

Suma Psicológica, Vol. 16 N° 1  
Junio de 2009, 19-29  
ISSN 0121-4381

## **EFFECTOS DE LA INYECCIÓN INTRAHIPOCAMPAL DE ESCOPOLAMINA SOBRE EL COMPORTAMIENTO EN EL LABERINTO EN CRUZ ELEVADO**

### **EFFECTS OF INTRAHIPPOCAMPAL INJECTION OF SCOPOLAMINE ON BEHAVIOR IN THE ELEVATED PLUS-MAZE**

**Andrea Milena García Becerra**  
*Universidad de la Sabana*

#### **RESUMEN**

*La presente investigación buscó estudiar los efectos de la inyección intrahipocampal de escopolamina, un fármaco antagonista de los receptores muscarínicos M1 con conocido efecto amnésico, sobre el comportamiento de ratas en el laberinto en cruz elevado. Para tal fin los animales fueron expuestos al laberinto después de la inyección del fármaco y re-expuestos 24 horas después ya sin el efecto del fármaco. Fue analizada la exploración de los brazos abiertos y cerrados en cada sesión, así como el perfil de exploración dentro de cada sesión observando los resultados minuto a minuto. Los resultados mostraron un aumento de la exploración de los brazos abiertos en los animales que recibieron inyección de escopolamina antes de la sesión 1. El análisis minuto a minuto, de esta misma sesión reveló que la exploración fue mantenida a lo largo de toda la sesión, contrario a lo observado en los animales que recibieron salina en los que a partir del tercer minuto se observa la reducción significativa en comparación con el minuto 1. Estos resultados muestran claramente que la escopolamina interfiere en los mecanismos de adquisición y almacenamiento de la información a lo largo de la sesión, sin alterar los procesos de memoria a largo plazo.*

**Palabras clave:** *laberinto en cruz elevado, escopolamina, reexposición, análisis minuto a minuto, hipocampo.*

---

\* Correspondencia: Facultad de Psicología, Universidad de la Sabana. Campus Universitario del Puente del Común. Km. 21 Autopista Norte de Bogotá, D.C. Chía-Cundinamarca. Tel.: 57-1- 861 5555 ext. 2713. e-mail: [andreagb@unisabana.edu.co](mailto:andreagb@unisabana.edu.co)

## ABSTRACT

*In this study we aimed to investigate the effects of intrahippocampal injection of scopolamine (an antagonist of M1 muscarinic receptors with amnesic effects) on the behavior of rats evaluated on elevated plus-maze. The animals were tested in the plus-maze immediately after the drug injection and re-tested after 24 h without the drug effect. We analyzed the open and closed arms exploration in each session, and also the behavioral profile in each session using the minute by minute analyses. The results showed increases in the open arms exploration to the scopolamine animals in the first session. The minute by minute analyses in this session showed a maintenance of the exploration during the session, conversely to the observed in the saline animals when in the third minute is showed a significant reduction in comparison to the first minute. These results show that the scopolamine leads to impair the mechanism of acquisition and consolidation of the information during the session, without altering the long term memory processes.*

**Key words:** *elevated plus-maze, scopolamine, re-test, minute by minute analyses, hippocampus.*

## INTRODUCCIÓN

El sistema límbico ha sido identificado como el sustrato neural de las emociones, formado por importantes estructuras moduladoras de la respuesta emocional a estímulos ambientales, así como de la adquisición, consolidación y recuperación de la información. Dentro de estas estructuras se destacan la amígdala y el hipocampo.

La formación hipocampal es una región especializada de la corteza límbica constituida por el hipocampo propiamente dicho y por la circunvolución dentada. Las principales aferencias y eferencias del neocortex de la formación hipocampal viajan a través de la corteza entorhinal, transmitiendo información de entrada hacia las células granulares de la circunvolución dentada. Estas neuronas envían axones que forman sinapsis con espinas dendríticas de las células piramidales del área CA3 del hipocampo. Las terminales localizadas en el área CA1 del hipocampo, forman sinapsis con las espinas dendríticas de otras células piramidales, las cuales viajan a través del fornix, llegando a estructuras del prosencéfalo basal (Septum y cuerpos mamilares). Otro sistema de axones conecta las células piramidales de CA1 con las correspondientes células de la formación hipocampal contralateral.

La principal aferencia de la formación hipocampal es la corteza entorhinal que a su vez recibe información de la amígdala, de varias regiones de la corteza límbica y de la neocorteza asociativa, directamente o a través de regiones adyacentes de la corteza límbica: la corteza perirhinal y la corteza parahipocampal. Las células piramidales del campo CA1 constituyen la principal aferencia del hipocampo, la mayoría de éstas terminando en las regiones entorhinal, perirhinal y parahipocampal (Kandel, Schwartz & Jessell, 2000).

Desde el punto de vista neuroquímico, se ha descrito la existencia de aferencias dopaminérgicas desde el área tegmental ventral; noradrenérgicas desde el *locus coeruleus*; serotoninérgicas desde los núcleos de rafe y colinérgicas desde el septum medial. Éste último es considerado uno de los inputs moduladores del hipocampo más importante, cuyos axones colinérgicos entran en la formación hipocampal por el fornix; la actividad de estas neuronas es responsable por el ritmo theta hipocampal (ondas de gran amplitud y frecuencia media 5-10 Htz) que ha sido asociado con estado de alerta (Wenk, 1997) así como con aprendizaje y memoria (Walsh, Herzog, Gandhi, Stackman & Wiley, 1996), debido a que influyen el establecimiento de la potenciación a largo plazo en el hipocampo. El efecto primario de estas proyeccio-

nes en las neuronas hipocampales (células piramidales y no piramidales) es eliminar la inhibición producida por el GABA. Pavlides, Greenstein, Grudman y Winson (1988) describieron que cuando los impulsos de estimulación eléctrica coinciden con los picos de las ondas theta, la potenciación se establecía con más facilidad. De igual forma, al interrumpir la actividad theta hipocampal los animales muestran déficit en el aprendizaje de tareas que son afectadas por las lesiones hipocampales. Givens y Olton (1994) observaron que la inyección de escopolamina, droga que bloquea los receptores colinérgicos muscarínicos, suprimía el ritmo theta hipocampal e impedía el aprendizaje de una tarea de alternancia que requería que las ratas recordasen cuál brazo de un laberinto T habían visitado la última vez.

Un punto de encuentro entre los procesos de memoria y emoción sería el circuito de papez, propuesto en 1937 por Papez y McLean, el cual sirvió como punto de partida de los estudios sobre contribuciones del sistema límbico a la memoria. El papel crucial del hipocampo como integrador de los procesos anémicos, así como su papel como generador de aprendizajes de contexto, ha fomentado la creación de numerosos modelos de relación entre los diversos sistemas. La disociación entre los mecanismos corticales y subcorticales en la formación de los recuerdos ha llevado a la concepción de que la memoria es un proceso que descansa sobre el trabajo articulado de diversas regiones cerebrales.

Así como el estudio de la neuroanatomía ha permitido delimitar algunas regiones más implicadas en procesos mnémicos, el estudio de la neurofisiología y la neuroquímica también ha llevado a avances en la comprensión sobre el funcionamiento de estos procesos. A nivel de neurotransmisores, se ha identificado la acetilcolina como un neurotransmisor importante en la regulación de los procesos del aprendizaje y la memoria, principalmente sus receptores muscarínicos. Específicamente la presencia de receptores muscarínicos del tipo M1, M2 y M4 en el hipocampo y la actividad de estos receptores ha

sido asociada a funciones mnémicas y cognitivas (Hatcher, Loudon, Hagan & Clark, 1998; Jerusalinsky et al., 1998; Pérez Figueredo, Moreira, Ferreira, Fornari & Oliveira, 2008; Vannucchi, Scali, Kopf, Pepeu & Casamenti, 1997). Estudios en la década del 70 mostraron el papel de los mecanismos colinérgicos en la memoria. Bloqueadores colinérgicos aplicados sistémicamente alteran el aprendizaje de tareas espaciales aprendidas en intervalos cortos de tiempo (memoria de trabajo), mientras que compuestos inhibidores de la acetilcolinesterasa, enzima que degrada la acetilcolina, facilitan la ejecución de esas tareas (Alpern & Marriott, 1973; Deutsch, 1971). Resultados de estudios realizados con humanos mostraron que el deterioro de neuronas colinérgicas prosencefálicas correlacionaba con deficiencias cognitivas, particularmente en el caso de la demencia senil tipo Alzheimer (Whitehouse et al., 1982).

Estudios con ratas mostraron una disminución en el número y tamaño de los núcleos colinérgicos prosencefálicos en animales viejos (24 meses de edad), comparados con animales control jóvenes (3 meses). Este hecho es asociado con dificultades en el aprendizaje del laberinto acuático de Morris, donde los animales deben aprender a identificar la ubicación de una plataforma en una piscina circular a la cual pueden subir para no tener que nadar (Fischer, Gage & Bjorklund, 1989). Otros experimentos mostraron que la lesión del núcleo septal medial y del núcleo basal magno celular altera tareas de aprendizaje y memoria (Gray & McNaughton, 1983). Posteriormente estos hallazgos fueron confirmados con el uso de técnicas electrolíticas y electrotóxicas, concluyendo que el septum medial envía al hipocampo informaciones integradas por una variedad de estructuras mesencefálicas y límbicas, relacionadas con procesos vegetativos y de atención (Walsh et al., 1996).

La inyección intraseptal de inmunotoxina colinérgica 192-IgG-Saporin en un paradigma test-retest en el laberinto en cruz elevado mostró que los animales no lesionados presentaron durante los cinco minutos de la sesión una reducción pau-

latina de la exploración y en la segunda sesión una reducción de la actividad exploratoria, así como un aumento de los comportamientos relacionados con ansiedad mientras que los animales lesionados no presentaron modificaciones en sus niveles de exploración durante los cinco minutos de la primera sesión y sus niveles de exploración en la segunda sesión no mostraron efectos relacionados con la experiencia previa en el laberinto, sugiriendo la relevancia del sistema de innervación colinérgica septo-hipocampal en los procesos de almacenamiento y recobro de la información (Lamprea, Cárdenas, Silveira, Morato & Walsh, 2000).

Conociendo la importancia del sistema colinérgico en procesos de memoria, se han utilizado compuestos como la escopolamina, un antagonista competitivo de la acetilcolina, que inhibe la acción de la acetilcolina al unirse a los receptores muscarínicos. En el sistema nervioso central, la escopolamina produce depresión del sistema que se manifiesta en somnolencia, amnesia, fatiga y sueño sin actividad onírica, también presenta euforia y excitación lo cual la potencializa como droga de abuso.

Estudios realizados con inyección intra-hipocampal de escopolamina (Smythe, Bhatnagar, Murphy, Timothy & Costall, 1998) mostraron aumentos en los niveles de ansiedad en el test de la caja claro-oscuro y déficits en procesos de adquisición y consolidación de información en una tarea de condicionamiento contextual (Wallenstein & Vago, 2001), así como deficiencias en el aprendizaje de tareas espaciales en el laberinto acuático de Morris (Bertrand et al., 2001; Carli, Bonalumi & Samanin, 1997) y en el laberinto radial (Masuoka, Fujii & Kamei, 2006). Un modelo comportamental muy utilizado tradicionalmente para medir ansiedad es el laberinto en cruz elevado. Este modelo surgió de los trabajos sobre miedo y exploración desarrollados por Montgomery (Montgomery & Monkman, 1955), con un laberinto en Y, donde se observó que los animales mostraban una mayor frecuencia de

entradas a los brazos abiertos (sin paredes) con relación a los brazos cerrados (rodeado por paredes altas); este autor planteó la hipótesis de que la estimulación provocada por la novedad (en la forma de ambiente desconocido) producía reacciones de conflicto entre miedo y curiosidad, evidenciadas comportamentalmente como tendencias de esquiva y aproximación respectivamente. El ambiente novedoso provocaría un aumento tanto del impulso para explorar como del miedo originado entre el conflicto entre exploración y evitación (Montgomery, 1955; Montgomery & Monkman, 1955).

El trabajo inicial con laberinto en cruz elevado fue desarrollado por Handley y Mithani (1984) como un modelo para el estudio de la ansiedad, siendo validado comportamental, fisiológica y farmacológicamente con ratas por Pellow y cols. (Pellow, Chopin, File & Briley, 1985) y por Lister (1987) para ratones. El laberinto en cruz elevado presenta un ambiente con dos áreas abiertas y dos áreas cerradas. Tradicionalmente se realiza una sesión de cinco minutos, durante los cuales los animales exploran libremente todo el aparato. La exploración es más activa durante los primeros minutos. A lo largo de la sesión los animales disminuyen progresivamente su actividad general, principalmente el número de entradas a los brazos abiertos pasando cada vez más tiempo en los brazos cerrados (Carobrez & Bertoglio, 2005).

La causa de la aversión a los brazos abiertos ha sido explicada en términos de la aversión natural que los roedores tienen por la novedad y por los espacios abiertos (Treit, Menard & Royan, 1993); la ausencia de paredes impide que los animales realicen el comportamiento de acercar las vibrisas y el cuerpo a las superficies verticales (paredes), comportamiento denominado tigmotaxia. Los estudios farmacológicos han mostrado que existen efectos selectivos sobre la exploración de los brazos abiertos del laberinto. La administración de ansiolíticos clásicos como Clordiazepoxido, Diazepan o fenobarbital causan aumento de la exploración de los brazos abiertos, respuesta que ha sido asociada a una reducción de los niveles de ansiedad (Cruz, Frei & Graeff, 1994; Pellow et al., 1985).

Cuando se utiliza el protocolo de re-exposición al laberinto, se observa un claro efecto producto de la primera experiencia sobre el comportamiento en la segunda sesión. Esto es, después de una primera exploración del laberinto, los roedores adquieren, consolidan y recuperan un tipo de memoria relacionada a la exploración de las áreas potencialmente peligrosas del aparato, los brazos abiertos, y esa información produce una reducción de la exploración en la segunda sesión así como anula en la segunda exposición la clásica respuesta a fármacos benzodiazepínicos que se observa en los animales expuestos por primera vez al aparato (Bertoglio & Carobrez, 2004; Cruz-Morales, Santos & Brandao, 2002).

El comportamiento exploratorio de las ratas en el laberinto en cruz elevado permite deducir, entre otras cosas, un proceso de almacenamiento y recuperación de información que puede ser observado en el transcurrir de la sesión haciendo un análisis minuto a minuto (Bertoglio & Carobrez, 2002; Lamprea et al., 2000; Rodgers et al., 1996). Este tipo de análisis plantea el uso del laberinto en cruz elevado como modelo para probar el curso temporal de lesiones y otros tratamientos. Por tratarse de un modelo que no necesita de entrenamiento, privación u otro tipo de estímulos previos a su aplicación elimina problemas metodológicos observados en otros modelos para el estudio de la ansiedad y la memoria (Menard & Treit, 1999; Treit, 1985).

## MÉTODO

### SUJETOS

Fueron utilizadas 20 ratas Wistar macho (200±10 g) provenientes del Bioterio central de la Universidad de São Paulo, campus Ribeirao Preto, Brasil. Los animales fueron alojados en el bioterio del laboratorio en cajas de acrílico (41 x 30 x 18 cm) con seis sujetos en cada una. Fueron mantenidos en temperatura controlada (25 ± 2°C) y en un ci-

clo claro-oscuro de 12 horas (luces encendidas a las 7:00 a.m.). Durante la permanencia en el laboratorio los animales tuvieron libre acceso a agua y comida. Los experimentos reportados en este artículo fueron realizados siguiendo las normas éticas de la Sociedad Brasileira de Neurociencias.

### APARATOS

Fue utilizado un laberinto en cruz elevado. Este aparato está formado por dos brazos cerrados (50 x 10 cm) rodeado por paredes de madera de 40 cm de altura, y dos brazos abiertos de las mismas dimensiones rodeado por un borde de acrílico de 1 cm de altura, unidos por un cuadrado central de 10 cm de lado, de forma que los brazos iguales quedaban opuestos entre sí. El laberinto fue colocado en una sala iluminada por una lámpara incandescente de 100W, localizada a 1,75 cm encima del laberinto. Para el registro fue utilizado el programa de registro X-plo-rat (Universidad de São Paulo) desarrollado para este fin.

### PROCEDIMIENTOS

#### Cirugía estereotáxica

Después de un período de adaptación de 72 horas al bioterio, los animales fueron inyectados con atropina (1 mg/kg) intraperitoneal para evitar problemas respiratorios durante la cirugía o la recuperación posquirúrgica. Diez minutos después fueron anestesiados con Pentobarbital Sódico (50 mg/kg) por vía intraperitoneal. Posteriormente fue fijado en un aparato estereotáxico con la barra de los incisivos 3 mm debajo de la línea interaural. Después de la preparación del campo quirúrgico, se abrieron dos orificios en el hueso por medio de los cuales fueron implantadas bilateralmente cánulas guía direccionadas al área CA3 del hipocampo según las siguientes coordenadas: antero posterior = - 4.2; medio lateral = ± 3.0 y dorso ventral = 1.8, según el atlas de Paxinos y

Watson (Paxinos & Watson, 1998). Una vez ubicadas las cánulas fueron ancladas al cráneo con la ayuda de dos tornillos de acero inoxidable y acrílico dental. Terminado el procedimiento los animales recibieron 120.000 unidades de penicilina G benzatina por vía intramuscular para evitar infecciones.

#### Microinyección

Después de un período de recuperación posquirúrgica de 72 horas una aguja dental fue introducida dentro de la cánula guía. Esta aguja estaba conectada a una jeringa Hamilton de 5 ul. A través de un catéter de polipropileno, se efectuó la infusión bilateral simultánea de Hidrobromuro de escopolamina (30 ug/ul, 0.5 ul para cada hipocampo) o de solución salina al 0,9% en el mismo volumen para cada hipocampo. La inyección fue realizada a una velocidad de 0.1 ul por minuto. Una vez terminada la inyección la aguja permaneció durante 2 minutos para permitir la difusión y evitar el reflujo del compuesto (Lamprea et al., 2000).

#### EVALUACIÓN COMPORTAMENTAL

Cinco minutos después de la microinyección los animales fueron colocados en el cuadrado central del laberinto en cruz elevado, con el hocico en dirección de uno de los brazos cerrados y se les permitió explorar libremente por un periodo de cinco minutos. Terminado ese período los animales fueron llevados de vuelta a su caja donde permanecieron hasta el momento de la re-exposición 24 horas después. Entre cada animal se limpió el laberinto con solución de alcohol al 20%.

Para cada una de las sesiones fue registrado el número de entradas y el tiempo de permanencia en cada tipo de brazo, la distancia total recorrida, el número de entradas y tiempo de permanencia en cada una de las extremidades de los brazos abiertos. Además se realizó el análisis minuto a minuto de cada sesión para los mismos comportamientos.

#### HISTOLOGÍA

Después de la segunda exposición al laberinto en cruz elevado, los animales fueron inyectados con Azul de Evans conservando la misma metodología de la primera inyección. Posteriormente fueron anestesiados y profundidos intracardiamente utilizando métodos tradicionales. Posteriormente fueron retirados los cerebros, congelados y en un criostato (Leyca Criocut) fueron cortadas secciones de 60 um. Se seleccionaron las secciones correspondientes a la ubicación de las coordenadas diana en las láminas convencionales de histología para ser observadas al microscopio. Aquellos animales en que la cánula no quedó localizada en el lugar correcto fueron eliminados del análisis.

#### ESTADÍSTICA

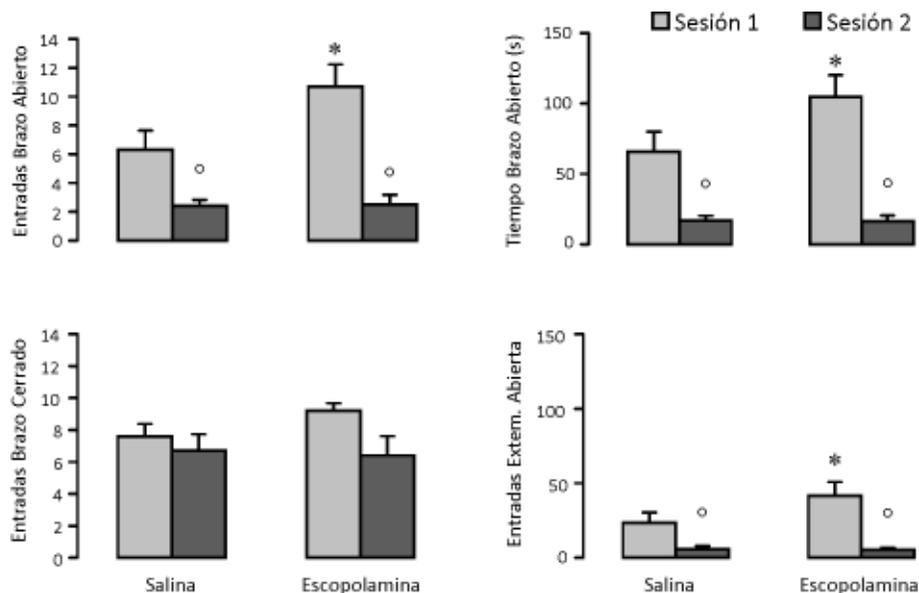
Los resultados comportamentales fueron analizados utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías con medida repetida, teniendo como un factor el tratamiento (salina y escopolamina) y como factor repetido la sesión. Cuando fue necesario se utilizó como prueba post-hoc el test de Newman-Keuls. Los datos minuto a minuto de cada tratamiento y sesión, fueron realizados con una ANOVA de una vía con medida repetida, teniendo como factor los minutos. En todos los casos el nivel de significancia utilizado fue de  $p < 0.05$ .

#### RESULTADOS

La Figura 1 muestra las medidas comportamentales de los animales tratados con salina o escopolamina y expuestos al laberinto en dos sesiones con intervalo de 24 horas. Cuando observamos el número de entradas y el tiempo de permanencia en los brazos abiertos, así como el tiempo de permanencia en su extremidad, el análisis estadístico no reveló efectos dados por el factor tratamiento en ninguna de las medidas  $F(1, 18) = 3.26$ ;  $p = 0.08$ ;  $F(1, 18) = 2.70$ ;  $p = 0.11$ ;  $F(1, 18) = 2.77$ ;  $p = 0.11$  respectivamente). Contrariamen-

te, sí fueron mostrados efectos dados por el factor sesión  $F(1,18) = 43.84$ ;  $p < 0.001$ ;  $F(1,18) = 50.11$ ;  $p < 0.001$ ;  $F(1,18) = 34.53$ ;  $p < 0.001$  respectivamente e interacción entre los factores,  $F(1,18) = 5.53$ ;  $p = 0.03$ ;  $F(1,18) = 4.16$ ;  $p = 0.05$ ;  $F(1,18) = 4.24$ ;  $p = 0.05$  respectivamente. La prueba post-hoc reveló que hubo un aumento

significativo en las tres medidas para el grupo que recibió escopolamina antes de la exposición al laberinto comparado con el grupo que recibió salina, además fue observado una reducción significativa en todas las medidas durante la segunda sesión comparada con su respectiva primera.



**Figura 1.** Entradas y tiempo de permanencia en los brazos abiertos (superior), entradas a los brazos cerrados y entradas en las extremidades abiertas (inferior) para los animales que recibieron inyección intrahipocampal de salina o escopolamina y fueron expuestos a dos sesiones en el laberinto en cruz elevado con intervalo de 24 horas. Las barras representan las medias de los grupos y las líneas verticales la desviación estándar. \*, Diferente del grupo salina en la misma sesión. °, Diferente de su respectiva sesión 1. Newman - Keuls,  $P < 0.05$ .

Con relación al número de entradas a los brazos cerrados, también mostrado en la Figura 2, ANOVA no mostró diferencias significativas producto del tratamiento  $F(1,18) = 0.49$ ;  $p = 0.49$ , de la sesión  $F(1,18) = 4.12$ ;  $p = 0.06$  ni interacción entre los factores  $F(1,18) = 1.08$ ;  $p = 0.31$ .

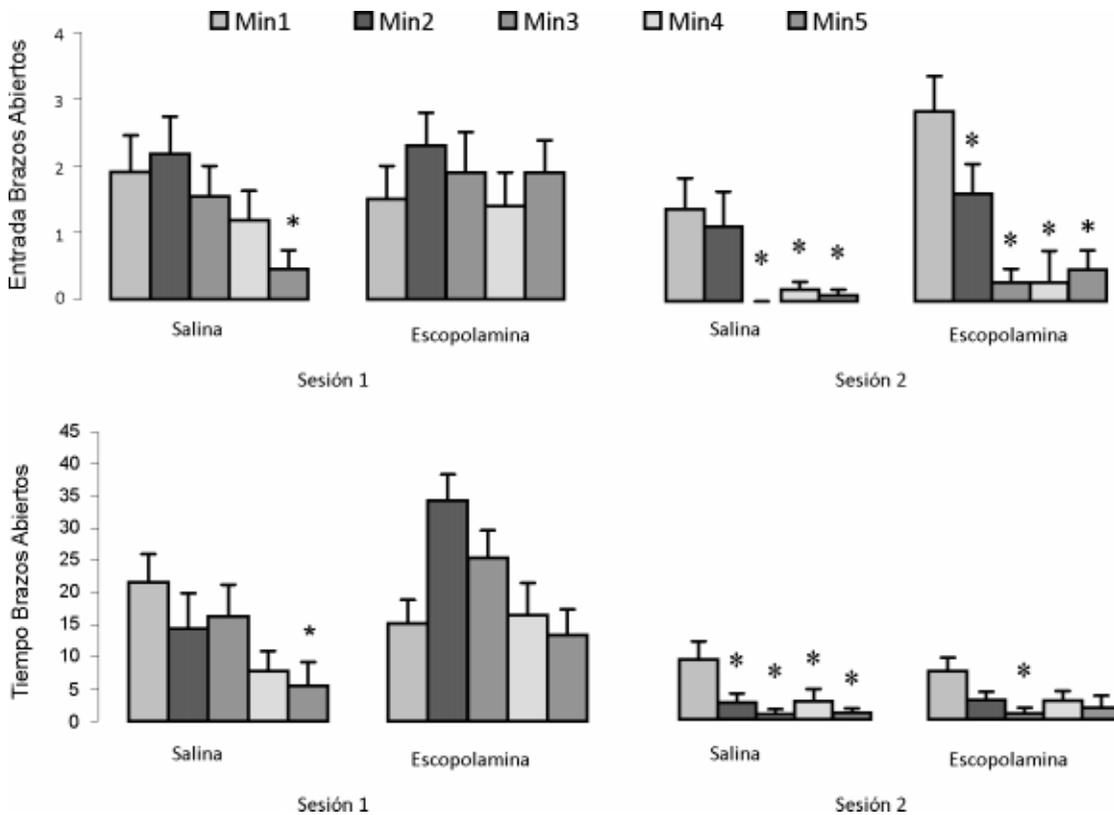
Cuando observamos el análisis de las sesiones minuto a minuto, la Figura 2 nos muestra el número de entradas a los brazos abiertos para la primera y segunda sesión de los grupos tratados con salina y escopolamina y expuestos al laberinto con intervalo de veinticuatro horas. ANOVA mostró diferencias significativas para los animales que re-

cibieron salina, entre los minutos de la primera sesión  $F(4,49) = 3.06$ ;  $p = 0.02$ , donde ocurrió una reducción significativa del número de entradas en el último minuto. También fueron encontradas diferencias significativas en la segunda sesión  $F(4,49) = 5.45$ ;  $p = 0.002$  donde la reducción significativa del número de entradas sucede a partir del segundo minuto. Con relación a los animales que recibieron escopolamina, no fueron encontradas diferencias significativas entre los minutos de la primera sesión  $F(4,49) = 3.93$ ;  $p = 0.07$ , pero sí en la segunda sesión  $F(4,49) = 5.26$ ;  $p = 0.002$  donde se observa una reducción signi-

ficativa en esta medida a partir del segundo minuto.

La Figura 2 muestra en la parte inferior, el tiempo de permanencia en los brazos abiertos por minuto. Para los animales que recibieron salina antes de la primera sesión, el análisis estadístico reveló una reducción significativa en el minuto 5 en comparación con el primer minuto  $F(4,49) = 3.06$ ;  $p = 0.02$ ; en el caso de los animales que recibieron escopolamina antes de la primera sesión, fueron observadas diferencias significativas entre los minutos  $F(4,49) = 7.30$ ;  $p < 0.001$ , el test post-hoc indicó que no hubo reducción del tiempo de permanencia en los brazos abiertos a

lo largo de la sesión en comparación con el primer minuto y las diferencias fueron dadas por un aumento en el segundo minuto que lo hace diferente significativamente con los minutos 1, 3 y 4. Cuando observamos la segunda sesión de los animales salina, el análisis estadístico mostró diferencias significativas entre los grupos  $F(4,49) = 3.92$ ;  $p = 0.01$ , siendo que a partir del segundo minuto se observa una caída en el tiempo de permanencia en estos brazos en comparación con el primer minuto. En el caso de los animales escopolamina, el análisis mostró una reducción significativa,  $F(4,49) = 2.69$ ;  $p = 0.04$  del minuto 3 comparado con el minuto 1.



**Figura 2. Análisis minuto a minuto para las sesiones 1 y 2 de las entradas en los brazos abiertos (superior) y el tiempo de permanencia en los brazos abiertos (inferior) para los animales que recibieron inyección intrahipocampal de salina o escopolamina y fueron expuestos a dos sesiones en el laberinto en cruz elevado con intervalo de 24 horas. Las barras representan las medias de los grupos y las líneas verticales la desviación estándar. \*, Diferente del primer minuto en la misma sesión. Newman - Keuls,  $P < 0.05$ .**

## DISCUSIÓN

Los resultados del análisis por sesiones del presente experimento muestran un aumento significativo de la exploración del brazo abierto sin alterar la exploración en los brazos cerrados, cuando los animales recibieron inyección intrahipocampal de escopolamina antes de ser expuestos al laberinto en cruz elevado. Aumentos de la exploración de los brazos abiertos sin alterar la actividad locomotora han sido asociados en la literatura como reducciones en los niveles de ansiedad (Carobrez & Bertoglio, 2005).

Cuando observamos la exploración de los animales en la segunda sesión, tanto los animales inyectados con salina como los inyectados con escopolamina, presentaron una reducción significativa en la exploración de los brazos abiertos en la segunda sesión comparados con su respectiva primera sesión. Esta reducción de la exploración en la segunda sesión es un efecto que se ha relatado previamente en la literatura: una primera experiencia en el laberinto en cruz elevado ocasiona un aprendizaje asociado a un miedo incondicionado por algunas áreas del laberinto (brazos abiertos) que aumentaría los niveles de ansiedad en las siguientes exposiciones, lo que se evidencia en una reducción de la exploración en la segunda sesión (Bertoglio & Carobrez, 2004; Cruz-Morales et al., 2002).

Los resultados del análisis minuto a minuto de la primera sesión, permiten observar una reducción significativa en la exploración de los brazos abiertos en el minuto 4 y 5 en comparación con el primer minuto en el grupo que recibió inyección de salina, mientras que esta reducción no fue observada en los animales que recibieron inyección de escopolamina, sugiriendo que la inyección intrahipocampal de escopolamina ocasiona un déficit en el aprendizaje de las características ambientales durante la sesión e interrumpe el proceso de habituación al aparato. Al observar el análisis minuto a minuto de la segunda sesión, en los dos grupos se observa una rápida reducción de la exploración de los brazos abiertos a partir del tercer minuto. Este tipo de análisis minuto a minuto

ya ha sido hecho por otros autores (Bertoglio & Carobrez, 2002; Lamprea et al., 2000; Rodgers et al., 1996) y permite observar cómo ocurre el proceso de adquisición de la información a lo largo de los cinco minutos. Ese mantenimiento de la exploración a lo largo de los cinco minutos estaría dando un efecto acumulativo en el análisis de la sesión completa que inicialmente puede ser interpretado como una reducción de los niveles de ansiedad.

Resulta interesante el hecho de que la interferencia sobre los mecanismos colinérgicos, durante el período de almacenamiento de la información, ocasiona alteraciones en el patrón exploratorio de la primera sesión, pero a pesar de esto, no se presentan alteraciones en la formación de memoria a largo plazo. Este hallazgo sugiere que los mecanismos de la memoria funcional son disociables de los de la formación de huellas duraderas de memoria. En este punto vale la pena recordar algunos trabajos que muestran la participación de mecanismos septo-corticales en la formación del recuerdo (Markowska, Olton, Murray & Gaffan, 1989). Estos mecanismos estarían bajo el control de sistemas glutamatérgicos y gabaérgicos y por tanto estarían fuera del alcance de los efectos farmacológicos de la escopolamina.

En nuestros resultados, el bloqueo de los receptores muscarínicos en el hipocampo perjudicaría el aprendizaje en la primera exposición, lo que se observa en el mantenimiento de la exploración a lo largo de la sesión. Basados en estos resultados, podemos concluir que el bloqueo de la acción colinérgica en el hipocampo, producida por la inyección de escopolamina, puede interferir en los procesos de adquisición de información que ocurren en la primera sesión, lo que se refleja en cambios en el perfil comportamental observado en la segunda sesión. Resultados similares ya han sido relatados en la literatura utilizando el bloqueo de la neurotransmisión colinérgica con la inmunotoxina IgG-Saporin inyectada en el núcleo septal medial (Lamprea et al., 2000).

El uso de este tipo de análisis en el laberinto puede permitir su uso como modelo de ansiedad y además el análisis minuto a minuto nos permiti-

ría identificar procesos de adquisición y recuperación de información acerca del ambiente y cuáles serían las áreas seguras del aparato que no son observables en el análisis de la sesión total. Los resultados ya existentes en la literatura, sumados a los mostrados en el presente artículo, corroboran la hipótesis de que el sistema colinérgico y el sistema septo-hipocampal estarían modulando procesos de adquisición y retención de información espacial, así como que la exploración en el laberinto en cruz elevado estaría modulada por estos procesos de aprendizaje y que el déficit en el aprendizaje de las características espaciales y aversivas en la primera sesión modulan la respuesta observada en la segunda exposición.

## BIBLIOGRAFÍA

- Alpern, H. P. & Marriott, J. G. (1973). Short-term memory: facilitation and disruption with cholinergic agents. *Physiology and Behavior*, 11(4), 571-575.
- Bertoglio, L. J. & Carobrez, A. P. (2002). Behavioral profile of rats submitted to session 1-session 2 in the elevated plus-maze during diurnal/nocturnal phases and under different illumination conditions. *Behavioural Brain Research*, 132(2), 135-143.
- Bertoglio, L. J. & Carobrez, A. P. (2004). Scopolamine given pre-Trial 1 prevents the one-trial tolerance phenomenon in the elevated plus-maze Trial 2. *Behavioral Pharmacology*, 15(1), 45-54.
- Bertrand, F., Lehmann, O., Galani, R., Lazarus, C., Jeltsch, H. & Cassel, J. C. (2001). Effects of MDL 73005 on water-maze performances and locomotor activity in scopolamine-treated rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 68(4), 647-660.
- Carli, M., Bonalumi, P. & Samanin, R. (1997). WAY 100635, a 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonist, prevents the impairment of spatial learning caused by intrahippocampal administration of scopolamine or 7-chloro-kynurenic acid. *Brain Research*, 774(1-2), 167-174.
- Carobrez, A. P. & Bertoglio, L. J. (2005). Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neuroscience and Biobehavioral Review*, 29(8), 1193-1205.
- Cruz, A. P., Frei, F. & Graeff, F. G. (1994). Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 49(1), 171-176.
- Cruz-Morales, S. E., Santos, N. R. & Brandao, M. L. (2002). One-trial tolerance to midazolam is due to enhancement of fear and reduction of anxiolytic-sensitive behaviors in the elevated plus-maze retest in the rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 72(4), 973-978.
- Deutsch, J. A. (1971). The cholinergic synapse and the site of memory. *Science*, 174(11), 788-794.
- Fischer, W., Gage, F. H. & Bjorklund, A. (1989). Degenerative Changes in Forebrain Cholinergic Nuclei Correlate with Cognitive Impairments in Aged Rats. *European Journal of Neuroscience*, 1(1), 34-45.
- Givens, B. & Olton, D. S. (1994). Local modulation of basal forebrain: effects on working and reference memory. *The Journal of Neuroscience*, 14(6), 3578-3587.
- Gray, J. A. & McNaughton, N. (1983). Comparison between the behavioural effects of septal and hippocampal lesions: a review. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 7(2), 119-188.
- Handley, S. L. & Mithani, S. (1984). Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 327(1), 1-5.
- Hatcher, J. P., Loudon, J. M., Hagan, J. J. & Clark, M. S. (1998). Sabcomeline (SB-202026), a functionally selective M1 receptor partial agonist, reverses delay-induced deficits in the T-maze. *Psychopharmacology (Berl)*, 138(3-4), 275-282.
- Jerusalinsky, D., Kornisiuk, E., Alfaro, P., Quillfeldt, J., Alonso, M., Verde, E. R., et al. (1998). Muscarinic toxin selective for m4 receptors impairs memory in the rat. *Neuroreport*, 9(7), 1407-1411.
- Kandel, E., Schwartz, K. & Jessell, T. (2000). *Principles of neural science*. New York: McGraw Hill.
- Lamprea, M. R., Cardenas, F. P., Silveira, R., Morato, S. & Walsh, T. J. (2000). Dissociation of memory and anxiety in a repeated elevated plus maze paradigm: forebrain cholinergic mechanisms. *Behavioural Brain Research*, 117(1-2), 97-105.
- Lister, R. G. (1987). The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology (Berl)*, 92(2), 180-185.
- Markowska, A. L., Olton, D. S., Murray, E. A. & Gaffan, D. (1989). A comparative analysis of the role of fornix and cingulate cortex in memory: rats. *Experimental Brain Research*, 74(1), 187-201.
- Masuoka, T., Fujii, Y. & Kamei, C. (2006). Effect of scopolamine on the hippocampal theta rhythm during an eight-arm radial maze task in rats. *European Journal of Pharmacology*, 539(1-2), 76-80.
- Menard, J. & Treit, D. (1999). Effects of centrally administered anxiolytic compounds in animal models of anxiety. *Neuroscience and Biobehavioral Review*, 23(4), 591-613.
- Montgomery, K. C. (1955). The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 48(4), 254-260.
- Montgomery, K. C. & Monkman, J. A. (1955). The relation between fear and exploratory behavior. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 48(2), 132-136.
- Pavlidis, C., Greenstein, Y. J., Grudman, M. & Winson, J. (1988). Long-term potentiation in the dentate gyrus is induced

- preferentially on the positive phase of theta-rhythm. *Brain Research*, 439(1-2), 383-387.
- Paxinos, G. & Watson, C. (1998). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. (4th ed.). New York: Academic Press.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S. E. & Briley, M. (1985). Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 14(3), 149-167.
- Pérez Figueredo, L. Z., Moreira, K. M., Ferreira, T. L., Fornari, R. V. & Oliveira, M. G. (2008). Interaction between glutamatergic-NMDA and cholinergic-muscarinic systems in classical fear conditioning. *Brain Research Bulletin*, 77(2-3), 71-76.
- Rodgers, R. J., Johnson, N. J., Cole, J. C., Dewar, C. V., Kidd, G. R. & Kimpson, P. H. (1996). Plus-maze retest profile in mice: importance of initial stages of trail 1 and response to post-trial cholinergic receptor blockade. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 54(1), 41-50.
- Smythe, J. W., Bhatnagar, S., Murphy, D., Timothy, C. & Costall, B. (1998). The effects of intrahippocampal scopolamine infusions on anxiety in rats as measured by the black-white box test. *Brain Research Bulletin*, 45(1), 89-93.
- Treit, D. (1985). Animal models for the study of anti-anxiety agents: a review. *Neuroscience and Biobehavioral Review*, 9(2), 203-222.
- Treit, D., Menard, J. & Royan, C. (1993). Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 44(2), 463-469.
- Vannucchi, M. G., Scali, C., Kopf, S. R., Pepeu, G. & Casamenti, F. (1997). Selective muscarinic antagonists differentially affect in vivo acetylcholine release and memory performances of young and aged rats. *Neuroscience*, 79(3), 837-846.
- Wallenstein, G. V. & Vago, D. R. (2001). Intrahippocampal scopolamine impairs both acquisition and consolidation of contextual fear conditioning. *Neurobiology of Learning and Memory*, 75(3), 245-252.
- Walsh, T. J., Herzog, C. D., Gandhi, C., Stackman, R. W. & Wiley, R. G. (1996). Injection of IgG 192-saporin into the medial septum produces cholinergic hypofunction and dose-dependent working memory deficits. *Brain Research*, 726(1-2), 69-79.
- Wenk, G. L. (1997). The nucleus basalis magnocellularis cholinergic system: one hundred years of progress. *Neurobiology of Learning and Memory*, 67(2), 85-95.
- Whitehouse, P. J., Price, D. L., Struble, R. G., Clark, A. W., Coyle, J. T. & Delon, M. R. (1982). Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. *Science*, 215(4537), 1237-1239.

Fecha de envío: 14 de marzo de 2009

Fecha de aceptación: 20 de mayo de 2009