Development and molecular organization of dendritic spines and their synapses. *Hippocampus* **10**: 512-26.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11075822>.

