

**Estudio neurofisiológico y
comportamental del efecto de la
hipoxia hipobárica sobre el
rendimiento cognitivo
submáximo en ratones y su
implicación en el balance del
sistema colinérgico**

Tesis Doctoral

Rafael Guerra Narbona

Sevilla 2013



UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE

Facultad de Ciencias Experimentales

Departamento de Fisiología, Anatomía y Biología Celular

División de Neurociencias

Rafael Guerra Narbona

**Estudio neurofisiológico y comportamental del
efecto de la hipoxia hipobárica sobre el
rendimiento cognitivo submáximo en ratones
y su implicación en el balance del sistema
colinérgico**

Tesis Doctoral dirigida por

Juan Carlos López Ramos y José María Delgado García

Sevilla, 2013

D. José María Delgado García, Catedrático del Departamento de Fisiología, Anatomía y Biología Celular, de la Facultad de Ciencias Experimentales de la Universidad Pablo de Olavide y D. Juan Carlos López Ramos , Profesor Contratado Doctor del Departamento de Fisiología, Anatomía y Biología Celular, de la Facultad de Ciencias Experimentales de la Universidad Pablo de Olavide:

CERTIFICAN:

que el presente trabajo titulado **“Estudio neurofisiológico y comportamental del efecto de la hipoxia hipobárica sobre el rendimiento cognitivo submáximo en ratones y su implicación en el balance del sistema colinérgico”** ha sido realizado bajo su dirección y supervisión por Don Rafael Guerra Narbona, Licenciado en Ciencias Ambientales por la Universidad Pablo de Olavide y consideran que reúne las condiciones de calidad y rigor científico para ser presentado y defendido como Tesis Doctoral.

Sevilla, 20 de Octubre de 2013.

Fdo.: José María Delgado García

Fdo.: Juan Carlos López Ramos

Este trabajo ha sido sufragado gracias a la financiación obtenida por el proyecto de investigación “Valoración neurofisiológica del efecto de la aclimatación a la altura sobre el rendimiento deportivo”. DPS2008-0692. Instituto de Salud Carlos III.

A mi madre y mis hermanas

A Juan Carlos y Jose María

A mis compañeros que se convirtieron en amigos

A mis amigos que siempre fueron amigos

***Las primeras por aguantar y seguir ayudándome como siempre
durante este pedacito de vivencia***

Los segundos por hacerme entrar en el conocimiento

***Los amigos primeros y los amigos segundos por colorearme el
tránsito***

Y a mi padre

A sus manos, que son las mías

El que me enseñó a ser lo que soy

“Un efecto extraño que hace en ciertas tierras de Indias el aire o viento que corre es marearse los hombres con él, no menos, sino mucho más que en el mar. Algunos lo tienen por fábula y otros dicen que es encarecimiento esto; yo diré lo que pasó por mí. Hay en Perú una tierra altísima, que llaman Pariacaca; yo había oído decir esta mudanza que causaba e iba preparado lo mejor que pude, conforme a los documentos que dan allá los que llaman baquianos o prácticos. Y con todo mi preparación, cuando subí las escaleras que llaman, que es lo más alto de aquella sierra, casi súbito me dio una congoja tan mortal que estuve con pensamientos de arrojarme de la cabalgadura en el suelo. Y porque, aunque íbamos muchos, cada uno apresuraba el paso, sin aguardar compañero, para salir presto de aquel mal paraje, sólo me hallé con un indio, al cual le rogué me ayudase a tener la bestia. Y con esto, luego tantas arcadas y vómitos que pensé dar el alma, porque tras la comida y flemas, cólera y más cólera, una amarilla y otra verde, llegué a echar sangre, de la violencia que el estómago sentía. Finalmente digo que si aquello durara, entendiera ser cierto el morir. Mas no duró sino obra de tres o cuatro horas, hasta que bajamos bien abajo y llegamos a temple más conveniente, donde todos los compañeros, que serían catorce o quince, estaban muy fatigados; algunos caminando pedían confesión, pensando realmente morir. Otros se apeaban y de vómitos y cámaras estaban perdidos. A algunos me dijeron que les había sucedido acabar la vida de aquel accidente. Otro ví yo que se echaba en el suelo y daba gritos del rabioso dolor que les había causado la pasada de Pariacaca. Pero lo ordinario es no hacer daño de importancia, sino aquel fastidio y disgusto penoso que da mientras dura”.

.....

“Que la causa de esta destemplanza y alteración tan extraña sea el viento o aire que allí reina, no hay duda ninguna, porque todo el remedio (y lo es muy grande) que hallan es taparse cuanto pueden oídos y narices y boca, y abrigarse de ropa, especialmente el estómago. Porque el aire es tan sutil y penetrativo que pasa las entrañas y no sólo los hombres sienten aquella congoja, pero también las bestias, que a veces se encalman, de suerte que no hay espuelas que basten a moverlas. Tengo para mí que aquel paraje es uno de los lugares de la tierra que hay en el mundo más altos, porque es cosa inmensa lo que se sube; que, a mi parecer, los puertos nevados de España y los Pirineos y los Alpes de Italia son como casas ordinarias respecto de torres altas. Y así me persuado que el elemento del aire está allí tan sutil y delicado, que no se proporciona a la respiración humana, que le requiere más grueso y más templado, y esa creo es la causa de alterar tan fuertemente el estómago y descomponer todo el sujeto”.

JOSÉ DE ACOSTA. HISTORIA NATURAL Y MORAL DE LAS INDIAS. SEVILLA. 1590

El ambiente de alta montaña se caracteriza por un descenso en la presión parcial de oxígeno, produciendo condiciones de hipoxia hipobárica en los organismos sometidos a él, en los que puede generar déficits cognitivos y cambios en la cinemática de los potenciales sinápticos generados en la vía talámico-cortical. Los déficits en aprendizaje y memoria pueden ser mitigados, incluso prevenidos totalmente, a través de la aclimatación a altura simulada, y la consiguiente hipoxia hipobárica, en condiciones reales o simuladas. El objeto principal de esta Tesis Doctoral es estudiar la repercusión de esta aclimatación sobre el rendimiento cognitivo en condiciones normales, y en altitud. La aclimatación a hipoxia hipobárica en ratones puede producir mejores rendimientos en pruebas comportamentales realizadas en condiciones normales de presión, si son de una complejidad suficiente para que hagan esperar rendimientos submáximos. Estos déficits y mejoras cognitivas están muy ligados al sistema colinérgico, en las mismas estructuras que sustentan al aprendizaje y la memoria. De esta manera, la síntesis y la degradación de la acetilcolina varían en función de una exposición aguda, o de una aclimatación a las citadas condiciones, en estructuras que componen este sistema, como son el septum medial, el hipocampo, u otras porciones de la corteza cerebral.

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. HIPOXIA HIPOBÁRICA	3
1.1.1. Fundamentos fisicoquímicos	3
1.1.2. Respuesta rápida del organismo a condiciones de hipoxia hipobárica	5
1.1.3. Efectos de una exposición aguda a hipoxia. Mal de altura	7
1.1.3.1. Efectos de una exposición severa a hipoxia hipobárica	9
1.1.3.2. Efectos <i>in situ</i> de una exposición a hipoxia hipobárica	11
1.1.3.3. Efectos post-expositivos a hipoxia	12
1.1.4. Efectos crónicos de exposición a hipoxia a hipobárica. Proceso de aclimatación	12
1.1.4.1. Efectos de una exposición intermitente	17
1.1.4.2. Efectos según etapa del desarrollo	18
1.1.4.3. Efectos en los canales iónicos	18
1.1.4.4. Otros efectos destacados	20
1.2. APRENDIZAJE Y MEMORIA	22
1.2.1. Memoria implícita	22
1.2.1.1. Condicionamiento clásico de reflejo palpebral	22
1.2.1.1.1. Sistema motor del párpado	22
1.2.1.2. Fundamentos del condicionamiento clásico de reflejo corneal	27
1.2.1.3. Fundamentos electrofisiológicos y anatómicos de la respuesta condicionada	30
1.2.2. Memoria explícita	35
1.2.2.1. Aprendizaje y memoria en condicionamiento operante en caja de Skinner	35
1.2.2.2. Memoria de reconocimiento	36
1.2.2.3. Memoria espacial	38
1.3. SINAPSI TALÁMICO-CORTICALES	41
1.3.1. Corteza prefrontal medial. Proyecciones	41
1.3.2. Núcleo mediodorsal del tálamo. Proyecciones	43

1.4. SISTEMA COLINÉRGICO	45
1.4.1. Acetilcolina	45
1.4.1.1. Distribución	47
1.4.2. Colina acetiltransferasa	49
1.4.3. Acetil colinesterasa	50
1.4.4. Efectos de la hipoxia hipobárica sobre el sistema colinérgico	51
1.4.5. Mediación del sistema colinérgico en los efectos provocados por la hipoxia hipobárica	53
1.4.6. Consideraciones morfofuncionales acerca de las estructuras cerebrales estudiadas	55
1.4.6.1. Septum medial y complejo de la banda diagonal de Broca	55
1.4.6.2. Área CA1 del hipocampo	56
1.4.6.3. Corteza piriforme	58
1.4.6.4. Corteza visual secundaria	59
2. ANTECEDENTES	63
2.1. Objetivos	67
3. MATERIAL Y MÉTODOS	69
3.1. Condiciones generales	71
3.2. Descripción de los grupos experimentales	74
3.3. ESTUDIO COMPORTAMENTAL	77
3.3.1. Condicionamiento clásico del reflejo corneal	77
3.3.1.1. Procedimientos quirúrgicos utilizados para el condicionamiento clásico	80
3.3.1.2. Registro y análisis de la actividad electromigráfica	82
3.3.2. Condicionamiento operante en caja de Skinner	85
3.3.3. Reconocimiento de objetos	88
3.3.4. Laberinto de 8 brazos	90

3.4. ANÁLISIS DE LOS POTENCIALES EXCITATORIOS POSTSINÁPTICOS PROVOCADOS EN LA VÍA TÁLAMO-PREFRONTAL A DIFERENTES ALTURAS SIMULADAS	93
3.4.1. Procedimientos quirúrgicos necesarios para la estimulación y registro	93
3.4.2. Protocolo de estimulación y registro	95
3.4.3. Perfusión y procesamiento del tejido cerebral	96
3.5. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA EXPOSICIÓN Y DE LA ACLIMATACIÓN A ALTURA SOBRE EL SISTEMA COLINÉRGICO	98
3.5.1. Perfusión y tratamiento del tejido cerebral	98
3.5.2. Técnicas inmunohistoquímicas	99
3.5.2.1. Procedimiento de revelado basado en el complejo avidina-biotina peroxidasa	99
3.5.2.2. Procedimientos de inmunofluorescencia	101
3.5.3. Captura fotográfica en microscopio óptico	102
3.5.3.1. Cálculo del área inmunoreactiva mediante el análisis de imagen	103
3.5.4. Captura fotográfica en microscopio de fluorescencia	105
4. RESULTADOS	107
4.1. ESTUDIO COMPORTAMENTAL	109
4.1.1. Condicionamiento clásico	109
4.1.1.1. Condicionamiento clásico de reflejo corneal. Paradigma de traza	109
4.1.1.2. Condicionamiento clásico de reflejo corneal. Paradigma de demora	113
4.1.2. Condicionamiento operante en caja de Skinner	116
4.1.2.1. Programa de razón fija 1	116
4.1.2.2. Programa aleatorio	118
4.1.3. Reconocimiento de objetos	121
4.1.4. Laberinto de 8 brazos	123
4.1.4.1. Tiempo de exploración	123
4.1.4.2. Relación de brazos visitados	124

4.2. ANÁLISIS DE LOS POTENCIALES EXCITATORIOS POSTSINÁPTICOS PROVOCADOS EN LA VÍA TÁLAMO-PREFRONTAL A DIFERENTES ALTURAS SIMULADAS	125
4.2.1. Amplitud de los potenciales excitatorios postsinápticos	126
4.2.2. Pendiente de los potenciales excitatorios postsinápticos	128
4.3. ESTUDIO DEL SISTEMA COLINÉRGICO EN CONDICIONES DE HIPOXIA HIPOBÁRICA	129
4.3.1. Descripción general de la distribución de los anticuerpos α -ChAT y α -AChE	129
4.3.2. Cuantificación de las reacciones α -ChAT y α -AChE	131
4.3.2.1. Área septal	132
4.3.2.2. Área CA1 del hipocampo	133
4.3.2.3. Corteza piriforme	136
4.3.2.4. Corteza visual secundaria	138
5. DISCUSIÓN	141
5.1. IMPLICACIÓN DE LA EXPOSICIÓN A HIPOXIA HIPOBÁRICA SOBRE LA MEMORIA IMPLÍCITA	143
5.1.1. Consideraciones generales	143
5.1.2. Exposición aguda	144
5.1.3. Aclimatación	146
5.1.4. Aclimatación, y prueba en condiciones normales de presión	147
5.2. IMPLICACIÓN DE LA EXPOSICIÓN A HIPOXIA HIPOBÁRICA SOBRE LA MEMORIA EXPLÍCITA	149
5.2.1. Condicionamiento operante en caja de Skinner	149
5.2.2. Reconocimiento de objetos	150
5.2.3. Laberinto de ocho brazos	153
5.3. ALTERACIÓN DE LA SINAPSI NÚCLEO MEDIODORSAL DEL TÁLAMO - CORTEZA PREFRONTAL MEDIAL POR EXPOSICIÓN A HIPOXIA HIPOBÁRICA	155
5.4. EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN A HIPOXIA HIPOBÁRICA SOBRE EL SISTEMA COLINÉRGICO	157
5.4.1. Consideraciones generales	157

Índice

5.4.2. Septum medial y núcleos de la banda de Broca	159
5.4.3. Área CA1 de hipocampo	160
5.4.4. Corteza piriforme	162
5.4.5. Corteza visual secundaria	163
6. CONCLUSIONES	165
6.1. Conclusiones	167
7. BIBLIOGRAFÍA	169
7.1. Referencias	171

ÍNDICE DE FIGURAS

1.1. Gráfico de equivalencias de distintas unidades de presión en referencia a la altitud	4
1.2. Modelo integrador de participación de la amígdala y el cerebelo en el condicionamiento clásico de tipo palpebral en ratón	33
1.3. Mecanismo neuronal de síntesis y degradación de la acetilcolina	51
3.1. Imagen general y detalles de los accesorios de la cámara hipobárica	72
3.2. Imagen del sistema de control y medición de los flujos de aire de la cámara hipobárica	73
3.3. Imagen de ejemplar de ratón de la cepa C57BL/6, utilizado durante uno de los ensayos	74
3.4. Caracterización de los grupos establecidos para las pruebas comportamentales y de condicionamiento clásico	75
3.5. Caracterización de las distintas condiciones de presión a las que fueron sometidos los animales	75
3.6. Caracterización de los grupos establecidos para las pruebas inmunohistoquímicas	76
3.7. Resumen esquemático de los diferentes paradigmas de condicionamiento aplicados	78
3.8. Representación esquemática y ordenada en el tiempo de las diferentes sesiones de habituación (H), condicionamiento (C) y extinción (E) realizadas durante el condicionamiento clásico de traza y el de demora	80
3.9. Detalles de los electrodos de estimulación y registro, la colocación y el registro en el músculo orbicularis oculi	81
3.10. Vista general de los equipos con los cuales se realizan las pruebas de condicionamiento	83
3.11. Registro electromiográfico real del músculo orbicularis oculi que recoge de forma esquemática los criterios establecidos para la consideración de respuestas condicionadas.	84
3.12. Imagen de la caja de Skinner utilizada durante las sesiones de condicionamiento dentro de la cámara hipobárica	86
3.13. Cajas de plástico donde se realiza la tarea de reconocimiento de objetos	89
3.14. Representación esquemática de la secuencia de objetos presentados en cada sesión	90
3.15. Laberinto de 8 brazos instalado en el interior de la cámara hipobárica	91
3.16. Fotografías durante la cirugía para la implantación de los electrodos de estimulación y registro	94
3.17. Esquema ilustrativo de la estimulación y el registro llevados a cabo durante la prueba para medir la actividad electrofisiológica a distintas alturas simuladas	95
3.18. Representación de las regiones analizadas para el estudio de la presencia de los marcadores α -ChAT y α -AChE	104
3.19. Representación esquemática del efecto de la aplicación del <i>grid</i> utilizado por el disector óptico ApoTome	105
4.1. Representación del porcentaje de respuestas palpebrales condicionadas alcanzado por los grupos experimentales durante el paradigma de condicionamiento clásico de tipo traza	111
4.2. Representación del porcentaje de respuestas palpebrales condicionadas alcanzado por el grupo pseudocondicionado durante el paradigma de condicionamiento clásico de tipo traza	113
4.3. Representación del porcentaje de respuestas palpebrales condicionadas alcanzado por los grupos experimentales durante el paradigma de condicionamiento clásico de tipo demora	115

4.4. Representación del porcentaje de respuestas palpebrales condicionadas alcanzado por el grupo pseudocondicionado durante el paradigma de condicionamiento clásico de tipo demora	116
4.5. Condicionamiento operante en caja de Skinner durante el programa de <i>razón fija 1</i>	117
4.6. Condicionamiento operante en caja de Skinner durante el programa <i>aleatorio</i>	120
4.7. Representación de los resultados obtenidos durante la prueba de reconocimiento de objetos	122
4.8. Representación de los resultados obtenidos para el índice <i>tiempo de exploración</i> en el paradigma del laberinto de ocho brazos	124
4.9. Representación de los resultados obtenidos para el índice <i>relación de brazos visitados</i> en el paradigma de laberinto de ocho brazos	125
4.10. Fotomicrografías de tejido cerebral mostrando la posición de los electrodos durante la prueba en uno de los ratones utilizados para el ensayo	126
4.11. Amplitud de los potenciales excitatorios postsinápticos (PEPS) provocados a diferentes alturas simuladas	127
4.12. Pendiente de los potenciales excitatorios postsinápticos (PEPS) provocados a diferentes alturas simuladas	128
4.13. Patrón de distribución de las enzimas ChAT y AChE, detectadas mediante técnicas de inmunofluorescencia	131
4.14. Análisis de inmunoreactividad para α -ChAT y α -AChE en el área septal	133
4.15. Análisis de inmunoreactividad para α -ChAT y α -AChE en el área CA1 de hipocampo	135
4.16. Análisis de inmunoreactividad para α -ChAT y α -AChE en la corteza piriforme	137
4.17. Análisis de inmunoreactividad para α -ChAT y α -AChE en la corteza visual secundaria mediomedial	139

1.1. HIPOXIA HIPOBÁRICA

1.1.1. Fundamentos fisicoquímicos

La hipoxia hipobárica se entiende como la falta de oxígeno (hipoxia) a consecuencia de unas condiciones de baja presión atmosférica (hipobaría). Estas condiciones de hipoxia hipobárica se manifiestan de forma natural en zonas de alta montaña, debido al descenso progresivo de presión atmosférica que se experimenta conforme aumenta la altitud. En este trabajo, los términos exposición a hipoxia hipobárica o a altura simulada hacen referencia a las mismas circunstancias, y han sido recreadas en el laboratorio.

La cantidad de moléculas de los gases de la atmósfera disminuye, y con ello el número de moles, a medida que aumenta la altura. Este hecho explica la bajada de presión general de la atmósfera, si se atiende a la Ley de gases ideales:

$$P = \frac{n \times R \times T}{V}$$

Donde P = presión

V = volumen

n = número de moles

R = constante universal de los gases ideales

T = temperatura absoluta

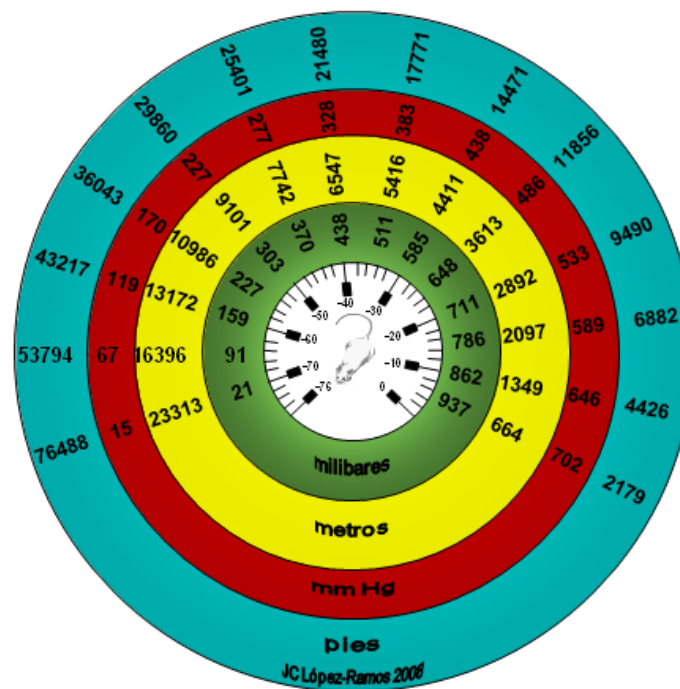


Figura 1.1. Gráfico de equivalencias de distintas unidades de presión en referencia a la altitud. Se muestran distintos valores de altitud (en metros y pies) desde una altitud correspondiente al nivel del mar, y de forma equivalente, sus respectivos valores de presión (en milímetros de mercurio –mm Hg- y en milibares) partiendo de la representación de la esfera de un vacuómetro. Autor: López-Ramos J.C., 2008.

La presión parcial (P_i) de un gas en una mezcla hace referencia a la presión que ejercería él solo manteniendo el mismo volumen de la mezcla. Todos los gases que componen la atmósfera (N_2 , O_2 y Ar, principalmente) disminuyen sus presiones parciales a medida que se asciende en altura, ya que la bajada general de presión en la atmósfera (P_T), reduce las P_i de todos sus gases, según la Ley de Dalton:

$$P_i = X_i \times P_T$$

Donde P_i = presión parcial

X_i = fracción molar

P_T = presión total de la mezcla

Las P_i de los gases de la atmósfera disminuyen proporcionalmente conforme a la bajada de presión atmosférica, puesto que la composición de gases (o fracción molar, X_i) se mantiene prácticamente estable independientemente de la altura de la atmósfera a la que se mida (20,93% en el caso del O_2).

1.1.2. Respuesta rápida del organismo a condiciones de hipoxia hipobárica

Con la bajada de presión parcial de oxígeno (PO_2) en el ambiente asociada a la altura, disminuye la presión del oxígeno inspirado (PIO_2) en los organismos, y por consiguiente, en los alveolos (PAO_2) y en las arterias (PaO_2). Esto provoca una menor disponibilidad de oxígeno en el organismo.

El índice de saturación de oxígeno (SaO_2) describe el porcentaje de hemoglobina unida a O_2 en sangre. Este índice se mantiene muy alto hasta un valor de PO_2 considerable, equivalente a unos 5000 m de altura, pero a partir de tal altura empieza a descender bruscamente. Este fenómeno se debe al aumento en los niveles de CO_2 en sangre ante una menor disponibilidad de O_2 en altura. Bajo estas circunstancias, el pH disminuye, y la afinidad de la hemoglobina por el O_2 se hace menor. De esta manera, la escasez de oxígeno en ambientes de alta montaña, unido a la menor afinidad de la hemoglobina con el O_2 en tales circunstancias, hacen descender bruscamente los niveles de oxígeno en sangre.

Existen barorreceptores a nivel periférico, localizados en la carótida y el arco aórtico, que miden los cambios en la presión arterial. La estimulación de estas zonas provoca incrementos en la actividad ventilatoria (respiratoria). La estimulación en el hipotálamo caudal además provoca incrementos en la actividad simpática, destacando el aumento de la presión sanguínea y de la tasa cardíaca (Horn y Waldrop, 1997). Durante el desarrollo fetal, en cambio, la respuesta al estímulo hipóxico es la opuesta, y consiste en una disminución de la actividad respiratoria (Martin-Body y Johnston, 1988).

Existen además células que detectan los niveles de oxígeno en el organismo. Estos quimiorreceptores monitorean los niveles de oxígeno en cada momento, y mandan las órdenes necesarias para asegurar la homeostasis y supervivencia de todo el

organismo. Participan tanto en la respuesta a una exposición aguda como a una exposición prolongada a hipoxia hipobárica (Bickler y cols., 2002). La zona donde se localizan estas células se denomina centro respiratorio (Sun y Reis, 1994), y está compuesto por el puente, el grupo respiratorio dorsal, donde se halla el núcleo del tracto solitario (Berquin y cols., 2000), y el grupo respiratorio ventral, en el que se encuentra el complejo pre-Botzinger (Solomon y cols., 2000). El hipotálamo caudal coordina la actividad de este centro respiratorio para modular una respuesta cardiorrespiratoria excitatoria a hipoxia (Horn y Waldrop, 1997).

Como respuesta a la pérdida de PO_2 en sangre (hipoxemia) se produce un incremento inmediato en la respuesta ventilatoria. Este incremento en la respiración se produce de forma proporcional según el grado de hipoxemia detectado por los quimiorreceptores. Denominado respuesta ventilatoria a hipoxia, este mecanismo es responsable de la rápida caída del CO_2 en sangre, y el equivalente incremento de PAO_2 . Este hecho desencadena una relativa alcalosis en el medio, que inhibe al centro respiratorio medular. A pesar de las condiciones alcalinas en la sangre y el fluido cerebroespinal, la ventilación continúa aumentada durante una semana aproximadamente. Esto se debe al incremento en la excreción renal de bicarbonato, que produce un efecto compensatorio de acidosis (Gallagher y Hackett, 2004).

Aunque la respuesta ventilatoria a hipoxia se active, ésta no es suficiente para contrarrestar la falta de biodisponibilidad del oxígeno, ya que los alvéolos pulmonares no son capaces de transportar la misma cantidad de oxígeno a la sangre comparado con una situación de mayor presión. El tejido cerebral es el que presenta mayor sensibilidad a la hipoxia, dado que necesita de unos requerimientos muy altos de oxígeno, de hasta 20 veces superiores a otros órganos (Ryn, 1988). De una u otra forma, todas las células que componen el sistema nervioso en el organismo se modifican y cambian la actividad en respuesta a la falta de oxígeno. La mayoría de las neuronas reducen su demanda metabólica, y sus gradientes iónicos se modifican. La alta dependencia de oxígeno en el cerebro, y la capacidad limitada de utilizar mecanismos alternativos como la anaerobiosis, fuerzan a la mayoría de las células a reducir su actividad en el cerebro ante un episodio de hipoxia. A pesar de ello, la síntesis de lactato por la activación limitada del metabolismo anaeróbico se incrementa en el cerebro (Ward y cols., 1989), incluso en

los momentos iniciales de la exposición a hipoxia (Ward y Robertson, 1995), por lo que se utiliza como bioindicador de las necesidades de oxígeno en el organismo.

1.1.3. Efectos de una exposición aguda a hipoxia. Mal de altura

Una exposición aguda a hipoxia moderada, considerada en humanos en el rango de los 3000 a 5000 metros de altitud, produce en pocas horas alteraciones sustanciales en parámetros fisiológicos y psicológicos (Banderet y cols., 1991). Se desencadenan déficits de las funciones cognitivas tales como el tiempo de reacción, la vigilancia, la memoria y el razonamiento lógico (Shukitt-Hale y cols., 1993). Estas funciones se ven alteradas desde el comienzo de la exposición a hipoxia hipobárica y, en general, al conjunto de estos y otros síntomas se los agrupa en torno al concepto de enfermedad de alta montaña. Es un síndrome frecuente que ocurre debido a una exposición rápida y moderada a hipoxia hipobárica (Hackett y Roach, 2001; Gallagher y Hackett, 2004).

Sobre este amplio término pueden establecerse diferenciaciones según algunos autores (Gallagher y Hackett, 2004). Por un lado, el mal agudo de montaña (del inglés *acute mountain sickness*, AMS), hace referencia al conjunto de síntomas generales. El edema cerebral de altitud (del inglés *high-altitude cerebral edema*, HACE), y el edema pulmonar de altitud (del inglés *high-altitude pulmonary edema*, HAPE), en cambio, aluden a síntomas específicos, que se producen en condiciones de hipoxia más severas. Otros autores utilizan de forma generalizada todos los síntomas bajo el nombre de mal de altura (del inglés *altitude illness*, *altitude sickness*), incluyendo al edema cerebral y pulmonar. Para el desarrollo del edema cerebral es necesaria la aparición previa del edema pulmonar; ambos desencadenan los síntomas más graves del mal de altura, pudiendo llegarse a producir la muerte.

Aunque se sabe que la hipoxia es la causante del AMS, los mecanismos fisiopatológicos que lo desencadenan son poco conocidos. No se han podido hallar las diferencias individuales que provocan que unos seres humanos padezcan más los síntomas (dolor de cabeza, problemas gastrointestinales, fatiga, mareos, dificultad para conciliar el sueño...) que otros. Por ejemplo, el índice metabólico del oxígeno en el

cerebro ($CMRO_2$) se hace más eficiente tras una exposición durante dos días a una altura de 3800 m; no obstante, no se han encontrado diferencias entre los valores de $CMRO_2$ de los individuos que sufren de manera más severa los efectos del mal de altura, y los que no. Tampoco se han hallado diferencias individuales en el flujo sanguíneo del cerebro, que aumenta en ambos grupos, ni en el contenido de oxígeno en arterias y venas, que en todos los individuos disminuye (Smith y cols., 2012). Sí se ha observado que en aquellos individuos que tienen mayor respuesta ventilatoria se propicia el proceso de aclimatación, mientras que en los que poseen menor respuesta, se contribuye al desarrollo del mal de altura (Gallagher y Hackett, 2004).

En la búsqueda de otras hipotéticas variaciones individuales en respuesta a la hipoxia hipobárica, se han agrupado a voluntarios en función de la mejora física que puedan manifestar tras una exposición larga a alta montaña. La eritropoyetina (EPO) es una hormona glucoproteica que se sintetiza fundamentalmente en los fibroblastos del riñón, y se encarga de regular la producción de glóbulos rojos. Aquellos individuos que mejoran físicamente tienen incrementos significativos en la concentración de esta hormona en sangre a las 30 horas desde el comienzo de la exposición, lo que da idea del mecanismo de aclimatación que empieza a emerger en el organismo, contrarrestando los efectos adversos del AMS. El aumento en la concentración de EPO en sangre permite incrementar el volumen de glóbulos rojos, y oxigenar más los tejidos, ante la escasez de oxígeno en el ambiente. Después de 14 días en altitud, los niveles de EPO siguen siendo mayores, pero ya no de manera significativa, en los individuos que no tienen sus capacidades físicas mejoradas tras la exposición (Chapman y cols., 1998).

Algunos autores relacionan la mejora del rendimiento en las actividades físicas y la mayor tolerancia subjetiva al esfuerzo que se dan durante el periodo de aclimatación (Meeuwsen y cols., 2001), con la eliminación de los efectos del mal de altura. El rendimiento físico submáximo (en referencia al nivel de esfuerzo planteado para una tarea) mejora, facilitado por una menor demanda metabólica (Latshang y cols., 2011) y un aumento en la concentración de EPO (Chapman y cols., 1998). El aumento de glóbulos rojos se traduce en una captación de O_2 más eficiente por parte del sistema respiratorio. Es, por tanto, que el proceso de aclimatación previene del mal agudo de montaña (Hackett y Roach, 2001; Palmer, 2010). La mejora subjetiva que experimentan

las personas en la realización del ejercicio tras una aclimatación a altura (o hipoxia hipobárica) también es consecuencia directa del mayor rendimiento en estos parámetros (Chapman y cols., 1998; Katayama y cols., 1998; Hendriksen y Meeuwssen, 2003; Balsalobre-Fernandez y cols., 2013).

Existen numerosos estudios que evalúan de qué manera la hipoxia produce diferentes tipos de déficits cognitivos. La memoria de corto plazo se ve comprometida 1 hora después de comenzar una exposición moderada a 4400 m de altura simulada (Shukitt-Hale y cols., 1996). Este tipo de memoria también se ve afectada bajo hipoxia en experimentos de condicionamiento operante en insectos, como en el caso de *Drosophila* (Xia y cols., 1999). Algunos estudios muestran también que la falta de oxígeno interfiere de manera directa en la consolidación de la memoria a largo plazo (Hayes, 1953; Thompson, 1957), entre ellas en el condicionamiento operante con refuerzo negativo en ratas (Giurgea y cols., 1971).

En la literatura se pueden establecer varias clasificaciones según como se trate el tema de la hipoxia hipobárica. Algunos estudios diferencian en función de los efectos producidos por una exposición severa a hipoxia, con consecuencias más graves para el funcionamiento del organismo. Otros estudios describen los efectos provocados por la hipoxia *in situ*, esto es, los efectos inmediatos durante la exposición, mientras otros se centran en los efectos post-exposición. Dentro de esta clasificación, también se puede encontrar diversa bibliografía en cuanto a estudios centrados en organismos aclimatados o expuestos de manera aguda, tanto durante la exposición, como en los efectos posteriores medidos a presión normal (760 mmHg).

1.1.3.1. Efectos de una exposición severa a hipoxia hipobárica

Una exposición aguda a valores muy bajos de presión parcial de oxígeno, equivalentes a altitudes superiores a 5000 metros (simulados o no), puede producir déficits cognitivos de larga duración. Durante el condicionamiento de evitación pasiva se reflejan parte de estos déficits (Vataeva y cols., 2004). Se ha demostrado cómo la memoria y el aprendizaje espacial también se ven afectados por la reducción severa del

oxígeno disponible (Van Liere y Stickney, 1963). El trabajo de Shukitt-Hale y cols. (1994) también aportó pistas sobre ello, al establecer diferentes grupos expuestos a distintas intensidades o alturas (nivel del mar, 5500 m, 5950 m, 6400 m), y con distinta duración (2 ó 6 horas de exposición). A 5500 m de altura simulada no se experimentaban efectos apreciables sobre el aprendizaje y memoria espacial; en cambio, a 5950 y 6400 m de altura simulada, si se provocaron efectos adversos, más notables cuanto más prolongada fue la exposición (6 horas frente a 2 horas).

Otro estudio que prueba la relación de dependencia entre intensidad de la exposición a hipoxia hipobárica y los efectos cognitivos que provoca durante este periodo, fue el realizado por Shukitt-Hale (1998) en humanos. En este trabajo no hubo aclimatación, puesto que la exposición a hipoxia fue mínima: se realizó hasta tres veces durante 4,5 horas. Las pruebas tuvieron lugar durante una exposición a 500 m, 4200 m y 4700 m. La exposición a altura aumentó la ansiedad, la depresión, la hostilidad, el enfado, la fatiga, el mareo, la confusión y el sueño, y redujo el vigor y la claridad de ideas, entre otras. Todos estos síntomas empeoraron durante una exposición a 4700 m; en cambio, a 4200 m sólo algunos de los citados síntomas afectaron significativamente (mareo, confusión y sueño). Fueron necesarias pocas horas para que estos síntomas se manifestaran a distintas alturas simuladas; y la severidad de la afección fue mucho mayor a 4700 m que a 4200 m de altura simulada.

Algunos estudios se han encargado de probar los efectos sobre el aprendizaje y la memoria en laberintos tras una exposición a gran altura. Bunch en 1952 analizó la memoria espacial de ratas, tras una exposición a 9100 m de altura simulada (antes o después de nacer), comprobando como interfería significativamente a posteriori. Un estudio paralelo describió el empeoramiento en ratas durante la ejecución de un paradigma de laberinto en T, tras una exposición de 9100m de altura simulada (Hurder, 1951). La memoria visual y verbal a largo plazo también se vieron afectadas durante 30 días en el rango de los 5488-8488 m de altura simulada (Hornbein y cols., 1989) en un experimento llevado a cabo en humanos.

Otros estudios muestran como las ratas sobreviven a episodios de hipoxia severa (unos 10000 m de altura simulada, durante 3 horas), aunque acaban desarrollando daño

en las neuronas de la corteza e hipocampo (Rybnikova y cols., 2005; 2006). Las neuronas afectadas tras un episodio de hipoxia muestran incrementos en la mayoría de genes de expresión temprana y alteración en los factores de transcripción (Samoilov y cols., 2001; Rybnikova y cols., 2004).

1.1.3.2. Efectos *in situ* de una exposición a hipoxia hipobárica

En general, son menos numerosos los estudios que se centran en analizar los efectos durante la exposición a altura. Vacher y Miller (1968) ya comprobaron la afección del aprendizaje bajo estas circunstancias (a 10000 m de altura simulada) en ratas no aclimatadas, en un paradigma de laberinto en agua, y comprobaron como todos los parámetros estudiados (número de intentos y errores para realizar satisfactoriamente la prueba, y tiempo de ejecución) se veían alterados durante la exposición.

Al estudiar la memoria espacial en estas condiciones, se recurre frecuentemente al laberinto de Morris (Morris, 1981). Éste es un paradigma en el cual se sumerge al roedor en un punto fijo dentro de una piscina comúnmente circular llena de agua opaca. La piscina contiene una pequeña plataforma sumergida a escasos milímetros de la superficie del agua, la cual el animal debe encontrar para salir del agua, y ponerse a salvo. Se proporcionan marcas visuales facilitar la orientación, y se miden parámetros como el tiempo que tarda en encontrar la plataforma (latencia de escape), así como los sucesivos intentos posteriores para encontrarla, que son indicativos de memoria espacial.

En un experimento con ratas, éstas se sometieron al laberinto de Morris a distintas alturas simuladas (nivel del mar, 5500 m, 5950 m, 6400 m) durante periodos cortos. Se observó cómo aumentaban el tiempo de latencia y la distancia recorrida hasta dar con la plataforma, y disminuían la velocidad, en función del aumento de altura simulada a las que se exponía durante la prueba (Shukitt-Hale y cols., 1994). Al día siguiente de la exposición, los déficits observados en estos parámetros seguían patentes, incluso disminuyó la velocidad de escape en estos animales.

1.1.3.3. Efectos post-expositivos a hipoxia

En cuanto a los efectos post-exposición en organismos no aclimatados, existe cierta controversia. Ratas jóvenes fueron expuestas durante un corto periodo de tiempo (60 min) a hipoxia hipobárica severa (7000 m). Después fueron evaluadas en el laberinto de Morris, y los resultados reportaron menores tiempos para la latencia de escape y una mayor eficiencia (o éxito) en la búsqueda de la plataforma, con respecto a las ratas no expuestas a esas condiciones de hipoxia. Una vez ambos grupos aprendieron con efectividad la tarea, las ratas que no fueron previamente expuestas a la hipoxia, lo hicieron en las mismas condiciones que las primeras. En este caso, no hubo mejora significativa en los patrones estudiados para estas ratas. Estos resultados indicaron que una exposición breve a hipoxia hipobárica severa aumenta la orientación espacial de ratas (Wittner y Riha, 2003).

1.1.4. Efectos crónicos de exposición a hipoxia a hipobárica. Proceso de aclimatación

Una exposición prolongada en el tiempo a condiciones ambientales de baja disponibilidad de oxígeno, debido a la presión, favorece el proceso de aclimatación en los organismos (Gallagher y Hackett, 2004). De esta forma, todos los síntomas descritos en las funciones cognitivas bajo episodios agudos se pueden reducir o eliminar por completo en el proceso. La mejora de los parámetros cognitivos dependen de las características en las que el proceso de aclimatación se lleva a cabo (intensidad y duración de la exposición a hipoxia hipobárica, principalmente). Por ejemplo, la afección del aprendizaje en humanos se manifiesta hasta los 75 días tras el comienzo de una exposición a 4000 – 5000 m de altura simulada (Cavaletti y cols., 1990).

Los efectos que provoca esta aclimatación a altura (o hipoxia hipobárica), a nivel molecular, celular y fisiológico son muy variados, y condicionan los efectos que puedan provocar exposiciones posteriores a hipoxia hipobárica. La aclimatación implica un aumento en los niveles de GMP cíclico (cGMP). Este incremento está directamente relacionado con la mejora en la capacidad de aprendizaje (Boess y cols., 2004). El cGMP

regula además la síntesis de la proteína Fos (Pilz y Broderick, 2005), implicada también en procesos de aprendizaje (Carrive y cols., 1997).

Por otra parte, el proceso de aclimatación también lleva consigo el descenso del plasma sanguíneo, y el aumento en los niveles de EPO y eritrocitos (Heinicke y cols., 2003). La EPO, además, induce aumentos en la concentración de K^+ , que puede facilitar la liberación de acetilcolina en las neuronas (Yamamoto y cols., 2000); la liberación de este neurotransmisor también está implicada en procesos de aprendizaje, como más adelante se menciona.

Se ha demostrado una afección del aprendizaje durante condiciones de hipoxia (10000 m de altura simulada), en ratas previamente aclimatadas. Las ratas aclimatadas realizaron mejor la tarea (según los distintos índices evaluados) en un tipo de laberinto de agua, respecto a las que no llevaron consigo el proceso de aclimatación a altura (Vacher y Miller, 1968). También se han descrito incrementos en la expresión de factores de transcripción, que se activan por la expresión de ciertos genes (Rybnikova y cols., 2004, 2008; López-Ramos y cols., 2007), péptidos antioxidantes (Stroev y Samoilov, 2006) y factores contra la apoptosis (Samoilov y cols., 2005) durante el proceso. La aclimatación a altura, además, previene del empeoramiento experimentado en ratones expuestos a hipoxia hipobárica aguda en el paradigma de condicionamiento clásico (López-Ramos y cols., 2007).

Los cambios que se producen en un organismo aclimatado a altura cuando se somete a un posterior episodio de hipoxia tienen un interés crucial en investigación y biomedicina aplicada, ya que, como se ha comprobado, mitigan los efectos característicos del AMS. El proceso de aclimatación proporciona protección frente a exposiciones posteriores a unas condiciones de hipoxia más severas (Samoilov y cols., 2001; Vataeva y cols., 2004; Rybnikova y cols., 2005), en referencia al daño funcional que pueden sufrir las neuronas. Para una adecuada protección frente a la hipoxia severa, se ha estimado el tiempo necesario que debe permanecer un organismo en condiciones moderadas de hipoxia para su aclimatación. Este periodo debe ser mayor de 24 horas para reducir al máximo los efectos adversos posteriores que pueda provocar la hipoxia severa (Barone y cols., 1998).

Durante este periodo tiene lugar la expresión de genes y síntesis de proteínas de novo, que intervienen en dicha protección. Un papel importante lo ostenta la superfamilia de genes de expresión temprana, cuyos productos proteicos son, por lo general, factores de transcripción que regulan la expresión de otros genes de expresión tardía.

El gen de expresión temprana NGFI-A, que codifica al factor de crecimiento nervioso, produce un aumento significativo en su expresión desde las 24 horas del comienzo de una exposición moderada a hipoxia en ratas, y es crítico en la señalización celular para la activación de otros genes (Milbrandt, 1987). En cambio, el pico de mayor expresión en este gen durante una exposición severa a hipoxia (de unos 10000 m) se produce mucho antes y, pocas horas después, este incremento en la expresión se disipa (Rybnikova y cols., 2002). El incremento a largo plazo producido en la expresión durante la exposición moderada a hipoxia se halla en corteza piriforme, amígdala e hipocampo. NGFI-A parece ser clave en la respuesta frente a hipoxia (Walton y cols., 2009) y se considera que está implicado en ciertos tipos de aprendizaje y memoria, en plasticidad sináptica, en el control de la proliferación celular y en la muerte celular programada (Tischmeyer y Grimm, 1999). Es muy probable que la débil expresión de este gen tras una exposición severa a hipoxia esté detrás del empeoramiento experimentado en aprendizaje y memoria. La aclimatación moderada a altura previene del deterioro experimentado en la adquisición y retención de las respuestas ante el paradigma de evitación pasiva, y se relaciona con el cambio de patrón en la expresión del gen NGFI-A en ratas (Rybnikova y cols., 2005).

Por otro lado, la proteína Fos es resultante del gen de expresión temprana c-fos, y ante un episodio de hipoxia hipobárica se puede hallar en distintas partes del cerebro; aquellas donde se expresa son indicativas de una activación neuronal durante la hipoxia (Erickson y Millhorn, 1991; Larnicol y cols., 1994; Berquin y cols., 2000; Neubauer y Sunderram, 2004). Durante una exposición aguda a hipoxia se obtiene una alta expresión de Fos en el núcleo del tracto solitario, corteza piriforme e hipocampo, entre otros (López-Ramos y cols., 2007). Fos, además, puede expresarse durante un proceso de aprendizaje en el animal, aunque la interacción entre este proceso y la exposición a

hipoxia hipobárica no ha sido estudiada. En cualquier caso, los mecanismos celulares involucrados en ambos procesos son similares.

Los efectos que provocan unas condiciones de hipoxia a 6100 m de altura simulada, a las 3,7, 14 y 21 semanas, han sido evaluados en ratas. Los resultados son distintos dependiendo de la duración de la exposición a la que se someten éstas. Hasta los 14-21 días se experimenta un empeoramiento en todos los parámetros evaluados: la memoria espacial es significativamente afectada, se observa un incremento en marcadores de estrés oxidativo como peroxidación lipídica y radicales libres, y un descenso en los niveles de antioxidantes tales como GSH, GSSG y GR. También se observan células picnóticas (en las que la cromatina se encuentra muy condensada, síntoma asociado a estados patológicos), neurodegeneración, fragmentación de ADN y apoptosis, en corteza, hipocampo y estriado. A partir del día 21 del proceso de aclimatación los efectos adversos empiezan revertir. Mejora la memoria espacial, acompañada de un aumento de la actividad antioxidante en general; no obstante, la presencia de radicales libres prosigue incrementada. También mejora la arborización dendrítica en CA3 y corteza (Maiti y cols., 2008).

En los últimos años, algunos estudios han concluido que el estrés oxidativo es uno de los causantes de la degeneración y la muerte celular que caracterizan a las condiciones de hipoxia (Kumura y cols., 1996; Magalhaes y cols., 2005). La acumulación de radicales libres y el incremento de lactato podrían estar implicados en este proceso (Behar y cols., 1983; Ward y Robertson, 1995). El daño celular está íntimamente relacionado con el metabolismo oxidativo en la mitocondria: ésta sufre una vacuolización y alteración de la membrana interna, con posterior fragmentación de ésta, lo que provoca una fuerte alteración en la homeostasis celular que repercute en la síntesis de proteínas. El daño fosfolipídico en las membranas provoca cambios en la permeabilidad de éstas, alterando el balance electrolítico en las neuronas. Éste último hecho afecta a los mecanismos de despolarización e hiperpolarización, ralentizando la transmisión sináptica, entre otros (Bogolepov, 1983; Dickinson 1983).

Estudios de imagen de resonancia magnética han revelado una pérdida significativa de materia gris y atrofia en corteza, hipocampo, estriado, colículo superior y

cuerpos geniculados laterales (Gibson, 1985; Ward y Robertson, 1995; Shukitt-Hale 1996; Maiti y cols., 2008), que caracterizan al daño neuronal ocasionado por la hipoxia.

Una exposición aguda y severa a hipoxia favorece la necrosis celular, mientras que una exposición crónica puede favorecer la muerte por apoptosis (Choi, 1996). Ésta última se caracteriza en hipoxia por la condensación de la cromatina y fragmentación de ADN, además de pequeñas burbujas en la membrana y presencia de cuerpos apoptóticos. La necrosis, en cambio, está caracterizada por la dilatación de retículo endoplasmático, disgregación de polirribosomas y desequilibrio electrolítico en dendritas (Wyllie y cols., 1980; Moller y cols., 2001). Estas alteraciones son reversibles y se desarrollan en los primeros minutos de hipoxia (según la intensidad del episodio). Más tarde, se puede producir cristolisis (rotura de crestas mitocondriales) y aparecer floculaciones (proteínas desnaturalizadas) de la matriz de las mitocondrias, que indican aparentemente lesión irreversible de la célula en necrosis.

La exposición a hipoxia hipobárica parece producir diferentes efectos en función del sexo del animal (Sanfilippo-Cohn y cols., 2006). No obstante, la literatura que incide en una distinción entre sexos es escasa, al centrarse en los efectos producidos en el género masculino particularmente. No obstante, se ha comprobado como una aclimatación prolongada (2 meses) a 5000 m de altura simulada provoca mayor rapidez en la formación del reflejo de condicionamiento aversivo, y un mayor tiempo necesario para la extinción de la conducta (preservación) en ratas adultas macho; no así en hembras, que no experimentaron cambios (Meerson y Radzievskii, 1976).

En general, la síntesis de algunos neurotransmisores, como la dopamina o serotonina, no se ve tan afectada por la hipoxia. Los niveles de ATP, ADP y AMP permanecen casi invariables incluso bajo condiciones de hipoxia severa (Ward y Robertson, 1995). Tampoco la síntesis de aminoácidos (Freeman y cols., 1986). Sin embargo, se ha observado que las reacciones de hidroxilación de ciertos aminoácidos como el triptófano y la tirosina, esenciales para la síntesis de dopamina y serotonina, son muy sensibles a las bajas concentraciones de oxígeno (Davis y Carlsson, 1973, Davis y cols., 1973). La respuesta a hipoxia hipobárica sí produce una alteración importante en

el sistema colinérgico del organismo (Gibson y Duffy, 1981; Chleide e Ishikawa, 1990; Muthuraju y cols., 2009, 2010, 2011), como más adelante se detalla.

1.1.4.1. Efectos de una exposición intermitente

Un estudio en el que se evaluó el aprendizaje y la memoria espacial en ratones, tras una exposición intermitente de 4 horas diarias a hipoxia hipobárica a 2000 ó 5000 m, y durante 1, 2, 3 ó 4 semanas desde el nacimiento de los individuos (Zhang y cols., 2005), midió el tiempo de latencia de escape con el paradigma del laberinto de Morris, los errores cometidos en el laberinto de 8 brazos, la densidad de sinapsis y niveles de p-CREB en el hipocampo, y las consecuencias de inducir potenciación a largo plazo (en inglés, long-term potentiation, LTP) in vitro, en la vía CA3-CA1 a través de las colaterales de Schaffer. La presencia de p-CREB es indicativa de cambios en los patrones de transcripción en las neuronas, y la LTP en CA3-CA1 marca la posibilidad de que esta vía sea utilizada en procesos de aprendizaje. Los resultados indicaron que los ratones expuestos a hipoxia intermitente durante 3 y 4 semanas y 2000 m de altura simulada redujeron significativamente los tiempos de latencia y los errores en el laberinto de Morris y el laberinto de 8 brazos, respectivamente, con respecto a ratones control. Esta mejora siguió siendo significativa semanas después en el caso de los ratones con un periodo más largo de aclimatación (4 semanas). Los ratones expuestos a hipoxia intermitente durante 4 semanas a 2000 m y 5000 m de altura simulada, además, incrementaron los valores de amplitud de los potenciales postsinápticos excitatorios inducidos durante la LTP, el número de sinapsis, y los niveles de p-CREB en el hipocampo, con respecto a los ratones control.

De esta forma, una exposición a hipoxia hipobárica intermitente durante varias semanas en ratones postnatales favorece el aprendizaje y memoria espacial, y está relacionada con aumentos en los niveles de proteínas de transcripción, número de sinapsis y aumento de la LTP en hipocampo. Paralelamente, una exposición a hipoxia continuada (o ininterrumpida a lo largo del tiempo) también puede tener efectos beneficiosos en cuanto al aprendizaje y la memoria, tal como se describe en apartados anteriores.

1.1.4.2. Efectos según etapa del desarrollo

La exposición a hipoxia hipobárica produce diferentes efectos en función de la etapa de desarrollo o estado de madurez en la que ocurre. Durante el desarrollo fetal la respuesta al estímulo hipóxico consiste en disminuir la actividad respiratoria, al contrario de lo que ocurre en adultos, ya que lo opuesto puede ser contraproducente para el feto (Martin-Body y Johnston, 1988). Esta respuesta diferente también se puede producir en el adulto (Neubauer y cols., 1990; Bissonnette, 2000).

Un estudio en ratas jóvenes y adultas ha permitido conocer la importancia del estado de madurez del sistema nervioso en el aprendizaje operante bajo condiciones de hipoxia (Jänicke y Schulze, 1987). La eficiencia del aprendizaje en estas condiciones depende de la edad de las ratas (cuanto más jóvenes, más rápido se produce el aprendizaje) en un paradigma de *razón fija* 10 y en otro *aleatorio* de condicionamiento operante (más adelante se detallan ambos paradigmas). Cuando se aumenta la complejidad de la tarea (programa *aleatorio*), las ratas jóvenes aprenden la tarea más rápidamente en condiciones de hipoxia, mientras que en ratas de 20 meses el aprendizaje es más rápido en condiciones normales de oxígeno (Jänicke y Schulze, 1987).

Se ha observado una disminución en la concentración de ADN y en el número de células en la corteza cerebral e hipocampo en ratas nacidas y criadas a 3800 m de altura. En contraste, durante la aclimatación de ratas adultas se produce una mayor activación de ARN y síntesis de proteínas en neuronas y glía de la corteza (Meerson y cols., 1969, 1973), acompañada de una más rápida transición de la memoria de corto plazo a largo plazo (Meerson y cols., 1972). Algunos autores consideran que una exposición intermitente y gradual hasta mayores niveles de hipoxia hipobárica, en etapas tempranas de la ontogenia del animal (cuyo cerebro es particularmente sensible a la falta de oxígeno), puede favorecer a posteriori una rápida adquisición del reflejo condicionado de evitación (Meerson y Radzievskii, 1976).

1.1.4.3. Efectos en los canales iónicos

Muchos de los efectos neurofisiológicos de una exposición a hipoxia hipobárica tienen su origen en cambios en la función de canales iónicos (López-Barneo y cols., 2001;

Neubauer, 2001). Son varios los canales iónicos modulados directa o indirectamente por hipoxia, de manera que pueden incrementar la excitabilidad de las neuronas en tales condiciones. Los mecanismos de transducción que participan en estos procesos vienen determinados por el tipo de canal iónico.

Una exposición a altura simulada en el rango de los 4000 m hace disminuir la corriente de K^+ en los quimiorreceptores (López-Barneo y cols., 1988). Esta corriente puede generar una despolarización de las células, abriendo los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, provocando la liberación de neurotransmisor, y la activación de nervios sensoriales. Existen evidencias de que los canales de Ca^{2+} son sensibles de forma directa al estímulo de la hipoxia; este tipo de canales se inhibe en ciertas células durante estas condiciones (Montoro y cols., 1996).

La hipoxia hipobárica modifica las señales glutamatérgicas en el cerebro, que acaban produciendo un incremento prolongado de los niveles de Ca^{2+} dentro de las células. Al estimular varios subtipos de receptores de glutamato ionotrópicos y metabotrópicos (AMPA y NMDA, entre otros) con sus agonistas, se obtienen los patrones de respuesta para el Ca^{2+} . Este flujo de calcio y su acumulación en el citosol, como consecuencia de la liberación de glutamato durante un episodio de hipoxia, pueden desencadenar toxicidad en el cerebro (Benveniste y cols., 1988; Paschen, 1996; Perez-Velazquez y cols., 1997). Se especula que el zinc podría tener una respuesta similar al calcio durante la liberación de glutamato bajo estas condiciones (Stork y Li, 2006).

En un experimento en el que se estimularon estos receptores en corteza piriforme de rata, se comprobó cómo, bajo condiciones de hipoxia hipobárica, se producía una modificación en la respuesta del calcio. Ésta dependía de la intensidad de la exposición, desencadenando la muerte de las células cuando la severidad de la hipoxia era muy alta, o tolerancia a la hipoxia cuando la hipoxia era más moderada (Semenov y cols., 2010). El desarrollo del programa de muerte celular y la necrosis están determinados por el incremento de calcio intracelular, la duración de este incremento, y la localización en las distintas partes de la célula (Choi y cols., 1998; Pérez-Pinzón y cols., 1999; Bano y Nicotera, 2007). Además, La aclimatación a hipoxia hipobárica previene del

exceso en la concentración de calcio intracelular y la modificación de las señales glutamatérgicas que se producen ante episodios de hipoxia severa (Miller y cols., 2004; Semenov y cols., 2008).

La nimodipina es un bloqueador de canales de calcio que se utiliza como vasodilatador cerebral. Tiene la propiedad de incrementar los niveles de ACh extracelular. En un estudio en el cual se expuso a ratas a una altitud de 5500 m durante 8 horas, y se midió *in situ* el nivel de ACh en el área CA1 y giro dentado, se comprobó cómo los valores extracelulares del neurotransmisor disminuían en ambas zonas, respecto a los valores de ratas no expuestas a altura. La administración de nimodipina, tanto previa a la exposición, como por tratamiento posterior, resultaban en la recuperación de los valores basales de neurotransmisor obtenidos en las ratas no expuestas a altura (Shukitt-Hale y cols., 1993).

1.1.4.4. Otros efectos destacados

La enzima óxido nítrico sintasa (NOS) es otro de los elementos que puede influir en respuesta a la hipoxia, al intervenir en procesos regulatorios como la circulación sanguínea en el cerebro. La NOS es la enzima responsable de transformar, mediante procesos de oxidación-reducción, el aminoácido L-arginina en óxido nítrico (NO). Este neuromodulador actúa como excitador en la respuesta ventilatoria a hipoxia (Gozal y Gozal, 1999).

Una de las isoformas de la enzima expresada en el tejido nervioso, la denominada neuronal NOS (nNOS), se encuentra ampliamente distribuida por corteza cerebral, septum, hipocampo, amígdala, tálamo, hipotálamo, cerebelo, y núcleo del rafe, entre otros. La alteración en la producción de óxido nítrico por parte de la enzima nNOS ante episodios de hipoxia hipobárica favorece el aumento en los niveles de GMP cíclico en las células (Postovit y cols., 2005). Este segundo mensajero también está relacionado con procesos de aprendizaje (Boess y cols., 2004) y, además, esta vía de señalización promueve la expresión de genes regulados por el factor inducible a hipoxia (HIF-1),

factor de transcripción que tiene un papel relevante en las células como respuesta a ésta (Ratcliffe, 2003).

La vasta distribución de la nNOS en todo el sistema nervioso central sugiere que pueda intervenir además en varios sistemas de neurotransmisión (Rodrigo y cols., 1994). El sistema colinérgico puede ser uno de ellos, ya que también participa en la regulación del flujo sanguíneo en el cerebro (Schliebs y Arendt, 2006). El aumento de óxido nítrico en respuesta a la sobreexpresión de la isoforma iNOS (o NOS inducible) durante episodios de hipoxia hipobárica aguda, puede también interrumpir el proceso de consolidación de la memoria, como resultado de la alteración de la función colinérgica. El tipo de memoria que se ve perjudicada es la retrógrada, no observándose alteración ninguna en la de tipo anterógrada. El producto de la expresión de la NOS inhibe la actividad de la acetil colinesterasa en estas condiciones, y en último término puede explicar los déficits de memoria observados (Udayabanu y cols. 2008).

Algunas investigaciones atribuyen los efectos supuestamente producidos por la hipoxia a otras causas asociadas a ésta. Así, por ejemplo, la calidad del sueño no es evaluada durante la exposición a hipoxia en muchas ocasiones, y sin embargo existe el riesgo de que episodios de apnea o frecuentes interrupciones en el proceso normal del sueño puedan provocar que la calidad de éste se presente muy deteriorada en los individuos durante la exposición. Los resultados de las investigaciones sobre una exposición a altura, pues, pueden verse alterados por estas circunstancias si no se controlan (Thomas y cols., 2007).

Modelos de hipoxia intermitente nocturna en ratas y ratones han mostrado evidencias sobre disfunciones ejecutivas y exceso de sueño (Sanfilippo-Cohn y cols., 2006), pero no se ha establecido una causa-efecto directa entre posibles episodios de fragmentación de sueño y las disfunciones señaladas. En esta línea, tras una exposición alternante cada 90 segundos de niveles normales de O₂, y de niveles equivalentes a 5000 metros de altura, durante el ciclo de sueño en ratas, éstas empeoraron la memoria de trabajo en el paradigma de laberinto de Morris, tras 15 días de exposición (Row y cols., 2007), aunque no se investigó la causa directa de la afección. Dada esta limitación de los estudios actuales para separar los efectos directos que produce la exposición a hipoxia y

los atribuibles a una afección del sueño durante la exposición, será necesario profundizar en esta materia en un futuro. Estudios en humanos, en los que se evalúe la función cognitiva en respuesta a una exposición a hipoxia nocturna controlando que no se produzcan estas interrupciones durante el sueño, tampoco han sido completados (Thomas y cols., 2007).

Estudios en pacientes con apnea del sueño sugieren que los efectos de la fragmentación o las interrupciones durante el sueño pueden ser enmascarados por algunos de los efectos causados por la hipoxia (Colt y cols., 1991).

No obstante, un ensayo en el que se clasificó a individuos en dos grupos en función de su sensibilidad a desarrollar episodios como la apnea, no estableció diferencias en cuanto a la ejecución de tareas para evaluar la memoria de trabajo. Se expuso a estos individuos a 9 horas diarias de hipoxia hipobárica (4000 m de altura simulada) durante cada noche. Medidas del flujo de aire a través de una cánula nasal fueron realizadas para identificar a los sujetos susceptibles de desarrollar alguna alteración en la respiración. El tiempo total de sueño se redujo en ambos grupos (45 min), aunque la sensación de sueño no se vió alterada. Tampoco hubo diferencias en cuanto al estado de ánimo, atención ni memoria de trabajo en ninguno de los grupos estudiados (Thomas y cols., 2007). Este estudio sugiere una menor importancia de la calidad del sueño en los resultados sobre los efectos de la hipoxia hipobárica.

1.2. APRENDIZAJE Y MEMORIA

1.2.1. Memoria implícita

1.2.1.1. Condicionamiento clásico de reflejo palpebral

1.2.1.1.1. Sistema motor del párpado

El sistema motor se encarga de producir el cierre y apertura del párpado. Es un mecanismo eficaz para la preservación de la córnea, tanto para la protección física de

posibles agresiones externas, como para el mantenimiento de las condiciones de humedad y transparencia del ojo (Bach y Rita, 1971). También posee una función activa en la eliminación de cuerpos extraños que entran en contacto con la superficie de la córnea y el tejido conjuntivo. Además de la función protectora, el parpadeo está relacionado con la expresión de diferentes emociones (Evinger, 1995; Gruart y cols., 1997).

El sistema está constituido por músculos, las motoneuronas que los inervan, y ligamentos. Para el cierre efectivo del párpado son fundamentales los siguientes músculos:

- Músculo *orbicularis oculi* (u orbicular): participa en el cierre reflejo y espontáneo del ojo. Está formado por fibras estriadas que se disponen paralelamente a los márgenes del párpado, lo que le da un aspecto circular alrededor de la fisura palpebral. Se divide en una porción palpebral, que es la porción móvil, y una parte orbicular, que se inserta en el borde del hueso de la órbita. Las unidades motoras del músculo orbicular de los párpados son pequeñas; esta característica sugiere una participación muy fina del músculo en el control del movimiento. Las motoneuronas que inervan este músculo se encuentran en la parte dorsolateral del núcleo facial (Shaw y Baker, 1985). Estas motoneuronas faciales no pueden informar de la posición del músculo debido a que los músculos faciales carecen de husos musculares (receptores sensoriales de los músculos esqueléticos que informan del grado de estiramiento que está ejerciendo el músculo). La frecuencia de oscilación en estas motoneuronas varía entre especies de manera inversamente proporcional a su tamaño. Así, especies animales de mayor tamaño corporal poseen menor frecuencia de oscilación del párpado.
- Músculo elevador: permite que el párpado acompañe a los movimientos oculares, y está inervado por motoneuronas que se localizan en el núcleo motor ocular común. Este músculo controla la posición del párpado, y se encuentra tónicamente activo entre parpadeos, manteniendo el párpado abierto contra la acción de la gravedad (Becker y Fuchs, 1988). La composición de estas fibras musculares, resistentes a la fatiga, y el tamaño

medio de las unidades motoras, hace que este músculo pueda mantener de forma sostenida la posición del párpado y seguir con precisión los movimientos oculares. Las motoneuronas del núcleo motor ocular común se distribuyen de manera distinta en función del tipo de visión. En especies con visión lateral, como el ratón, las motoneuronas se disponen en su parte posterior (Glicksman, 1980).

En el músculo elevador del párpado se inserta otro músculo, el músculo liso de Müller (músculo tarsal superior), que se activa durante el movimiento de subida del párpado. Este músculo está inervado por las motoneuronas del ganglio cervical superior (VanderWerf y cols., 1996) y participa fundamentalmente en respuestas emocionales, como la sorpresa y el miedo (Evinger, 1995).

- Músculo *retractor bulbi*: es un músculo extraocular dividido en cuatro láminas que se insertan en la parte interna del globo ocular. Su función es retraer el globo ocular hacia el fondo de la órbita, lo que facilita el movimiento de cierre del párpado. Se encuentra en la mayoría de vertebrados. Dado que el músculo *retractor bulbi* está formado por fibras musculares grandes, de contracción rápida, sin inervación múltiple y con un tamaño de la unidad motora relativamente alto (Alvarado y cols. 1967), hace que sea un músculo apto para movimientos muy rápidos (como el cierre reflejo del párpado). Las motoneuronas que inervan a este músculo se encuentran en el núcleo accesorio del motor ocular externo (Grant y cols., 1979; Delgado-García y cols., 1990), aunque una pequeña porción aparece en el núcleo principal del motor ocular externo (Delgado-García y cols., 1990).

En general, durante la correcta oclusión del párpado se inhibe el músculo elevador del párpado y el músculo de Müller e, inmediatamente, se activa el músculo orbicular del párpado. Los ligamentos y tendones asociados al párpado son los responsables de la fuerza pasiva de bajada que actúa de modo constante sobre el párpado superior.

Existe una amplia variedad de movimientos de distinta cinética asociados a partir de este sistema de músculos:

a) Parpadeos espontáneos. Este tipo de parpadeo es repetitivo y ocurre periódicamente en ausencia de estímulo externo. Se sugiere que el complejo espinal trigeminal es la estructura generadora de este tipo de movimientos (Kaminer y cols., 2011). Cinéticamente, los parpadeos espontáneos consisten en un rápido cierre seguido de una fase más lenta de apertura. Durante el cierre espontáneo, el párpado impediría captar parcial o totalmente la información visual del exterior, debido a su opacidad pero, en ese instante, la sensibilidad visual desaparece (Manning y cols., 1983) y se produce una continuidad visual respecto a las imágenes captadas previamente al cierre del ojo (Hari y cols., 1994). La corteza occipital lateral, en concreto, el área V5/MT, muestra inhibición de respuesta ante la estimulación visual durante el parpadeo, y se relaciona con la pérdida de procesamiento visual experimentado (Bristow y cols. 2005). La región parieto-occipital medial, en cambio, muestra incremento de la actividad, relacionada con la continuidad visual experimentada (Hari y cols., 1994).

b) Parpadeos voluntarios. Estos movimientos están relacionados con la corteza visual, la corteza parietal posterior y el giro frontal medial y superior (Bodis-Wollner y cols., 1999). Se ha observado que las lesiones de la corteza motora facial provocan que los párpados no se puedan contraer voluntariamente, aunque se mantenga el parpadeo reflejo mediado por distintas modalidades sensoriales.

c) Parpadeos reflejos. La presencia de cualquier partícula o estímulo mecánico sobre la piel alrededor del ojo o la córnea, numerosa y extensamente inervada, produce la respuesta refleja del párpado. En este reflejo participa la rama supraorbitaria del nervio trigémino (Overend, 1896). El movimiento de éste consiste en una rápida bajada y una fase más lenta de subida. Durante el movimiento de cierre se pueden registrar dos componentes en la actividad del músculo orbicular del párpado, similares a los componentes R1 y R2 que se registran estimulando eléctricamente la rama supraorbitaria del trigémino. Los dos componentes R1 y R2 difieren en su latencia (Kugelberg, 1952; Hiraoka y Shimamura, 1977) y en el circuito que los sostiene (Holstege y cols. 1986a, b). Al igual que otros reflejos, la latencia, la amplitud y la velocidad pico de este tipo de parpadeo depende de la intensidad o la duración del estímulo. La modalidad sensorial también influye en el perfil de la respuesta refleja. Las respuestas reflejas a los tonos (sonidos puros) son muy variables, y con cierta frecuencia no se provocan. Cuando

sí se producen, consisten en movimientos de pequeña amplitud (1-4 grados), de larga latencia (≈ 50 ms) y con una rápida habituación a la presentación repetida del mismo sonido en gatos (Gruart, 2000).

d) Parpadeos acompañando a los movimientos oculares. Los párpados siguen continuamente los movimientos del ojo, evitando que se cubra la pupila durante los movimientos sacádicos verticales y durante los reflejos optocinético y vestibuloocular (Evinger y cols. 1991).

e) Respuestas palpebrales condicionadas. Se trata de respuestas del párpado adquiridas a través de un proceso de condicionamiento clásico. Están provocadas por estímulos condicionados, y su naturaleza es distinta a la respuesta refleja producida por un estímulo incondicionado, y al resto de movimientos descritos anteriormente. Cuando se analiza el perfil de estas respuestas, también se observan diferencias según la naturaleza del estímulo condicionado (sonido, luz) (Gruart y cols., 2000c). Si se utiliza un tono, la latencia de la respuesta palpebral es de unos 50 ms (Gruart y cols. 1995). También la velocidad y la amplitud de la respuesta varían según el estímulo.

El análisis de la formación de la respuesta de cierre del párpado permite concluir que esta respuesta no es un movimiento liso, sino que es un movimiento oscilante con una frecuencia predominante, formado por distintos componentes de duración determinada (Gruart y cols. 1995).

Se ha propuesto una teoría cuántica del movimiento que señala que el mecanismo para formar una respuesta palpebral condicionada consiste en sumar “cuantos de movimiento”; es decir, añadir ondas de duración fija (Domingo y cols. 1997). Mediante este análisis de la frecuencia dominante en respuestas condicionadas también se ha comprobado que el mayor poder espectral se encuentra en las respuestas obtenidas con intervalos entre el estímulo condicionado y el incondicionado en torno a 250 ms. Esta es la explicación fisiológica para justificar este intervalo en los protocolos de condicionamiento, que distintos estudios en el campo de la psicología han encontrado como el de mayor efectividad para provocar estas respuestas en conejos (Smith, 1968).

El sistema motor palpebral es importante como modelo en el estudio de la generación de respuestas motoras y de los mecanismos neuronales que subyacen al aprendizaje; para entender estos mecanismos ha resultado crucial la utilización del condicionamiento de tipo clásico con variantes establecidas por diversos autores (Gormezano y cols., 1983; Thompson, 1986; Woody, 1986).

1.2.1.2. Fundamentos del condicionamiento clásico de reflejo corneal

Las formas más desarrolladas de aprendizaje comprenden la asociación entre dos o más estímulos. Este aprendizaje asociativo engloba varias modalidades, la más simple de las cuales es el condicionamiento clásico. El reflejo palpebral es uno de los modelos más utilizados para el estudio del condicionamiento clásico (Gormezano y cols., 1983; Thompson, 1986; Woody, 1986). La utilización de este modelo es una herramienta muy útil para el estudio de los circuitos neuronales y de los mecanismos esenciales del aprendizaje motor (Gormezano y cols., 1983; Gruart y cols., 1995, 2000a, b; Trigo y cols., 1999; Munera y cols., 2001), dada su relativa sencillez y la facilidad con la que se puede registrar in vivo la actividad neuronal de las estructuras implicadas.

Se puede clasificar también como un tipo de aprendizaje motor, que consiste en la transformación y mejora de la eficacia y precisión de un movimiento por medio de la repetición. Cuando la ejecución del movimiento se realiza con precisión en intentos sucesivos, se puede decir que la tarea motora se ha aprendido y que se ha establecido en el cerebro una memoria para esta tarea motora (Llinás y Welsh, 1993).

El modelo de condicionamiento clásico de reflejo corneal se caracteriza por la presentación emparejada de dos estímulos: un estímulo neutro y un estímulo incondicionado (en inglés, *unconditioned stimulus*, US). En las primeras sesiones de un protocolo convencional de condicionamiento el estímulo neutro se presenta solo, con el fin de provocar un fenómeno de habituación. Este fenómeno consiste en la disminución progresiva de la respuesta que se produce por la presentación repetida a un estímulo, en este caso al estímulo neutro. Se utiliza para minimizar la respuesta producida por el estímulo que, aún siendo neutro, produce una pequeña reacción en el animal.

En las siguientes sesiones se presentan, tanto el estímulo neutro, como el incondicionado, en este orden temporal. La presentación del segundo estímulo origina una respuesta refleja llamada respuesta incondicionada, que en este modelo consiste en el cierre del párpado. La presentación repetida de los dos estímulos, con un intervalo fijo y determinado, favorece la aparición de otro tipo de respuesta, denominada respuesta condicionada (en inglés, *conditioned response*, CR) que se genera cuando el animal aprende a asociar el estímulo neutro y el incondicionado. De esta forma, el estímulo neutro pasará a denominarse estímulo condicionado (en inglés, *conditioned stimulus*, CS), ya que su efecto está condicionado a la aparición del US. El organismo aprende a anticipar su respuesta a la llegada del estímulo incondicionado, de manera que el CS actúa como desencadenante de la respuesta condicionada ante la llegada del US.

Una vez que el animal ha aprendido la tarea anterior, si se aplica el CS de forma aislada y repetidamente, el animal aprende a disociar los dos estímulos, disminuyendo la probabilidad y amplitud de la respuesta previamente aprendida. A este fenómeno se le denomina extinción (Kandel y cols., 2000).

Como US, normalmente se suele aplicar un soplo de aire en la córnea (Gruart y cols., 2000a) o un shock eléctrico en la rama supraorbitaria del nervio trigémino (Domínguez-del-Toro y cols., 2004). Como CS se suele utilizar un tono (López-Ramos y cols., 2007) o un soplo de baja intensidad (Munera y cols., 2001).

Uno de los requisitos que debe cumplir el condicionamiento clásico es que los estímulos deben guardar una relación de contingencia, debiendo sobresalir entre todos los estímulos que pueda recibir el animal para que pueda asociarlos (Rescorla, 1988). Un pseudocondicionamiento es aquel en el que se administran los estímulos aleatoriamente, sin guardar una relación temporal ni cumplir el requisito de contingencia. Debido a que no produce aprendizaje, el pseudocondicionamiento se utiliza como demostración de que la presentación de CS y US, de la forma anteriormente descrita para la correcta ejecución del paradigma, son los responsables del aprendizaje.

Existen una serie de factores que pueden afectar al desarrollo del condicionamiento clásico y a la generación de la respuesta condicionada y sus

características, como son el intervalo interestímulo, el intervalo entre presentaciones, y la intensidad y duración de los estímulos condicionado e incondicionado.

El intervalo interestímulo, delimitado entre el CS y el US, es importante porque define la contigüidad de los estímulos. Conforme este intervalo se alarga, se debilita la relación de contigüidad entre ellos. Si el intervalo difiere de 250 ms lo suficiente, el grado de asociación de los estímulos disminuye y puede que no se produzca aprendizaje (Smith, 1968).

Los intervalos de tiempo cortos entre cada una de las presentaciones del par de estímulos parecen producir un menor porcentaje de respuestas condicionadas (Spence y Norris, 1950). En cambio, aquellos intervalos que oscilan entre 20-35 s provocan mayor efectividad en la prueba (Prokasy y Whaley, 1961).

Hasta cierto límite, parece ser que la fuerza de la respuesta condicionada aumenta con la intensidad del estímulo incondicionado. El condicionamiento del reflejo corneal en conejos es mayor al aumentar la intensidad del soplo de aire en la córnea (Smith, 1968). Sin embargo, se ha demostrado que el incremento en la duración del US no tiene el mismo efecto que el de su intensidad. El efecto de la duración sobre la respuesta condicionada varía en función del tipo de condicionamiento (Tarpy, 1993). También la intensidad del CS puede aumentar el porcentaje de respuestas condicionadas generadas (Gormezano, 1972). Sin embargo, otros investigadores no han hallado el mismo efecto (Grant y Schneider, 1948).

Atendiendo al momento y duración de la presentación de los estímulos condicionados e incondicionados, se pueden definir distintos paradigmas de condicionamiento:

- En el paradigma de traza, el estímulo condicionado acaba antes de que comience el estímulo incondicionado. Para este tipo de condicionamiento algunos autores opinan que es necesaria la participación del hipocampo, como estructura que conserva la traza del CS hasta que se produce la entrada sensorial del US en el cerebro (Kim y cols., 1995; Clark y Squire, 1998). No

obstante, otros autores piensan que no es relevante (Rescorla, 1988; Munera y cols., 2001).

- En el paradigma de demora, el CS se presenta antes en el tiempo que el US, y desaparecen al mismo tiempo. Suele presentar un alto grado de asociación de estímulos, esto es, un mayor porcentaje de respuestas condicionadas. Tradicionalmente se acepta al cerebelo como estructura esencial para este tipo de aprendizaje (Thompson y Krupa, 1994). Otros autores, sin embargo, lo describen como un órgano reforzador (Gruart y cols., 2000a) de la orden motora procedente de otras estructuras cerebrales, entre ellas corteza motora y premotora (Aou y cols., 1992; Gruart y cols., 2000b).

1.2.1.3. Fundamentos electrofisiológicos y anatómicos de la respuesta condicionada

Son numerosas las técnicas de lesión y de estimulación (Thompson y Krupa, 1994), farmacológicas (Chapman y cols. 1990) y de registro electrofisiológico (Gruart y cols. 1995, 1997, 2000, 2006; Pacheco-Calderon y cols., 2012), que se han practicado para conocer cómo se elabora en el sistema nervioso la respuesta palpebral condicionada.

Antes de discutir sobre la generación de esta respuesta, es necesario describir otros componentes que aparecen en el registro electromiográfico cuando se aplica un protocolo de condicionamiento clásico de reflejo corneal. En la franja de registro que comprende el estímulo condicionado y el incondicionado pueden distinguirse varios componentes con actividad de diferente naturaleza, aparte de la respuesta condicionada típica. Son las denominadas en la literatura respuestas de latencia corta.

La respuesta de sobresalto es una de ellas, y consiste en un movimiento violento de los músculos faciales y esqueléticos provocados por un estímulo de tipo táctil, visual o auditivo. Utilizando en ratones un tono, no necesariamente de gran intensidad, se provoca este tipo de respuesta durante el condicionamiento. La respuesta tiene como características una latencia de 15 ms desde el comienzo del tono, y una latencia en pico

máximo de unos 25 ms (Boele y cols., 2010). En esta respuesta participan, tanto el reflejo del cierre del párpado, como la contracción de otros músculos.

En ratones, esta respuesta se puede separar en dos componentes, los picos de sobresalto α y β . El primero tiene una cinemática que se corresponde con la arriba citada; en cambio, el segundo posee una respuesta electromiográfica más compleja, con una latencia mucho más larga y una amplitud mayor. Se asume que el pico α en ratones se origina por un circuito trisináptico en el que participa el núcleo coclear (en inglés, *cochlear nucleus*, CN), el núcleo facial (en inglés, *facial nucleus*, FN) y el núcleo pontino caudal (en inglés, *caudal pontine nucleus*, PnC). El pico β , en cambio, se genera por un circuito más complejo, en el que el núcleo pontino (en inglés, *pontine nuclei*, PN) y coclear también participan.

El intervalo de tiempo entre la generación de la respuesta de sobresalto y la verdadera respuesta condicionada puede ser muy corto. En el condicionamiento clásico de reflejo palpebral, esto puede suponer un problema para la discriminación de tales respuestas; no tanto para el componente α , que disminuye conforme transcurren las sesiones, sino para el componente β , que se manifiesta unos milisegundos más tarde, y puede solaparse en muchas ocasiones con la respuesta condicionada. Un tono con una frecuencia más alta a la usualmente empleada en estos paradigmas, del orden de 5 a 10 kHz, puede ser óptimo para su uso como estímulo condicionado, ya que produce una mínima respuesta de sobresalto, facilitando la diferenciación de la respuesta aprendida (Boele y cols., 2010).

Una respuesta de origen amigdalino también ha sido aislada. Alrededor del 70% de las neuronas de la amígdala lateral reciben proyecciones relacionadas con estructuras que se activan durante los estímulos condicionado e incondicionado y, de ellas, un pequeño porcentaje aumenta su respuesta al estímulo condicionado, tras la presentación de ambos (Boele y cols., 2010).

La magnitud y duración de estas respuestas de latencia corta en ratones puede alterar el recuento del porcentaje de respuestas condicionadas. La relativa contribución de la amígdala en el proceso difiere entre distintos animales. Mientras su importancia parece ser mínima en conejos, en ratas es fundamental. En ratones, el papel de la

amígdala durante el condicionamiento clásico del reflejo corneal aún no ha sido descrito. La amígdala posee una posición privilegiada para modular la respuesta al estímulo condicionado que genera el cerebelo, ya que sus proyecciones son directas al puente y las fibras musgosas. Como ocurre en ratas, la amígdala podría ser importante para aumentar la eficacia del tono en la generación de las respuestas. El cerebelo también podría participar en la generación de estas respuestas que se registran junto a la respuesta condicionada.

El modelo propuesto por Boele y sus colaboradores en 2010 afirma que la amígdala participa en las respuestas de latencia corta, fundamentalmente al principio de las sesiones de condicionamiento, mientras que el cerebelo está involucrado en las sesiones posteriores. Tanto la amígdala como el cerebelo pueden contribuir de forma asociada en la generación de estas respuestas si las entradas sensoriales del estímulo condicionado e incondicionado convergen en las mismas neuronas y dichas neuronas participan en el control motor de las respuestas. Para que esto ocurra debe manifestarse plasticidad neuronal, entendida ésta como un proceso dinámico de modificación de las conexiones sinápticas y mecanismos bioquímicos en respuesta a un estímulo.

Este modelo se denomina Condicionamiento Dinámico Amígdala-Cerebelo, y describe cómo la entrada sensorial del tono y la entrada somatosensorial al estímulo incondicionado convergen en la amígdala lateral (en inglés, *lateral amygdala*, LA) (fig. 1.2.). Mientras el núcleo coclear releva el estímulo del tono al cuerpo geniculado medial del tálamo (en inglés, *medial geniculate body of the thalamus*, MGB) y a partir de ahí a la amígdala lateral, el núcleo del trigémino (en inglés, *trigeminal nucleus*, TrN) capta la señal del estímulo incondicionado y, a través del núcleo intralaminar lateral del tálamo (en inglés, *lateral intralaminar nucleus of the thalamus*, LIN), manda la información a la amígdala lateral (Boele y cols., 2010).

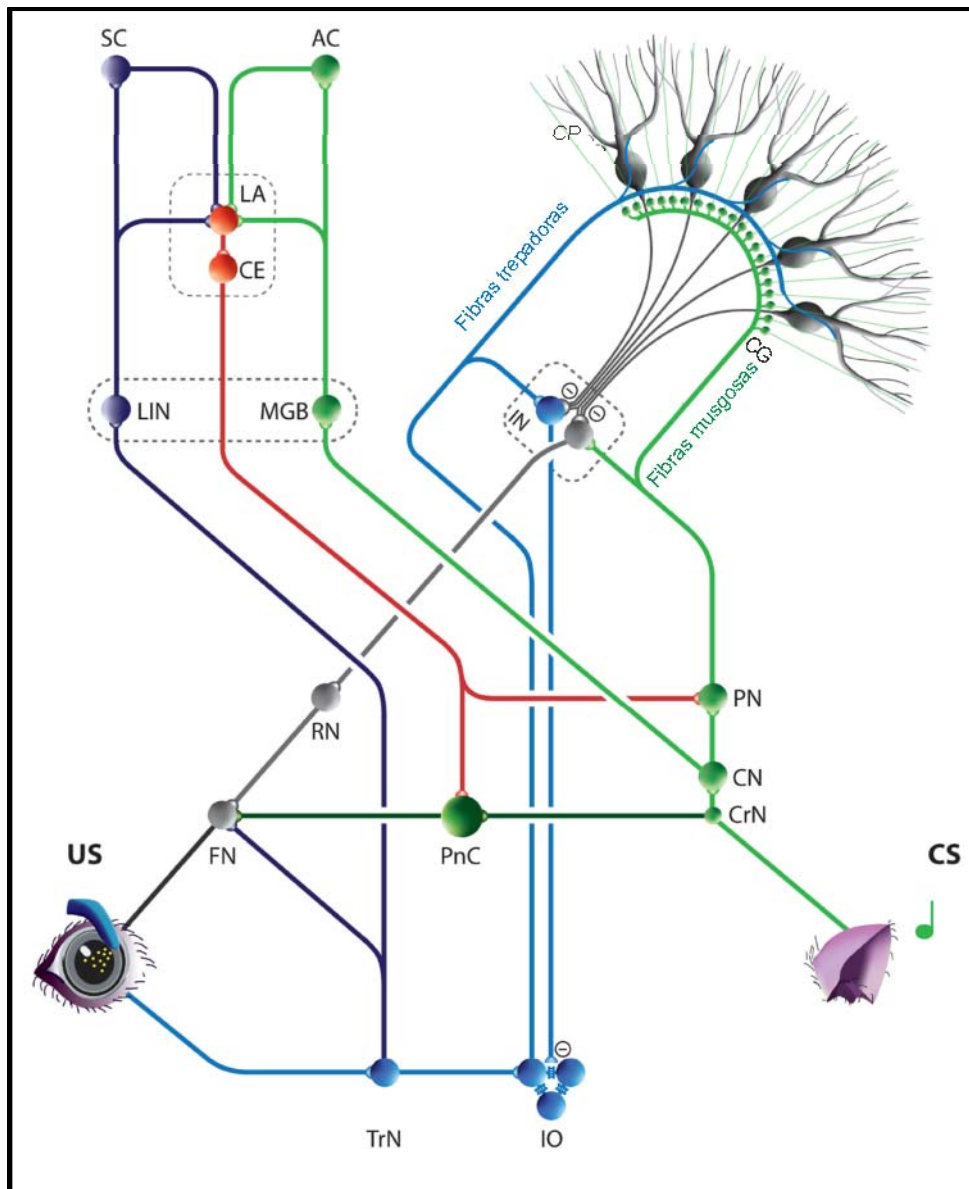


Figura 1.2. Modelo integrador de participación de la amígdala y el cerebelo en el condicionamiento clásico de tipo palpebral en ratón. Tanto en la vía del cerebelo, como en la de la amígdala, parece confluir la información proveniente de los estímulos condicionado e incondicionado. Mientras que a la amígdala se le asocia con la generación de respuestas de latencia corta, al cerebelo se le ha asignado un papel central en la generación de la respuesta condicionada o aprendida. Abreviaturas: AC, corteza auditiva; CE, amígdala central; CG, células granulares; CP, células de Purkinje; CN, núcleo coclear; CrN, raíz del núcleo coclear; FN, núcleo facial; IN, núcleo interpósito; IO, oliva inferior; LA, amígdala lateral; LIN, núcleo intralaminar lateral del tálamo; MGB, cuerpo geniculado medial del tálamo; PN, núcleo pontino; PnC, núcleo pontino caudal; RN, núcleo rojo; SC, corteza somatosensorial; TrN, núcleo del trigémino. Traducido de Boele y cols., 2010.

En cuanto a la generación de la auténtica respuesta condicionada o aprendida en el condicionamiento clásico de reflejo corneal, hay un gran debate respecto a la estructura (o estructuras) que la originan. El modelo que ha tenido mayor aceptación en

el pasado (Thompson, 1986), ha experimentado algunas modificaciones en posteriores revisiones (Delgado-García y cols., 1998).

Según éste, cuando se presenta un tono como CS, se activan las neuronas de la raíz del núcleo coclear (en inglés, *cochlear root nucleus*, CN) y, de este núcleo, la información viaja hasta el núcleo caudado pontino (Koch y Schnitzler, 1997). La entrada al cerebelo se produce a través de colaterales que viajan a la corteza cerebelosa, pasando por el núcleo pontino. Dichas colaterales son las fibras musgosas, que acaban en el núcleo interpósito (en inglés, *interposed nuclei*, IN), por medio de las células granulares (CG). El US activa el núcleo del trigémino, bien a través de un estímulo mecánico (estimulando las neuronas que inervan la córnea y la piel adyacente), bien a través de la estimulación directa de las fibras del trigémino. Esta información llega hasta la oliva inferior (en inglés, *inferior olive*, IO) cruzando la línea media y, de ahí, cruzando de nuevo la línea media, llega a la corteza del cerebelo y al núcleo interpósito, éste último a través de las fibras trepadoras (Gruart, 2000). Se considera que es en este núcleo cerebeloso (*fig. 1.2.*) donde se elabora la respuesta palpebral condicionada, por la confluencia de los estímulos condicionado e incondicionado (Thompson, 1986). Otros autores aplican esta máxima, no al núcleo del interpósito, sino a la corteza del cerebelo (Yeo y cols., 1985). Sea como fuere, la respuesta elaborada en el cerebelo cruzaría la línea media para llegar al núcleo rojo (en inglés, *red nucleus*, RN), y de ahí de nuevo pasaría por la línea media para llegar a los núcleos motores y promotores del tronco encefálico, que ejecutan la respuesta condicionada (Chapman y cols., 1988; Pacheco-Calderon y cols., 2012). Sin embargo, las neuronas del núcleo interpósito comienzan a disparar milisegundos más tarde de que la respuesta condicionada se inicie (Delgado-García y Gruart, 2002).

Otros estudios, no obstante, argumentan que este tipo de respuesta aprendida se elabora de forma distribuida y son muchas más las regiones que participan en ella (Gruart y cols., 2000b; Lee y Kim, 2004), incluyendo la corteza y la amígdala (Boele y cols., 2010). La primera parece ser importante en el grado de atención necesario para el aprendizaje, y es uno de los lugares propuestos de almacenaje de la memoria a largo plazo (Thompson y Krupa, 1994).

1.2.2. Memoria explícita

1.2.2.1. Aprendizaje y memoria en condicionamiento operante en caja de Skinner

El condicionamiento instrumental u operante es un tipo de aprendizaje asociativo en el que una respuesta se fortalece, se debilita, o se hace más frecuente según sea su consecuencia, positiva o negativa (Thorndike 1911; Skinner 1938). Las respuestas en el condicionamiento operante constituyen un importante componente en el comportamiento voluntario de los animales. Estas respuestas se caracterizan por tener un impacto en el ambiente; como en el medio natural el ambiente puede ser muy volátil, una misma acción puede desencadenar diferentes consecuencias. Para obtener la más pertinente, es crucial que el animal detecte las relaciones entre las acciones y las distintas consecuencias que provoca. De esta forma, puede adaptar el comportamiento de acuerdo a ello. Éste es el fundamento de la respuesta operante. Cuando esta respuesta provoca la aparición del estímulo, se dice que aparece una contingencia positiva entre la respuesta y el estímulo desencadenado.

El hipocampo tiene un papel fundamental en la detección de la relación causal entre la acción y el estímulo desencadenado. La lesión de éste no afecta a la adquisición de la respuesta operante (Corbit y Balleine, 2000). En cambio, las respuestas que no son consecuentes con una acción se relacionan con su contexto, y si se lesiona esta región, los animales muestran dificultades para realizar tal asociación entre el contexto y la consecuencia (Jarrard, 1995). Las lesiones en el hipocampo también provocan un aumento de la impulsividad, que se traduce en un aumento de las presiones sobre la palanca. Es por ello que el hipocampo se relaciona con la conducta motivada (Jarrard, 1973); su estimulación eléctrica favorece el aumento en la ingesta de comida (Tracy y cols., 2001).

Algunas zonas de la corteza prefrontal y de los ganglios basales están implicadas en el procesamiento de la relación entre una acción y su consecuencia. Las neuronas de la corteza prefrontal medial (en inglés, *medial prefrontal cortex*, mPFC) en primates cambian la tasa de disparo dependiendo de la acción y el tipo de consecuencia

(Matsumoto y cols., 2003). La actividad de las neuronas del estriado correlaciona con los cambios en la contingencia entre una acción y su consecuencia, y su actividad predice las acciones escogidas por el animal, antes, durante o después de la ejecución del movimiento (Samejima y cols. 2005; Lau y Glimcher 2008).

Varios trabajos también realizados en primates, en corteza prefrontal lateral (en inglés, *lateral prefrontal cortex*, LPFC) sugieren que ésta participa en el condicionamiento operante a un nivel mayor que el mero control de las respuestas motoras. Aunque se sabe que las neuronas de la corteza prefrontal cambian su actividad dependiendo de la recompensa esperada, poco se sabe si esta actividad es necesaria para la consecución de tal refuerzo (Kobayashi y cols., 2010). La actividad monosináptica en esta corteza refleja cambios de acuerdo a requerimientos específicos para la obtención de la recompensa, sin que los animales reproduzcan una respuesta motora (Rainer y cols., 1998; Asaad y cols. 2000; Kobayashi y cols., 2006, 2010). Pacientes con lesiones en el PFC pierden la autonomía o control intencional de sus respuestas en tareas de comportamiento, automatizando las respuestas en función a las instrucciones dadas (Lhermitte 1986). Estos y otros estudios apoyan la visión de que la LPFC guía al comportamiento en función de unas metas propuestas (Fuster 2000; Miller y Cohen 2001; Kobayashi y cols., 2010).

1.2.2.2. Memoria de reconocimiento

La memoria de reconocimiento es el tipo de memoria requerida para la realización de la prueba de reconocimiento de objetos, y es uno de los ejemplos de memoria declarativa más estudiados. El procesamiento visual y el almacenaje de la información necesarios en este tipo de pruebas han sido abordados desde varias perspectivas. Sin embargo, un modelo animal accesible, como es el de los roedores, ha pasado por alto en la mayoría de estudios sobre el procesamiento visual avanzado, por considerar que sus cerebros carecían de tal tipo de procesamiento. Como resultado, poco es conocido sobre la capacidad de ratones y ratas de procesar complejos procesos visuales (Zoccolan y cols., 2009).

Tradicionalmente, el procesamiento y almacenaje necesarios para ejecutar este tipo de tareas, al igual que otras funciones cognitivas, quedan relegados a determinadas estructuras delimitadas en el cerebro. De esta forma, numerosos investigadores describen que la memoria de reconocimiento puede dividirse en distintos componentes para su procesamiento, todos ellos ubicados en el lóbulo temporal medial y, dentro de éste, en concreto, en el hipocampo y áreas próximas: cortezas entorrinal, perirrinal y parahipocampal (Squire y cols., 2004, 2007; López-Aranda y cols, 2009). Una lesión en la corteza entorrinal empeora la memoria de reconocimiento de objetos en humanos, monos y roedores, en tareas que implican la comparación visual de dos objetos, y se ha descrito que participa en la codificación y la recuperación de la información en este tipo de tareas (Winters y Bussey, 2005).

En un fenómeno conocido como supresión repetitiva, una experiencia repetida con un mismo objeto visual permite la supresión de la respuesta neuronal en poblaciones de la corteza temporal inferior. Por el contrario, otras neuronas responden con más agudeza cuando los monos visualizan objetos que tienen alguna relevancia tras un proceso de aprendizaje; este mecanismo se desencadena en un circuito entre la corteza temporal y la corteza prefrontal (Desimone, 1996).

Es por tanto aceptado que el aprendizaje perceptual también se puede localizar fuera del lóbulo temporal medial. Algunos autores asignan a la corteza visual secundaria un papel importante en la memoria visual (Bussey y Saksida, 2007). En el cerebro de mono, esta corteza visual recibe gran cantidad de proyecciones desde la corteza visual primaria, y envía igual número de proyecciones a otras regiones visuales secundarias, esto es, V3, V4 y V5 (Gattas y cols., 1997). La mayoría de las neuronas de la corteza visual secundaria son activadas ante estímulos específicos, como orientación, tamaño, color y forma (Hegde y Van Essen, 2000). Estudios anatómicos implican a la capa 3 de esta corteza en el procesamiento de la información visual. En contraste con la 3, la capa 6 de la corteza visual secundaria está compuesta por numerosos tipos de neuronas, y su respuesta a los estímulos visuales es más compleja. Recientemente se ha descrito que esta capa es crucial para el procesamiento de la memoria de reconocimiento. La expresión de un tipo de proteína reguladora (RGS-14) en la capa 6 de la corteza visual V2, promueve la conversión de la memoria de corto plazo a memoria a largo plazo. Así

mismo, la eliminación selectiva de las neuronas de esta capa mediante toxinas, impide la formación de la memoria de reconocimiento (López-Aranda y cols., 2009).

La hipoxia hipobárica altera también la amplitud de los potenciales excitatorios postsinápticos (PEPS) visuales (Foster y cols., 1975). Se han observado alteraciones de la agudeza visual (MacFarland 1972; Davis y cols., 1995) y en el reconocimiento de colores (Kobrick, 1970). Muchas de las disfunciones citadas han sido descritas en altitudes relativamente bajas, y suelen mostrar una rápida reversabilidad tras el descenso o el restablecimiento de los niveles normales de presión (Halperin y cols., 1959).

1.2.2.3. Memoria espacial

La memoria espacial es el tipo de memoria responsable de almacenar información sobre la localización y orientación de un determinado lugar. Se puede clasificar como memoria de corto y largo plazo. Se forma tras el procesamiento de toda la información que el sujeto dispone sobre su visión y propio-recepción. Las dos pruebas más utilizadas para evaluar cambios en el aprendizaje y memoria espacial son:

- Laberinto de brazos radiales (Olton y Samuelson, 1976). Existen múltiples variantes, de las cuales la más conocida es el laberinto de 8 brazos, que se describe más adelante. En condiciones normales, la efectividad de la prueba en roedores es muy alta, registrando éstos porcentajes muy elevados de éxito en relación al número de visitas a brazos que no han sido explorados. En un laberinto de 17 brazos, como promedio el 80% de las 17 primeras visitas son a brazos que aún no han sido explorados (Olton y cols., 1997). Esta tendencia se observa en el laberinto de 8 brazos, y en el de 16 y 24 brazos (Roberts, 1979). Parece establecerse un límite en la capacidad de desarrollo de la prueba por parte de las ratas a partir de 24 – 32 brazos (Cole y Chappell-Stephenson, 2003). En ratones, las diferencias en la capacidad de aprendizaje vienen marcadas por el tipo de linaje utilizado; las diferencias parecen correlacionar con el tamaño de las fibras musgosas del hipocampo (Crusio y

Schwegler, 2005). Lesiones en la corteza prefrontal medial perjudican la realización de la tarea del laberinto (Becker y cols., 1980), mientras que la región retrosplenial de la corteza cingulada es necesaria para la ejecución de ésta cuando se eliminan las claves o pistas colocadas en ciertos brazos (Vann y cols., 2003).

- Laberinto de Morris (Morris, 1981). Este tipo de prueba tiene rasgos específicos que la diferencian de otras de evaluación del aprendizaje espacial; los individuos que la ejecutan no tienen la posibilidad de dejar rastros que faciliten la búsqueda, y necesariamente deben ejecutar la prueba ante las características del medio donde se encuentran. Además, esta prueba está especialmente indicada para ratas, animales considerados como buenos nadadores, todo lo contrario que los ratones, a los que puede inducirles un gran cuadro de estrés. Ratas tratadas con bloqueadores del receptor NMDA realizan la tarea de forma ineficaz, sugiriendo un papel importante del receptor en este tipo de aprendizaje (Davis y cols., 2002). Lesiones en la corteza perirrinal produce déficits en la memoria de trabajo y de referencia, e incrementa la tasa de errores durante el entrenamiento en esta tarea (Liu y Bilkey, 1998).

El aprendizaje espacial y la memoria dependen del estado funcional de varias regiones cerebrales, especialmente del hipocampo y, en los mamíferos, en concreto, del área CA1 (Gilbert and Brushfield, 2009; Sharma y cols., 2010). Las cortezas parietal (Colby y Goldberg, 1999) y prefrontal medial (Lee y Kesner, 2003) codifican información cuando el marco de referencia es el sujeto (espacios egocéntricos), mientras el hipocampo almacena (Ramos, 2000) y procesa (Liu y Bilkey, 2001) información espacial de lugares en el que éste no es la referencia (espacios allocéntricos).

El hipocampo también es importante para el almacenaje de este tipo de espacios en la memoria espacial a largo plazo (Winocur y cols., 2005). El bloqueo farmacológico de proteínas de señalización en hipocampo y corteza entorrinal revela, en individuos tratados, problemas para dirigirse a puntos concretos, y perjudica la capacidad para recordar localizaciones precisas (Hebert y Dash, 2004). Solo la lesión dorsal del

hipocampo afecta a la recuperación, al procesamiento de la memoria a corto plazo, y a la conversión de ésta a largo plazo (Moser y Moser, 1998; Lee y Kesner, 2003), mientras que la lesión ventral no provoca déficits en la memoria espacial (Bannerman y cols., 2002). Diferencias entre hemisferios también han sido halladas (Maguire y cols., 1997). Por otro lado, la sinapsis CA1-corteza entorrinal está involucrada en la memoria de reconocimiento de lugares (Brun y cols., 2002), mientras que las sinapsis corteza entorrinal-giro dentado-CA3-CA1 se asocia con el recuerdo y memoria de esos lugares (Goodrich-Hunsaker y cols., 2008).

El aprendizaje espacial requiere de los receptores NMDA y AMPA; el proceso de consolidación de la memoria requiere del primero, mientras que la recuperación de esta memoria necesita del segundo (Liang y cols., 2004). La función de los receptores NMDA depende del lugar concreto del hipocampo donde están presentes; así, en el área CA3 son necesarios para la reorganización de la información espacial, mientras que en el área CA1 se relacionan con la adquisición de la información que necesita ser recuperada tras un periodo de tiempo que excede el corto plazo (Lee y Kesner, 2002).

Existe en el cerebro un mapa del espacio organizado topográficamente, a través de un tipo de neuronas denominadas células en red (del inglés *grid cells*), halladas en la porción dorsocaudal medial de la corteza entorrinal (Hafting y cols., 2005; Fyhn y cols., 2008). Esta región transforma la información espacial recogida del ambiente y la almacena en estas neuronas como representación alocéntrica del ambiente (Fyhn y cols., 2004). También participa en la codificación de propiedades geométricas del espacio; su lesión perjudica el uso de pistas o claves lejanas que ayuden a orientarse sobre el espacio (Parron y cols., 2004). La región retrosplenial del hemisferio izquierdo también está involucrada en el procesamiento de estas propiedades geométricas (Maguire, 2001; Parron y Save, 2004) y de la memoria para espacios alocéntricos (Vann y Aggleton, 2002).

La corteza prefrontal medial participa en la codificación de la memoria espacial a corto plazo cuando existe algún tipo de recompensa en la prueba (Pratt y Mizumori, 2001). Es por ello que es necesaria para el desarrollo de pruebas con restricción alimentaria inducida, como es el caso del laberinto de 8 brazos. También está implicada

en la organización temporal de la tarea (Kesner y Holbrook, 1987). El hemisferio izquierdo de esta región analiza las referencias espaciales y sus relaciones con un evento acaecido en el lugar, mientras el hemisferio derecho se encarga de procesar las características de lugares concretos (Slotnick y Moo, 2006).

1.3. SINAPSIS TALÁMICO-CORTICALES

1.3.1. Corteza prefrontal medial. Proyecciones

La región prefrontal es la zona más anterior de los lóbulos frontales, ubicada en la porción inmediatamente por delante de la corteza motora y premotora, y ocupa la parte más grande de la corteza frontal. Esta región está relacionada con la memoria de trabajo y con acciones que se ejecutan cuando se necesita del procesamiento de información variable, incluyendo las intenciones del individuo (Miller y Cohen, 2001). Es una región de naturaleza dopaminérgica predominantemente (Sawaguchi y Goldman-Rakic, 1991). Su estimulación eléctrica, además, no genera movimientos en el individuo. Se ha hallado que la corteza prefrontal contiene diferentes tipos de neuronas que se encargan, durante la realización de una tarea, de registrar el estímulo sensorial, de mantenerlo en línea, y de liberar la respuesta motora, siguiendo una secuencia temporal.

La corteza prefrontal varía en morfología y complejidad en las distintas especies en función del desarrollo filogenético, distinguiéndose las áreas ventral, lateral y medial, en roedores. Esta última, la corteza prefrontal medial, comprende las porciones cingulada anterior (área medial), prelímbica, e infralímbica (área más ventral), entre otras.

Entre sus conexiones destaca la del núcleo mediodorsal del tálamo (Groenewegen y cols., 1988). Existen conexiones locales entre las diferentes áreas de la corteza prefrontal, y se cree que es en ellas donde se procesan comportamientos complejos (Miller y Cohen, 2001). Las proyecciones de esta corteza varían en función de

las zonas en las que se divide. De esta forma, la corteza infralímbica en ratas recibe aferencias del resto de la corteza prefrontal, corteza entorrinal, área CA1 del hipocampo y subículum, prosencéfalo basal (entre ellos el septum medial y los núcleos de la banda diagonal de Broca), distintos núcleos del tálamo (paratenial, paraventricular, anteriomedial, inter-antero-dorsal, centralmedial, y reuniens), zonas de la amígdala, hipotálamo, tronco cerebral y médula (Hoover y Vertes, 2007). Por su parte, envía fibras a otras zonas de la corteza, amígdala, algunas regiones del prosencéfalo basal, estriado, núcleos del tálamo (paratenial, paraventricular, mediodorsal, inter-mediodorsal, inter-antero-dorsal, centralmedial y reuniens), hipotálamo y numerosas zonas del tronco cerebral, entre ellas el núcleo del tracto solitario (Vertes, 2004). Estas proyecciones están relacionadas con el control autónomo del organismo.

Las siguientes proyecciones en ratas alcanzan a la corteza prelímbica: otras regiones de la corteza (otras partes de la corteza prelímbica, corteza infralímbica, corteza cingulada anterior, corteza orbital medial y ventral y corteza insular granular), corteza perirrinal, corteza entorrinal, área CA1 del hipocampo, subículum, diversos núcleos del tálamo (paratenial, paraventricular, mediodorsal, centromedial, romboidal y reuniens), distintas partes del prosencéfalo basal, de la amígdala, del hipotálamo, del tronco cerebral, y la médula (Hoover y Vertes, 2007). Los principales eferentes de la corteza prelímbica son: otras zonas de la corteza prefrontal, corteza entorrinal, núcleos de la vía olfatoria, estriado, núcleos del tálamo (paratenial, paraventricular, anteriomedial, inter-antero-dorsal, centralmedial, y reuniens), amígdala, algunas regiones del prosencéfalo basal, hipotálamo, y numerosas zonas del tronco cerebral (Vertes, 2004). Estas proyecciones que parten de la corteza prelímbica se relacionan con el procesamiento cognitivo y motivacional.

La corteza cingulada recibe aferencias procedentes del tálamo y del resto de la corteza cerebral, y envía eferentes a la corteza entorrinal a través del giro cingulado. A su vez, la corteza cingulada anterior recibe aferencias de los núcleos talámicos intralaminar y medial. Los núcleos ventrales anterior y lateral del tálamo envían proyecciones al surco cingulado (McFarland y Haber, 2000). Por su parte, la corteza cingulada anterior envía proyecciones al núcleo anterior y, a través del giro cingulado, a áreas límbicas. El giro cingulado rostral envía eferentes al giro temporal superior rostral,

corteza orbitofrontal medial y corteza prefrontal lateral. La parte ventral de esta corteza envía proyecciones a la corteza insular anterior, a la corteza premotora, al área perirrinal, a la corteza orbitofrontal, el núcleo laterobasal de la amígdala y a la parte rostral del lóbulo parietal inferior (Pandya y cols., 1981). Tradicionalmente, la corteza cingulada ha estado relacionada con el control de la expresión emocional.

La corteza prefrontal medial (corteza infralímbica y prelímbica) participa en los procesamientos de información de alto grado, dentro de los cuales se incluyen: la atención selectiva, la memoria de trabajo, la toma de decisiones y la elaboración de comportamientos dirigidos hacia un objetivo.

1.3.2. Núcleo mediodorsal del tálamo. Proyecciones

El núcleo mediodorsal del tálamo contiene células fusiformes y poligonales de tamaño medio. Se encuentran organizadas medialmente y, en general, en la zona más lateral, las células tienen tendencia a formar agrupamientos. Este núcleo se extiende hacia adelante, alcanzando el borde del núcleo anterodorsal del tálamo. A este nivel, el núcleo mediodorsal puede ser delimitado ventralmente por el vecino núcleo paratenial, en el cual las neuronas aparecen más dispersas y más ligeramente teñidas.

El tálamo, en general, se califica como un filtro de la información sensorial antes de pasar a la corteza cerebral, y es interconector con muchas de las estructuras que componen la corteza. Además, se le asignan numerosas funciones; el núcleo mediodorsal se ha descrito como una estructura que participa en la memoria. Posee inervación dopaminérgica en general, y colinérgica, hacia distintos núcleos que lo componen. Desde el núcleo tegmental laterodorsal se envían proyecciones colinérgicas al núcleo mediodorsal (Satoh y Fibiger, 1986).

El tálamo como unidad estructural recibe y envía proyecciones a la corteza, por lo que se establece un vínculo bidireccional entre ambas regiones. En este sentido, el núcleo mediodorsal del tálamo no es una excepción, y también establece conexiones recíprocas, y entre ellas, en concreto, con la corteza prefrontal. Para determinar la especificidad de las aferencias que reciben las distintas regiones del núcleo mediodorsal del tálamo se recurre generalmente a inyecciones de sustancias que pueden ser

transportadas eficientemente tanto de forma anterógrada como retrógrada (Groenewegen, 1988). Los resultados indican que el núcleo mediodorsal puede ser dividido, en base a su ordenación sináptica y las conexiones que establece con la corteza prefrontal, en 4 segmentos: medial, central, lateral y paralamelar. A parte de esta división, se pueden establecer diferencias en este núcleo entre sus partes rostrocaudal y dorsoventral.

Un variado número de estructuras subcorticales envía proyecciones al núcleo mediodorsal. El núcleo reticular talámico envía eferentes a la parte más rostral y caudal del núcleo mediodorsal, desde sus regiones más rostrales y ventrales, respectivamente. Desde el tronco cerebral (núcleo de rafe, locus coeruleus, formación reticular, entre otras) también se envían proyecciones al núcleo.

El segmento medial recibe aferencias de un amplio número de estructuras del sistema límbico (amígdala, corteza entorrinal lateral, los núcleos de la banda diagonal de Broca, y el área preóptica lateral, entre otras) y de estructuras pertenecientes a los ganglios basales (pallidum ventral, área tegmental ventral y sustancia nigra). Por otro lado, la parte más rostral de este segmento se conecta de forma recíproca con la corteza prelímbica y cingulada anterior, principalmente. La parte más medial de este segmento, adyacente al núcleo paraventricular, recibe fibras de la corteza infralímbica. Esta zona, incluyendo al núcleo paraventricular, contiene un plexo de fibras dopaminérgicas, y recibe axones del núcleo accumbens, el núcleo del lecho de la estría terminal, el hipotálamo mediodorsal, el subíulum, el núcleo parabraquial y el núcleo del tracto solitario.

El segmento central difiere del medial en cuanto a que recibe con mayor intensidad y especificidad aferencias desde estructuras relacionadas con el sistema olfatorio, tales como las capas profundas de la corteza piriforme. El segmento central también recibe aferencias de los núcleos de la banda diagonal de Broca, el área preóptica lateral y el hipotálamo lateral. Este segmento envía y recibe fibras de la corteza insular agranular y de áreas orbitales laterales. Asimismo, la porción del segmento lateral más caudal del núcleo mediodorsal proyecta a la corteza precentral y cingulada anterior (Groenewegen, 1988).

La literatura que trata sobre los efectos cognitivos o la actividad cerebral asociada a la hipoxia hipobárica en el tálamo es escasa. Existen evidencias, tras un episodio de hipoxia aguda, de síntomas de amnesia severa. Mediante la técnica de tomografía de emisión de positrones (PET), se ha analizado la demanda de glucosa (indicador de la actividad cerebral) en pacientes que han sufrido este efecto tras la exposición a hipoxia. Como era de esperar, estos pacientes muestran bajos valores en el hipocampo y zonas adyacentes, como la formación hipocampal. Tras un exhaustivo análisis de neuroimagen, se ha determinado también la disfuncionalidad del tálamo en estos pacientes; los datos reflejan de forma bilateral unos bajos niveles metabólicos en el tálamo. Las proyecciones entre el tálamo y estructuras del lóbulo temporal medial parecen ser cruciales en este tipo de amnesia (Reed y cols., 1999).

Es posible establecer una base estructural entre el tálamo y la integración de la información visceral o ambiental en el organismo. Proyecciones que parten del núcleo talámico intralaminar extienden colaterales a la división viscerosensorial del núcleo del tracto solitario. Estas conexiones podrían coordinar cambios en las respuestas reflejas autónomas (Otake y cols., 1994) en las que participa el núcleo del tracto solitario, y entre ellas la respiración y otras respuestas de control visceral que se activan como respuesta a la hipoxia hipobárica.

1.4. SISTEMA COLINÉRGICO

1.4.1. Acetilcolina

Los mecanismos a largo plazo que subyacen a las reacciones bajo condiciones de hipoxia no están muy claros aún, aunque probablemente estén involucrados varios factores determinantes. Numerosos estudios sobre los efectos de la hipoxia hipobárica en neurotransmisores del sistema nervioso central han revelado un papel importante de éstos en el proceso (Gibson y cols., 1981). Más concretamente, el peso e importancia que tiene la acetilcolina (ACh) en la literatura específica es cada vez mayor. La ACh es un

neurotransmisor del sistema nervioso central y periférico, formado por la unión de colina y un éster de ácido acético. Se libera en las terminales presinápticas, aunque en determinadas ocasiones también puede ser liberada en otras zonas (Mesulam, 1994), ejerciendo de esta forma un efecto de difusión.

La ACh liberada en los terminales axónicos ejerce sus efectos a través de los receptores nicotínicos y muscarínicos. Éstos últimos predominan en la corteza cerebral de los mamíferos. Hasta ahora, han sido reconocidos 5 subtipos de receptores muscarínicos (m1-m5), producto cada uno de un gen distinto. La mayor cantidad de receptores M1 se alcanzan en las cortezas límbica y asociativa. En contraste, los mayores niveles del receptor M2 se obtienen en la corteza sensorial primaria y en áreas motoras de la corteza (Mesulam, 1994).

La acetilcolina juega un papel relevante en varias funciones en el hipocampo. Se asocia a procesos de aprendizaje y a la neurogénesis en giro dentado (Mohapel y cols., 2005). El neurotransmisor también se encuentra involucrado en aspectos como la retención de la memoria (Becker y cols., 1981) y en la memoria espacial (Kim y Levin, 1996). La liberación del neurotransmisor en neuronas hipocampales media en procesos tales como la habituación o el miedo (Acquas y cols., 1996), un tipo de aprendizaje estudiado en condicionamiento clásico para disminuir la respuesta de sobresalto del estímulo neutro. Aparte de estas funciones, las neuronas colinérgicas endógenas están relacionadas con la inducción de la potenciación a largo plazo (Maeda y cols., 1994; Fujii y cols., 2000).

Durante el envejecimiento, se manifiestan importantes pérdidas en la función colinérgica, causadas por la degeneración dendrítica, axonal y sináptica. Esta degeneración está asociada a la disminución de la expresión génica, alteración de la señalización intracelular, descenso de los niveles tróficos y atrofia asociada al transporte en el citoesqueleto (Schliebs y Arendt, 2011). El efecto más notorio de esta degeneración es la pérdida de memoria (Bigl y cols., 1990; Schliebs y Arendt, 2006). Por otro lado, una lesión en las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal (septum medial y núcleos vertical y horizontal de la banda diagonal de Broca, entre otros) también desencadena déficits en la memoria de trabajo (Easton y cols., 2011). A grandes rasgos,

los efectos que esta degeneración y lesión colinérgica provocan son similares a los efectos que la hipoxia hipobárica conlleva.

1.4.1.1. Distribución

Estudios inmunohistoquímicos y de hibridación *in situ* han detallado la distribución general de la acetilcolina en el sistema nervioso central: septum medial, núcleos vertical y horizontal de la banda diagonal de Broca, núcleo basal de Meynert, núcleo caudado, putamen, núcleo accumbens, núcleo tegmental pedunclopontino, núcleo tegmental laterodorsal, núcleo habenular medial, núcleo parabigeminal, algunos núcleos de nervios craneales y el cuerno anterior de la médula espinal (Oda, 1999).

La acetilcolina juega un papel esencial en la estructura, funcionamiento y mantenimiento de los circuitos corticales (Berger-Sweeney, 2003). Las neuronas colinérgicas proyectan sus axones a varias regiones, constituyendo una extensa y compleja red por todo el sistema nervioso central. Los núcleos basales del prosencéfalo proporcionan las proyecciones colinérgicas más importantes hacia toda la corteza cerebral e hipocampo. Este complejo comprende el septum medial, los núcleos vertical y horizontal de la banda diagonal de Broca y el núcleo basal de Meynert. Otras proyecciones importantes desde el septum medial y el resto del prosencéfalo basal son el complejo de la amígdala, el bulbo olfatorio, y distintos núcleos del tálamo (Mesulam y cols., 1983).

Algunos estudios han revelado la importancia de la vía colinérgica septohipocámpal (Lewis y Shute, 1967). En el hipocampo, la mayor parte de la inervación colinérgica proviene de las zonas más rostrales, es decir, de los somas neuronales del núcleo septal y el núcleo vertical de la banda diagonal de Broca (Mc Kinney y cols., 1983; Rye y cols., 1984), a través de la fimbria y el fornix (Peterson, 1994).

Al medir la densidad de axones inmunoteñidos por anticuerpos contra ChAT en el área CA1, CA3 y giro dentado en el hipocampo de ratones, éstos dan como resultado 13.9, 16.1 y 15.8 m de axones por mm^3 , respectivamente. Al medir la densidad de varicosidades inmunoteñidas en estas mismas regiones, los valores obtenidos son: 5.6,

6.4 y 6.3 millones por mm^3 , respectivamente (Aznavour y cols., 2002), lo cual prueba la importancia de la vía colinérgica en estas zonas. Visto por laminas, los tipos neuronales que presentan mayor inmunoreactividad son el stratum lacunosum molecular en CA3, las células piramidales en CA3 y CA1, y la capa molecular en giro dentado (Aznavour y cols., 2002). Interneuronas colinérgicas también han sido halladas en el hipocampo (Houser y cols. 1983); se estima que entre el 5 y 10% de la actividad colinérgica del hipocampo proviene de estas células (Gage y cols., 1983). En cambio, ante lesiones selectivas en la vía septohipocampal, estas interneuronas son incapaces de compensar la pérdida de actividad colinérgica procedente de esa vía principal (Frotscher, 1988).

Varios estudios, en los cuales se lesiona el septum (Johnson y cols., 2002) o la vía septohipocampal (Cassel y cols., 1997), muestran un posterior déficit en la memoria espacial en los individuos lesionados. En cambio, extensas lesiones en la inervación septohipocampal provocadas por inyecciones de 192 IgG saporina, una inmunotoxina altamente selectiva en la destrucción de neuronas colinérgicas del septum medial, muestran débiles o nulos efectos sobre la memoria (Baxter y Gallagher, 1996; Baxter y cols., 1996; McMahan y cols., 1997), sugiriendo la posible implicación de otras causas en la afección de ésta. Este tipo de lesión tóxica y selectiva reduce los niveles de ACh en septum (hasta un 61%) e hipocampo (superiores al 75%) en ratas. Estos individuos lesionados muestran hiperactividad a las 4 semanas de la lesión, alteración en la atención (o incremento en la motivación), pero no se ven afectados en la adquisición del aprendizaje espacial (Van der Staay y cols., 2006). Existen, por tanto, numerosas evidencias de que el sistema colinérgico septohipocampal no es el único implicado en este tipo de aprendizaje y memoria, o de que, al menos, el grado de lesión debe de ser aún mayor para erradicarlos.

La inervación colinérgica a la corteza cerebral, ampliamente estudiada (Shute y Lewis, 1967), ha sido abordada a través de métodos de localización inmunohistoquímicos, entre otros. Se ha hallado marcaje (a través de anticuerpos específicos contra ChAT) en células bipolares, axones y terminales en todas las áreas corticales; la densidad de terminales inmunoteñidos ha resultado ser especialmente alta en la corteza entorrinal y piriforme (Eckenstein y cols., 1988). Una compleja distribución del marcaje colinérgico se observa al hacer una comparativa entre las distintas capas de

la corteza. En la corteza motora y en la mayoría de las áreas sensoriales, la densidad de terminales es mayor en las capas 1 y 5, mientras que es más baja en la capa 4. En contraste, en corteza visual la capa 4 es la de más intensa inmunotinción. La mayoría de las estructuras colinérgicas en corteza derivan de proyecciones desde el prosencéfalo. De ahí derivan importantes vías que hacen sinapsis con los distintos elementos de la corteza. Una de ellas se origina en el septum y el adyacente núcleo horizontal de la banda diagonal de Broca, y atraviesa el cuerpo calloso y la corteza cingulada hasta llegar al resto de la corteza. Otra vía destacada procede del globo pálido, que a través del núcleo caudado y el cuerpo calloso emerge en la corteza (Eckenstein y cols., 1988).

1.4.2. Colina acetiltransferasa

La colina acetiltransferasa (en inglés, *Choline Acetyltransferase*, ChAT) es la enzima responsable de la biosíntesis de acetilcolina (Nachmansohn y Machado, 1943). Es una proteína globular de cadena sencilla que cataliza la transferencia de un grupo acetil, proveniente de acetil coenzima A (acetil-CoA), a la colina, para formar acetilcolina (*fig. 1.3.*). ChAT es sintetizada en el soma de neuronas colinérgicas, y transportada a los terminales a través de flujos axoplásmicos; allí la enzima presenta dos formas: una soluble y otra asociada a fragmentos de membrana, en entornos ligeramente ácidos (Fonnum, 1966). Junto a ésta se asocia el transportador vesicular para acetilcolina (VACHT), que se encarga del transporte de ACh desde el citoplasma hasta las vesículas sinápticas, con consumo de energía, y que se encuentra estrechamente ligado a la expresión de ChAT (Oda, 1999).

Numerosos experimentos han detallado la distribución general de la enzima ChAT en rata (Sofroniew y cols., 1982; Mesulam y cols., 1983). Utilizando anticuerpos específicos, se ha descrito la distribución en el cerebro de ratones. Las zonas con presencia de la enzima en estos animales son: septum medial, núcleos vertical y horizontal de la banda diagonal de Broca, núcleos basales, regio superior, núcleo oculomotor, núcleo cuneiforme pedunculopontino, núcleo tegmental laterodorsal, núcleo parabigeminal, núcleo habenuar medial, y el núcleo craneal motor (Mufson y Cunningham, 1988). Coinciden las zonas mencionadas con las de expresión del

neurotransmisor ACh, como era de prever. En el estudio de Mufson y Cunningham, además, se halló la presencia de la enzima en los somas de algunas neuronas a lo largo de la corteza cerebral e hipocampo. En ratas también se ha comprobado esta última máxima (Eckenstein y Thoenen, 1983; Levey y cols., 1984; Eckenstein y cols., 1988).

1.4.3. Acetil colinesterasa

La acetil colinesterasa (en inglés, *Acetylcholinesterase*, AChE) es la enzima encargada de hidrolizar a la acetilcolina en la hendidura sináptica durante la sinapsis (*fig. 1.3.*). Descompone la acetilcolina en un grupo acetato y una molécula de colina mediante sucesivas reacciones: el neurotransmisor interacciona con el sitio activo de la enzima, formando el complejo activado, se conforman enlaces covalentes y, finalmente, se produce la hidrólisis y se restituye la actividad enzimática (Rosenberry, 1975; Barnett y Rosenberry, 1977; Rosenberry y cols., 1982). Posee una alta actividad catalítica; puede hidrolizar miles de moléculas de ACh durante un evento.

Esta enzima también se localiza en los glóbulos rojos. Junto con este tejido, en el sistema nervioso presenta otras isoformas. Los subtipos exclusivos del sistema nervioso tienen actividades enzimáticas muy parecidas, pero difieren en su expresión y en el proceso de ensamblaje de sus aminoácidos, presentando distintos péptidos en el extremo C-terminal de su estructura (Meshorer y Soreq, 2006). Aunque los métodos inmunohistoquímicos para hallar la AChE proporcionan datos válidos en lo referido a la distribución de la enzima en las distintas estructuras colinérgicas, estos procedimientos pueden marcar componentes distintos de la enzima, o subtipos generados en estados patológicos o de estrés, como en el caso de la enzima con un *splicing* alternativo, *R* (Massoulié, 2002). Se puede decir, de esta manera, que los anticuerpos contra AChE poseen menor especificidad como marcadores colinérgicos (Levey y cols., 1984).

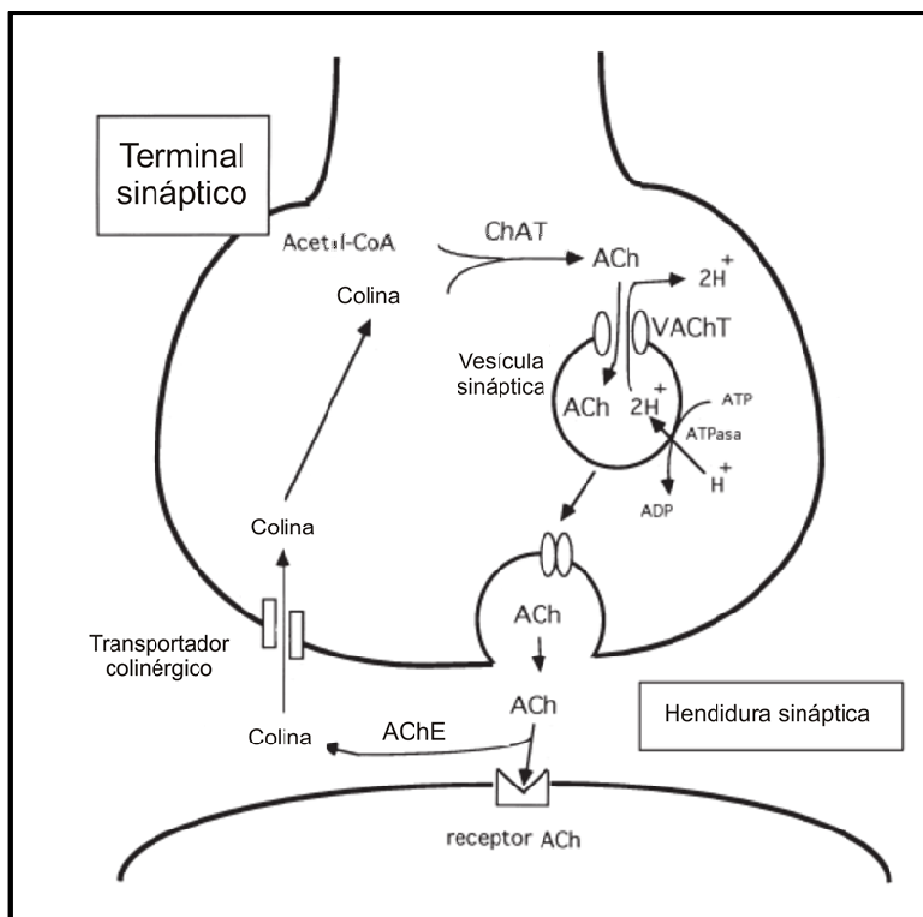


Figura 1.3. Mecanismo neuronal de síntesis y degradación de la acetilcolina. Se muestra la ruta de síntesis, transporte, eliminación y reciclaje de la molécula de ACh. Abreviaturas: ATP, adenosín trifosfato; ADP, adenosín difosfato; ATPase, proteína de desfosforilación; H^+ , protón; VAcHT, transportador vesicular para acetilcolina. Traducido de Oda, 1999.

1.4.4. Efectos de la hipoxia hipobárica sobre el sistema colinérgico

El sistema colinérgico es especialmente vulnerable a la hipoxia. Se produce una disminución en la síntesis de acetilcolina bajo estas condiciones (Gibson y Duffy, 1981). La reducción en la síntesis puede ser debida principalmente a los cambios de expresión de la enzima que se encarga de la síntesis, y/o la enzima encargada de su degradación. La reducción en la síntesis puede ser debida complementariamente a las consecuencias derivadas del bloqueo de la glucólisis (Gibson y Biass, 1976).

La hipoxia también produce una inhibición parcial en la liberación de ACh (Chleide e Ishikawa, 1990), probablemente por la alteración en la homeostasis para el calcio, fenómeno muy ligado a la hipoxia. Sin embargo, una exposición prolongada en el

tiempo a hipoxia permite el aumento de EPO, y éste hace aumentar la corriente de K⁺ en las neuronas (Yamamoto y cols., 2000), por lo que podría favorecer en tal caso la neurotransmisión.

Una exposición a condiciones de hipoxia de 6100 m de altura simulada durante 7 días, provoca en ratas el incremento en la actividad de la AChE, la disminución en los valores de acetilcolina y daño celular crítico. Además, afecta al aprendizaje en la prueba del laberinto de Morris (Muthuraju y cols., 2009, 2010, 2011).

La alteración del sistema colinérgico que se observa tras una exposición a hipoxia intermitente también puede asociarse a los déficits en la memoria de trabajo encontrados. Tras una exposición alternante de 90 segundos con niveles normales de O₂ y con niveles del 10% de O₂ (equivalentes a unos 5000 metros de altura), durante el sueño, la memoria de trabajo en el paradigma de laberinto de Morris se ve perjudicada, y las neuronas marcadas con anticuerpos para ChAT disminuyen significativamente en todo el prosencéfalo basal, tras 15 días de exposición (Row y cols., 2007).

El factor de crecimiento nervioso (NGF) produce un aumento significativo en su expresión tras una exposición moderada a hipoxia en ratas, y es crítico en la señalización celular para la activación de otros genes (Milbrandt, 1987). En varios estudios se ha podido constatar cómo el NGF aumenta la actividad de las enzimas AChE y ChAT, y parece incrementar la expresión de ChAT (Nonner y cols., 1996) y la expresión del receptor muscarínico M2 (Förander y cols., 1996).

La presencia de zinc en el cerebro también puede estar involucrada en el desbalance del sistema colinérgico, y el daño neuronal asociado, que una exposición a hipoxia desencadena. Durante un episodio de hipoxia, se acumula zinc dentro de las células piramidales de CA3, se produce muerte neuronal y la memoria se ve perjudicada. El Ca₂EDTA es un quelante de zinc que puede utilizarse para evaluar la importancia de este elemento durante tales episodios. La administración de Ca₂EDTA puede quelar el zinc disponible tanto dentro como fuera de las células, incluido el procedente de vesículas sinápticas. La quelación de este elemento en el organismo hace aumentar la expresión de ChAT, y restablece la actividad de la AChE (éste posee un sitio de unión al zinc) a los niveles de pre-exposición (Udayabanu y cols., 2012). También hace mejorar la

memoria espacial y asociativa y reduce el daño neuronal en ratones, tras la hipoxia. El zinc disponible en el cerebro tiene pues una función clave en las disfunciones de la memoria y el daño neuronal asociado a la hipoxia hipobárica.

Los receptores muscarínicos M1 (Anagnostaras y cols., 2003) y M4 (Tzavara y cols., 2003) están involucrados en la neurotransmisión hipocampal y en funciones cognitivas. La administración de zinc en el organismo aumenta la densidad de los receptores muscarínicos en las neuronas (Bonfante-Cabarcas y cols., 2002) e incrementa la expresión de los receptores muscarínicos M1 y M4. A su vez, los receptores muscarínicos tipo M1 median el intercambio de zinc en las células (Zuchner y cols., 2006). Se ha observado que la alteración en la expresión de los receptores muscarínicos puede desaparecer por la quelación del zinc, lo que sugiere el papel relevante de este elemento en todo el sistema colinérgico, incluidos sus receptores.

1.4.5. Mediación del sistema colinérgico en los efectos provocados por la hipoxia hipobárica

El sistema colinérgico, a su vez, puede regular y controlar los efectos que la hipoxia produce sobre la integridad de las células y las funciones cognitivas. Los componentes del sistema colinérgico, tales como AChE y ChAT, son cruciales para explicar el deterioro cognitivo (Bigl y cols., 1990; Bohnen y cols., 2005; Schliebs y Arendt, 2006; Row y cols., 2007; Easton y cols., 2011). Inhibidores de la acetil colinesterasa pueden amortiguar algunos de los efectos que la hipoxia hipobárica provoca.

Una exposición a hipoxia hipobárica provoca en ratas una disminución en los valores de acetilcolina, incremento en la actividad de la AChE y daño celular y cognitivo. La administración de fisostigmina y galantamina, ambos inhibidores de la AChE, hacen disminuir los valores de la AChE, aumentar la ChAT y mantener la morfología de las células intacta. Además, revierten el déficit de aprendizaje observado (Muthuraju y cols., 2009, 2010, 2011).

La HIF -1 α (subunidad α del factor inducible por hipoxia) es una proteína que actúa como factor de transcripción, y se expresa en condiciones naturales bajo hipoxia

(Ratcliffe, 2003). Este inhibidor de la AChE es capaz de aumentar la expresión de HIF-1 α en condiciones normales de presión. A su vez, la inducción de HIF-1 α va seguida del aumento de la expresión de VEGF (del inglés vascular endothelial growth factor), y ambos actúan en la formación de vasos y capilares (Kakinuma y cols., 2010).

Por otra parte, también se ha comprobado que la expresión de HIF-1 α , por inducción de hipoxia, facilita la angiogénesis (Pugh y Ratcliffe, 2003). Otros estudios describen el papel general que juega el sistema colinérgico sobre la angiogénesis (Kakinuma y cols., 2005). Estos hechos hacen ver el papel importante que juega la angiogénesis como respuesta a la hipoxia, y la mediación del sistema colinérgico en todo el proceso. Otros estudios, en cambio, otorgan un papel totalmente opuesto en la angiogénesis al inhibidor de la AChE. Recientes estudios muestran que el tratamiento con donepezilo, utilizado comúnmente en farmacología para paliar los efectos que provoca la enfermedad de Alzheimer, reduce la producción de citoquinas en el proceso inflamatorio (Reale y cols., 2005). Estas citoquinas juegan un papel crítico en la vascularización (Carmeliet, 2003; Tateno y cols., 2006), observado en un modelo de isquemia en extremidades inferiores. Con estas premisas, algunos autores (Miyazaki y cols., 2012) afirman que el donepezilo reduce la expresión de interleucinas y de VEGF, y con todo, reduce el proceso de angiogénesis.

En lo que respecta a la función primaria del donepezilo, éste muestra una capacidad limitada en el cerebro para inhibir a la acetil colinesterasa (Kuhl y cols., 1999). Utilizando la tomografía de emisión de positrones, el tratamiento con donepezilo muestra una modesta inhibición en la actividad de la AChE, más intensa en la corteza cingulada anterior. Los sujetos que mayor inhibición presentaban con el tratamiento de este fármaco realizaban mejor el test de Stroop (tarea que relaciona colores con nombres); se puede asociar así la inhibición de AChE con cambios en las funciones ejecutivas y de atención (Bohnen y cols., 2005).

1.4.6. Consideraciones morfofuncionales acerca de las estructuras cerebrales estudiadas

1.4.6.1. Septum medial y complejo de la banda diagonal de Broca

El núcleo septal medial (o septum medial) y el núcleo de la banda diagonal de Broca (también pueden ser dividido en núcleo –o brazo- horizontal y núcleo –o brazo- vertical) forman un arco convexo de fibras mielinizadas situado en el prosencéfalo. Ambas zonas contienen una abundante población de células colinérgicas. La acetilcolina es el principal neurotransmisor de estas vías, aunque otras vías tienen naturaleza GABAérgica. Varios péptidos, como la sustancia P, encefalina, galanina y neurotensina, también están involucrados. Ante tal variedad de componentes, tres tipos heterogéneos de células pueden ser definidos:

- Por un lado, aquellas células que expresan las enzimas colina acetiltransferasa (ChAT) y acetilcolinesterasa (AChE). La mayoría de éstas coexpresan otros neurotransmisores (glutamato, óxido nítrico, entre otros), neuropéptidos (galanina) y/o receptores (NGF).
- Un segundo tipo es el formado por neuronas GABAérgicas, la mayoría de las cuales expresa péptidos y/u otras proteínas. Algunas de ellas son factores tróficos, proteínas ligadas a calcio, etc. Algunas GABAérgicas actúan como interneuronas locales, mientras otras proyectan a la corteza.
- Un tercer grupo está formado por neuronas que producen la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), diseminadas a lo largo del complejo septal y, más caudalmente, repartidas por la región peróptica. Algunas de estas neuronas también actúan como neuroendocrinas.

El complejo septal medial recibe fibras ascendentes y descendentes. Muchas proceden del tronco del cerebro, y son de naturaleza GABAérgica, glutamatérgica, colinérgica, serotoninérgica, dopaminérgica y norepinefrinérgica. Muchas son conexiones bidireccionales que se establecen en particular con varios núcleos del hipotálamo posterior y la formación reticular. Los núcleos supramamilar, posterior y lateral del hipotálamo parecen constituir una de las principales fuentes de las proyecciones ascendentes. Algunos otros núcleos troncoencefálicos que proyectan al

complejo septal medial son el interpeduncular, área tegmental ventral, rafe, tegmental laterodorsal y locus coeruleus.

Las conexiones al septum medial y a los núcleos de la banda diagonal de Broca, además, se caracterizan por salidas masivas del telencéfalo a estas zonas. El complejo septal también envía proyecciones a la corteza, en la conocida como inervación septocortical; parten a distintas zonas del hipocampo, mPFC, corteza piriforme y otras áreas de la corteza cerebral. Las zonas lateral, septofimbrial y septohipocampal del complejo septal medial parecen enviar fibras a distintas partes del hipocampo, y viceversa. En concreto, el septum medial proyecta esencialmente hacia el hipocampo y su formación. Por el contrario, los núcleos vertical (VDB) y horizontal (HDB) de la banda diagonal de Broca lo hacen, tanto al hipocampo, como a otras regiones de la corteza, tales como piriforme, cingulada y entorrinal (Risold, 2004). Se han descrito densas proyecciones provenientes del núcleo del septum lateral hacia el complejo septal medial, aunque hay investigadores que no apoyan esta máxima.

Se ha sugerido que el septum medial y los núcleos de la banda diagonal de Broca participan en la memoria y la cognición, así como en patologías asociadas, como la enfermedad de Alzheimer. Una acción similar se ha descrito para la componente serotoninérgica del núcleo de rafe, que recibe aferencias provenientes del complejo septal medial (Kalen y Wicklund, 1989). Al mismo tiempo, receptores serotoninérgicos localizados en el septum medial y el núcleo vertical de la banda de Broca participan en la regulación de la respuesta a la hipertensión; el bloqueo de estos receptores aumenta la presión sanguínea (Urzedo-Rodriguez y cols., 2011).

1.4.6.2. Área CA1 del hipocampo

La formación hipocámpica está compuesta por el giro dentado, subículo, corteza entorrinal e hipocampo, y forma parte de la arquicorteza, teniendo una aparición temprana en la evolución con respecto al resto de la corteza. Se puede emplazar dentro de la corteza temporal, y forma parte del sistema límbico. Durante el desarrollo embrionario, el hipocampo es desplazado desde la superficie a una zona más profunda del cerebro.

El hipocampo está dividido en tres áreas: CA1, CA2 y CA3. Estas áreas están densamente pobladas por células piramidales, muy similares a las encontradas en el resto de la corteza. La zona más distal de las tres, CA1, se caracteriza por estar formada por células piramidales pequeñas, mientras que en la zona más proximal, formada por la CA2 y CA3, abundan las neuronas piramidales de mayor tamaño.

Las principales conexiones en esta estructura se establecen en forma de circuito trisináptico. Dentro de este circuito, las neuronas del área CA1 del hipocampo proyectan a CA3 y al giro dentado, aunque las mayores proyecciones se dirigen al subículo (Amaral y cols., 1991), siendo ésta una proyección bidireccional (Commins y cols., 2002). Los axones de las células piramidales de CA3 también proyectan, pues, sus axones, a CA1.

Además, esta estructura recibe aferencias corticales y subcorticales desde otras estructuras, llegando fibras desde septum, amígdala y núcleo reuniens del tálamo. Las fibras de CA1 proceden o proyectan, además, a la corteza entorrinal (capa 3), perirrinal, postrinal, septum y amígdala. A su vez, el área CA1 proyecta a la corteza retrosplenial, núcleo accumbens, mPFC, núcleo olfatorio, hipotálamo y bulbo olfatorio (Paxinos, 2004; 2012).

Estas proyecciones pueden ser de naturaleza colinérgica, noradrenérgica, serotoninérgica y dopaminérgica.

Al área CA1, en conjunción con el hipocampo, se le atribuye un papel destacado en la memoria, el aprendizaje y la percepción espacial. La sinapsis CA1-mPFC participa en procesos de adquisición de nuevas tareas motoras, y su almacenaje, en un modelo animal con envejecimiento acelerado (López-Ramos y cols., 2012). Otros estudios han propuesto que el área CA1 funciona como un comparador entre las conexiones procedentes de la corteza entorrinal y CA3, utilizado para controlar los niveles de acetilcolina y modular el proceso de codificación y recuperación de la memoria (Hasselmo y Schnell, 1994; Hasselmo y Wyble, 1997).

La perfusión de atropina en el hipocampo (antagonista del receptor muscarínico M1) produce excitabilidad en la sinapsis CA3 – CA1 (Leung y Vanderwolf, 1980). También

se ha demostrado como la ACh aumenta la inducción de la LTP en la región CA1 (Hirotsu y cols., 1989; Tanaka y cols., 1989; Blitzer y cols., 1990; Huerta y Lisman, 1994). El aumento colinérgico, producido a través de mecanismos de activación o estimulación, activa la síntesis proteica vía receptores NMDA (Feig y Lipton, 1993). En cambio, otros autores han encontrado que los altos índices de acetilcolina producen una disminución de la potenciación de la sinapsis CA3 – CA1 (Hasselmo y Schenell, 1994).

Un episodio de hipoxia aguda puede alterar el funcionamiento normal de estos procesos, manifestándose sus consecuencias incluso en amnesia severa. El uso de escáneres de resonancia magnética ha evidenciado atrofia en la corteza temporal medial, en concreto del hipocampo y la formación parahipocampal, en sujetos afectados en estas situaciones (Reed y cols., 1999).

1.4.6.3. Corteza Piriforme

La corteza piriforme está muy ligada a las vías olfatorias, formando parte del sistema del rinencéfalo; por ello se la denomina indistintamente corteza olfatoria primaria. También se asocia al sistema límbico. Se halla situada en el telencéfalo y forma parte del neocortex. En los mamíferos, el volumen de esta corteza se incrementa en proporción con el volumen total del cerebro. Esta corteza, además, está muy representada proporcionalmente en mamíferos insectívoros y roedores. Comprende las áreas prepiriforme, periamigdalina y entorrinal. La corteza entorrinal es considerada como el área cortical olfatoria secundaria.

Los axones que llegan a la corteza piriforme proceden en su mayoría del bulbo olfatorio; los trazadores revelan que lo hacen con mayor intensidad desde la parte posterior medial del bulbo, sin que se emitan colaterales a otras zonas (Scott y cols., 1980).

La corteza piriforme envía fibras de asociación que se extienden por todos los centros que reciben proyecciones directas del bulbo olfatorio. Además, proyecta a varias zonas del prosencéfalo, como la amígdala, el hipocampo, el hipotálamo, el tálamo dorsal

y la neocorteza. Las fibras que llegan al hipocampo y la amígdala provienen principalmente de la corteza periamigdalina y la adyacente parte olfatoria rostral de la corteza entorrinal. Estas fibras forman parte de vías polisinápticas que conectan el rinencéfalo con el septum y el hipotálamo. La proyección de la corteza olfatoria primaria al tálamo dorsal es bastante pequeña y termina, principalmente, en la parte medial del núcleo mediodorsal. Las proyecciones a la neocorteza se dirigen a regiones de la corteza insular y orbital. Frecuentemente, estas regiones son agranulosas, con ausencia de la capa 4 de la corteza. Estas proyecciones neocorticales difieren bastante de las vías sensoriales más convencionales, al no hacer relevo en el tálamo, y los aferentes que transportan esta información terminan mayormente en la capa 1 de la corteza (Nieuwenhuys y cols., 1988).

La función principal que se le atribuye es el procesamiento en la percepción de los olores, aunque cada vez le son atribuidas más funciones. Modelos de estudio muestran cómo el sistema colinérgico está involucrado en procesos de aprendizaje en la corteza piriforme (Hasselmo y Bower, 1992, 1993; Hasselmo y cols., 1992; Barkai y cols., 1994).

Durante la plasticidad sináptica que tiene lugar en la corteza piriforme, se ha asumido una participación importante de la acetilcolina en la modificación de las sinapsis. El incremento de este neurotransmisor está relacionado con el almacenamiento de la información en las estructuras corticales. El carbacol, agonista de la ACh, aumenta la fuerza sináptica de la LTP en la corteza piriforme. La acetilcolina puede favorecer tanto el fenómeno de LTP, como el de LTD, por lo que ambos procesos podrían actuar juntos para incrementar la estabilidad de las conexiones que se establecen en la corteza piriforme y otras áreas corticales, y propiciar así la adquisición de la nueva información (Hasselmo y Barkai, 1995).

1.4.6.4. Corteza visual secundaria

Localizada en el lóbulo occipital, a la corteza visual tradicionalmente se le han asignado funciones de procesamiento de la información visual contralateral. Se puede

dividir en varias áreas: una corteza estriada (primaria o V1) y diferentes áreas corticales extraestriadas (V2, V3, V4 y V5).

En el cerebro de mono, la corteza visual V2, o secundaria, recibe gran cantidad de proyecciones desde la corteza visual primaria, y envía igual número de proyecciones a ésta y a otras cortezas visuales secundarias (Gattas y cols., 1997). La reciprocidad mantenida con la corteza visual primaria se establece, de forma directa, o a través del núcleo talámico pulvinar. Entre los tipos celulares, son características dos poblaciones diferenciadas de células bipolares en la corteza visual (Peters y Harriman, 1988), que establecen conexiones axodendríticas con otras neuronas. Se presentan fundamentalmente en las capas 2 y 3 de esta corteza, y algunas expresan la enzima ChAT (Parnavelas y cols., 1986).

En conjunto, la corteza visual secundaria proporciona una representación mapeada de todo el campo visual. La mayoría de las neuronas de V2 se activan ante estímulos específicos, como frecuencia espacial, orientación, tamaño, color y forma (Hegde y Van Essen, 2000). Algunas otras neuronas están implicadas en el procesamiento de propiedades visuales más complejas, como son el procesamiento de contornos aparentes o ambiguos, la pertenencia de un estímulo visual a un determinado objeto o al fondo difuminado o, lo que es lo mismo, la interpretación de la tridimensionalidad (Qiu y Von der Heydt, 2005), o la interacción entre la orientación y la profundidad (Ts'ó y cols., 2009). Algunos autores asocian en concreto la capa 3 del área V2 con el procesamiento de la información visual.

Existen autores que sostienen que las proyecciones que se dirigen desde la parte ventral de la corteza visual secundaria al hipocampo son importantes para la memoria visual (Bussey y Saksida, 2007). La capa 6 de la corteza visual V2 está compuesta por numerosos tipos celulares, y su respuesta a los estímulos visuales es más compleja. Recientemente, se ha descrito que esta capa es importante para el procesamiento de la memoria de reconocimiento. La expresión de la proteína reguladora RGS-14 en esta capa de la corteza visual V2 promueve la consolidación de la memoria. Asimismo, la eliminación selectiva de las neuronas de esta capa, a través de toxinas, impide la formación de la memoria de reconocimiento (López-Aranda y cols., 2009).

Introducción

Esta corteza, en general, recibe proyecciones colinérgicas que se consideran involucradas en la modulación de los estados de alerta y sus efectos. Los efectos facilitadores o inhibidores de la ACh no muestran correlación con clasificación alguna que se establezca entre las neuronas de la corteza visual, pero sí existe cierta dependencia en función de la capa donde se sitúe cada célula (Sillito y Kemp, 1983). Estudios recientes también muestran que algunas neuronas de V2 registran cierta modulación en procesos de atención.

Antecedentes

2. ANTECEDENTES

Son numerosos los estudios publicados en los que se pone de relieve los efectos que la hipoxia hipobárica provoca sobre el sistema nervioso. Entre ellos, se distinguen aquellos que reportan beneficios a nivel fisiológico o celular, de aquellos otros que describen un deterioro en algún componente del sistema.

De esta manera, muchos estudios han dado una visión positivista sobre los beneficios que la hipoxia hipobárica mantenida en el tiempo, o aclimatación a altura simulada, pueden reportar a los individuos que se exponen a ella (Katayama y cols., 1998; Meeuwsen y cols., 2001; Hendriksen y Meeuwsen, 2003). Así mismo, otros investigadores han sido detractores de esta máxima (Terrados y cols., 1985; Rodríguez y cols., 2007). En ambos casos, los beneficios o empeoramientos descritos se han centrado mayoritariamente sobre el ámbito físico o deportivo.

Existe una relación entre los efectos que la hipoxia hipobárica induce en la componente deportiva y los que produce en la componente cognitiva, ya que para que se produzca una mejora, o un deterioro, en el rendimiento deportivo de un individuo, necesariamente éste debe ir acompañado de unos indicativos neurofisiológicos que lo sustenten. Es por ello lo conveniente de tratar esta temática desde aspectos cognitivos, ya que, además, escasea la bibliografía dedicada a estos aspectos.

El planteamiento general de este trabajo está dirigido a analizar los efectos que sobre el aprendizaje y la memoria experimentan los individuos expuestos a hipoxia hipobárica de forma aguda o crónica. Ésta última situación implica un proceso de aclimatación.

Este trabajo está enfocado como un estudio multidisciplinar, abordando el planteamiento desde tres perspectivas distintas: i) a través de técnicas comportamentales, para la evaluación del aprendizaje y la memoria; ii) por medio de técnicas electrofisiológicas, para estudiar hipotéticos cambios en la conductividad sináptica; y iii) mediante técnicas inmunohistoquímicas, para estudiar el sistema colinérgico.

Ante la dificultad de dilucidar mejoras o deterioros (o cualquier otro cambio) en el plano cognitivo por medio de metodologías convencionales en animales aclimatados a

altura, se propone reformular los paradigmas empleados en pruebas comportamentales y/o cognitivas.

En el presente trabajo la metodología empleada en las pruebas experimentales incorpora una particularidad: estas pruebas tienen como objetivo propiciar rendimientos submáximos en los individuos a estudio. El término rendimiento submáximo no es habitual en la literatura relacionada con pruebas cognitivas, aunque sí es usualmente empleado en fisiología (Latshang y cols., 2011; Barret et al., 2012) para designar un nivel de esfuerzo que se puede plantear para una tarea. El rendimiento submáximo en pruebas cognitivas, en cambio, es entendido aquí como el nivel de respuesta esperado ante pruebas de complejidad superior. Estas pruebas provocan unos valores inferiores en resultados, respecto a los concebidos en pruebas más convencionales (López-Ramos y cols., 2007), pero pueden ayudar a establecer diferencias que apoyen la hipótesis de que la aclimatación a cierto grado de altura puede tener beneficios en el ámbito cognitivo.

De tal forma, se procede a aplicar unos protocolos que requieren de mayor exigencia en la ejecución de las tareas, por lo que se propicia obtener unos rendimientos o respuestas submáximas en los animales, con el fin de que se acentúen las diferencias en función de que éstos se sometan o no a hipoxia hipobárica, tanto de forma aguda, como por aclimatación, y con ello poder dilucidar hipotéticas mejoras cognitivas en alguna de las situaciones.

2.1. Objetivos

1. Estudiar mediante técnicas comportamentales, electrofisiológicas e inmunohistoquímicas, el déficit cognitivo (referido al aprendizaje y la memoria) provocado por la exposición a hipoxia hipobárica aguda.
2. Comprobar, mediante el uso transversal de las citadas técnicas, si la aclimatación a altura previene el déficit cognitivo asociado a exposiciones agudas.
3. Evaluar la metodología basada en la persecución de un rendimiento submáximo para intentar detectar diferencias cognitivas no obtenidas mediante metodologías convencionales.
4. Comprobar, a través de esta metodología, si se producen cambios en el rendimiento cognitivo de individuos aclimatados a altura simulada, una vez que ejecutan tareas a presión normal.
5. Estudiar cambios en las propiedades de las sinapsis talámico-corticales inducidos por una exposición aguda a hipoxia hipobárica.
6. Estudiar posibles cambios en el balance del sistema colinérgico en áreas cerebrales implicadas en funciones cognitivas, tras la exposición aguda, o la aclimatación, a hipoxia hipobárica.

Todos los ensayos realizados en el presente trabajo se enmarcaron dentro de la legislación europea vigente respecto a la protección de animales utilizados para la investigación y otros fines científicos (2003/65/CE), y la correspondiente normativa española (BOE 252/34367-91, 2005). A su vez, los experimentos han sido aprobados por el Comité Ético de la Universidad Pablo de Olavide de Sevilla.

3.1. Condiciones generales

Para el presente trabajo se utilizaron ratones macho de dos meses de edad aproximada, de la cepa C57BL/6, con un peso aproximado de 24-32 gramos. Éstos fueron suministrados por proveedores oficiales (Centro de Producción y Experimentación Animal, Universidad de Sevilla, Espartinas, Sevilla). Los animales se mantuvieron en condiciones óptimas de luz, temperatura, humedad y ventilación, con libre acceso a la comida y agua, salvo experimentos que de forma excepcional lo requirieran. La temperatura se mantuvo sobre los 21 ± 1 grados centígrados. Los valores de humedad relativa oscilaron sobre el 50 ± 7 %. Durante todo el proceso de experimentación, los animales permanecieron en jaulas individuales de dimensiones $12 \times 12 \times 30$ cm, con exposiciones de ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. La presión atmosférica fue la correspondiente a 35 metros de altura, altitud media de la ciudad de Sevilla (que dependiendo de las condiciones atmosféricas del momento variarían en torno a los 760 mmHg); el mantenimiento de los ratones y los experimentos se realizó a esta presión salvo en las circunstancias en las que se explicita lo contrario.

Para el desarrollo de las pruebas experimentales fue necesaria la utilización de una cámara hipobárica (*fig. 3.1.*), es decir, una cámara con entrada y salida de aire reguladas, que permitió, a través de la modulación de sus flujos de entrada y salida, regular la presión en el interior de ella. Según la relación inversa que se establece entre presión atmosférica y altitud, con los diferentes cambios de presión que se pueden modular en la cámara, se recrearon condiciones similares a las existentes en alta montaña. Se indujeron, pues, condiciones de hipoxia hipobárica, es decir, de escasez de oxígeno debido a una bajada en la presión atmosférica. Su diseño se realizó en el laboratorio a partir de un modelo previo propio (López-Ramos y cols., 2007), y la

fabricación se encargó a un taller de tornería (Mecanizados R. López e Hijos, Los Palacios y Villafranca, Sevilla).



Figura 3.1. Imagen general y detalles de los accesorios de la cámara hipobárica. Nótese la salida (flecha y recuadro rojos) y la entrada (flecha azul) de la circulación de aire. La extracción del aire es forzada mediante una bomba de vacío (SB-10, DVP, Bolonia, Italia) situada en el exterior del edificio. Posee además una pequeña compuerta estanca intercambiable para entrada y salida del cableado (recuadro verde), necesarios para conectar los equipos externos con los electrodos implantados en los ratones durante las pruebas de electrofisiología, o con la jaula de Skinner durante el desarrollo del condicionamiento operante. El rotámetro se muestra en detalle (recuadro azul).

La cámara posee unas dimensiones interiores de 63 cm de alto y 80 cm de diámetro de cilindro, cuenta con un volumen interior de 316 litros, suficiente para poder dar cabida a las jaulas de los animales que deben ubicarse dentro de ella, para su exposición durante semanas a hipoxia hipobárica (proceso de aclimatación). Dado que el flujo de circulación de aire a 5000 metros de altura simulada (altura máxima a la que se han realizado los experimentos) es de 35 l/min, la tasa de recambio de aire (tiempo que tarda en renovarse todo el volumen de aire en el interior de la cámara) es de unos 9 minutos. Se garantiza así que no se va a producir un aumento de la concentración interior del CO₂, producto de la respiración de los animales.

El material, de hierro, con una tapadera de metacrilato de 5 cm de espesor y con cierre sellado, impide la entrada de aire por cualquier zona no regulada. Posee además un vacuómetro y un rotámetro; este último puede regular de manera activa el flujo de aire que entra al interior de la cámara (fig. 3.2.).

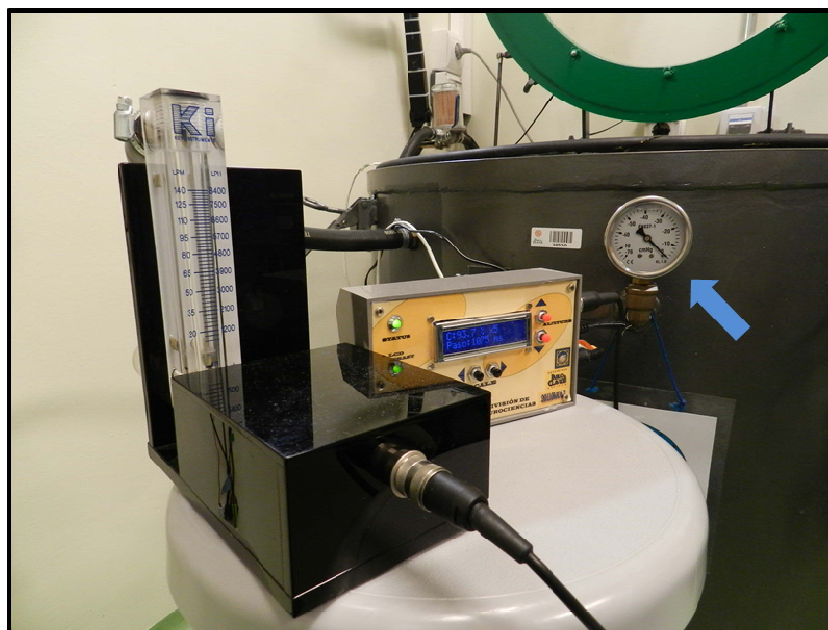


Figura 3.2. Imagen del sistema de control y medición de los flujos de aire de la cámara hipobárica. Se muestran el vacuómetro y rotámetro acoplados al sistema de circulación. El vacuómetro (flecha azul) indica el nivel de presión soportado en el interior de la cámara en tiempo real; viene indicado en centímetros de mercurio (cm Hg) restados de los 760 mm de Hg de los que se parte a presión normal. El rotámetro (en primer plano) expresa el caudal de aire en litros por minuto que entran en la cámara en tiempo real y puede ser regulado de forma automática, mediante el cuadro de mandos digital (en el centro de la imagen).

3.2. Descripción de los grupos experimentales

Al pretender ser éste un estudio interdisciplinar, las distintas técnicas con las que se abordó el trabajo requirieron la necesidad de introducir tres grupos independientes de poblaciones de animales, para los correspondientes tipos de prueba (comportamental, de registro electrofisiológico, e inmunohistoquímico).

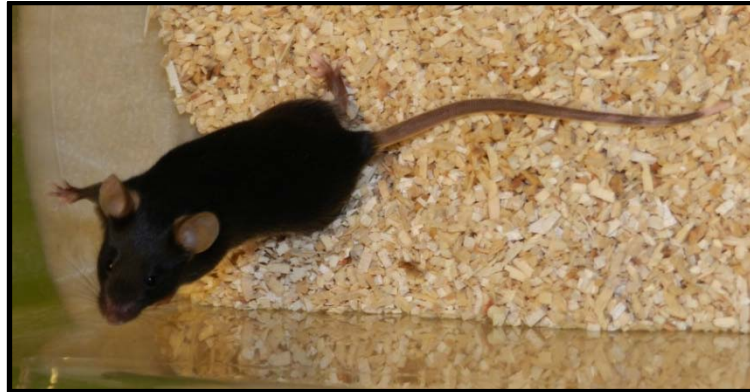


Figura 3.3. Imagen de ejemplar de ratón de la cepa C57BL/6, utilizado durante uno de los ensayos.

Por un lado, para las tareas de tipo comportamental (condicionamiento clásico y operante, reconocimiento de objetos y laberinto de 8 brazos), se establecieron cuatro poblaciones de ratones: grupo control (C), grupo de animales sometidos a hipobaría aguda (H) y dos grupos de animales aclimatados a altura (*fig. 3.4.*). Los dos primeros grupos se mantuvieron en las condiciones ambientales anteriormente citadas, a una presión atmosférica de ≈ 760 mmHg. El grupo de hipobáricos agudos (de animales no aclimatados) realizó las pruebas en hipoxia hipobárica a 5000 metros de altura simulada (≈ 394 mmHg de presión), y el resto del tiempo permaneció a una presión de ≈ 760 mmHg. Los grupos de ratones aclimatados a altura se sometieron durante más de 2 semanas (previas a la experimentación y durante los días de realización de las tareas) a condiciones de hipoxia en la cámara hipobárica. Se los expuso a 5000 metros de altura simulada (≈ 394 mmHg), en la que permanecieron también durante el periodo experimental, y el resto de condiciones ambientales fueron similares a las de los otros grupos de animales. Un grupo de los animales aclimatados a altura se sometió a experimentación en condiciones normales de 760 mmHg (grupo AT) sólo y cuando

realizaron las pruebas, y el otro grupo se sometió a 5000 metros de altitud simulada durante todo el proceso de ejecución de las pruebas (grupo AH). Existen muy concretas excepciones en algunas de las pruebas, en las que se hace constar de forma detallada en cada apartado. Junto a estos grupos, durante el condicionamiento clásico de tipo traza y tipo demora se requirió el uso de un quinto grupo de experimentación: animales pseudocondicionados, utilizados para la validación de estas pruebas, descritos con posterioridad.

	<i>Pseudo</i>	C	H	AT	AH
Aclimatación a 5000 m	no	no	no	si	si
Altitud durante experimentación (m)	35	35	5000	35	5000
Presión durante experimentación (mm Hg)	≈ 760	≈ 760	≈ 394	≈ 760	≈ 394

Figura 3.4. Caracterización de los grupos establecidos para las pruebas comportamentales y de condicionamiento clásico. C, grupo control; H, grupo animales sometidos a hipobaría aguda; AT y AH, grupos de animales aclimatados a altura simulada. En las pruebas de condicionamiento clásico de reflejo palpebral de traza y demora, se incluyó un grupo adicional: *Pseudo*, grupo de pseudocondicionados, a los cuales se aplicó un programa de condicionamiento con relación aleatoria entre los estímulos.

En los ensayos de electrofisiología para la estimulación en el núcleo mediodorsal del tálamo y el registro en la corteza prefrontal medial, se utilizó un único grupo de animales, los cuales se sometieron a distintas condiciones de descompresión (o altura simulada). Así, los individuos fueron sometidos a 3 situaciones distintas durante el experimento, como se esquematiza a continuación (*fig. 3.5.*).

	<i>Tierra</i>	5000m	6500m
Altitud durante registro y estimulación (m)	35	5000	6500
Presión durante registro y estimulación (mm Hg)	≈ 760	≈ 394	≈ 332

Figura 3.5. Caracterización de las distintas condiciones de presión a las que fueron sometidos los animales. Un único grupo de animales fue sometido a distintas condiciones de presión, o altura simulada, dentro de la cámara hipobárica. *Tierra* hace referencia a la primera de las condiciones a las que los animales fueron sometidos, en la cual no se procedió a la despresurización de la cámara (aunque el experimento se llevó a cabo dentro de ella).

Para los ensayos inmunohistoquímicos y de fluorescencia se utilizaron 3 grupos: animales del grupo control (en las condiciones ambientales ya citadas, grupo C), animales hipóxicos hipobáricos agudos, y animales aclimatados (*fig.* 3.6.). Los hipobáricos agudos permanecieron expuestos a hipoxia hipobárica en la cámara hipobárica durante 2 horas. Los aclimatados se mantuvieron en condiciones de hipoxia hipobárica durante un periodo de 2 semanas. Estos dos grupos, a su vez, se separaron en función del tiempo transcurrido desde su exposición a hipoxia y su perfusión y posterior fijación de tejidos. Tanto unos como otros fueron perfundidos, bien inmediatamente, tras su exposición a hipoxia, o bien a las 24 horas. Por tanto, se distinguieron animales hipóxicos agudos perfundidos justo después de la exposición aguda (grupo H 0h), animales hipóxicos agudos perfundidos 24 horas después de la exposición aguda (grupo H 24h), animales aclimatados perfundidos justo después del periodo de aclimatación (grupo A 0h) y animales aclimatados perfundidos 24 horas después del periodo de aclimatación (grupo A 24h).

	C	H 0h	H 24h	A 0h	A 24h
Tiempo de Exposición a hipoxia hipobárica (5000 m simulados)	No procede	2 horas	2 horas	2 semanas	2 semanas
Tiempo transcurrido desde exposición a hipobaría hasta perfusión	No procede	0 horas	24 horas	0 horas	24 horas

Figura 3.6. Caracterización de los grupos establecidos para las pruebas inmunohistoquímicas. C, grupo control; H 0h y H 24h, grupos de exposición aguda a hipobaría; A 0h y A 24h, grupos aclimatados a hipobaría. La perfusión hace referencia al momento en el cual se llevó a cabo el sacrificio de los animales y el comienzo de la fijación de sus tejidos.

3.3. ESTUDIO COMPORAMENTAL

La metodología empleada en las pruebas comportamentales fue nueva en su diseño y desarrollo, al estar enfocada a la consecución de unos rendimientos submáximos en los animales de experimentación. Con ella se obtuvieron menores niveles de aprendizaje debido a las características de las pruebas, de complejidad manifiestamente superior a las usuales aplicadas en condiciones estándar. De esta forma, se pretendió detectar diferencias que no se obtuvieron en pruebas convencionales anteriormente realizadas (López-Ramos y cols., 2007).

3.3.1. Condicionamiento clásico del reflejo corneal

Este tipo particular de aprendizaje asociativo consistió en un modelo de estímulo-respuesta, en el que el músculo orbicular (*u orbicularis oculi*) del párpado del animal puede responder ante determinados estímulos que se le presentan. La elección de este músculo se debe a que su inervación es bien conocida y simple, su flexión y su extensión no implican movimientos de articulaciones esqueléticas, y además su

contracción, que conduce al cierre del párpado, no implica esfuerzo contra la gravedad, por lo que su requerimiento metabólico es mínimo. La evaluación de esta prueba se basó en el análisis de la electromiografía registrada durante la respuesta de este músculo. Se utilizaron dos paradigmas distintos en el presente trabajo: condicionamiento clásico de tipo traza y tipo demora.

Se utilizaron distintos ratones para cada una de las dos pruebas, en un número igual o superior a 8 animales por grupo.

El paradigma de traza consistió, básicamente, en la aplicación de un estímulo neutro (que a priori no provoca en el animal la respuesta que se pretende registrar), y que en este caso fue un tono de 70 dB, 6 kHz y 20 mseg de duración, seguido de un segundo estímulo, llamado estímulo incondicionado, consistente en una pequeña descarga de intensidad igual al doble del valor umbral que origina respuesta refleja de cierre del párpado. Cada descarga tuvo una duración de 50 μ seg, fue aplicada en la rama supraorbitaria del nervio trigémino, y provocó el cierre del párpado del animal (respuesta incondicionada). La frecuencia del tono se ajustó por medio del generador de ondas programable AFG 3022B (Tektronix, Beaverton, EE.UU.), conectado a un altavoz. Las características del estímulo incondicionado se programaron con la ayuda de estimuladores CS-220 (Cibertec, Madrid), conectados a las unidades de aislamiento ISU 200 BIP (Cibertec, Madrid), éstas últimas encargadas de aplicar físicamente las descargas. Con la exposición sucesiva al par de estímulos, aplicados conjuntamente con un intervalo de tiempo entre ellos adecuado y fijo (250 milisegundos), el animal termina asociando el primer estímulo con el US, hasta que la sola aplicación del primero, otrora estímulo neutro, provoca una respuesta equivalente a la que produce el US (cierre del párpado) (Gormezano y cols. 1962). Se dice entonces que el estímulo pasa a ser condicionado porque se ha originado debido a su asociación con el estímulo incondicionado. A la respuesta originada por el CS se la conoce como respuesta condicionada.

El paradigma de condicionamiento clásico de tipo demora se basó en los mismos preceptos que el anterior arriba descrito. El procedimiento por el cual se desarrolló el paradigma fue similar tanto en la presentación de estímulos, como en la naturaleza y los

medios y equipos utilizados para el paradigma de traza. La presentación del estímulo neutro/condicionado tuvo las mismas características, salvo en su duración. En el paradigma de demora, la duración del tono se fijó en 250 milisegundos, solapándose en su tramo final con la presentación del estímulo incondicionado.

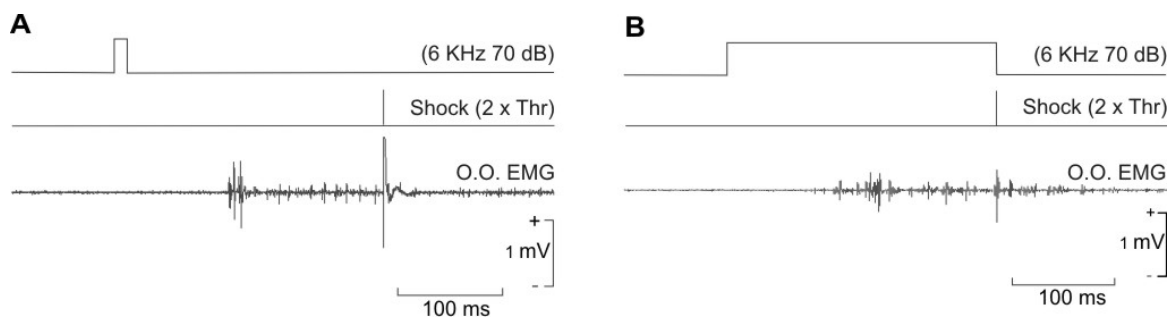


Figura 3.7. Resumen esquemático de los diferentes paradigmas de condicionamiento aplicados. A, Condicionamiento clásico de tipo traza. Se representa la aplicación del tono de 20 mseg de duración; 250 mseg después de su aparición se aplica la descarga eléctrica. **B,** Condicionamiento clásico de tipo demora. Se representa la aplicación del tono de 250 mseg de duración; al final del estímulo condicionado se aplica la descarga eléctrica, solapándose ambos. Se muestran dos registros correspondientes a la actividad electromiográfica durante la sesión cuarta de condicionamiento.

Los parámetros arriba descritos (tanto para el paradigma de traza como para el de demora) tuvieron menor capacidad estimuladora (en lo referido a la intensidad del tono y las características del estímulo incondicionado) que los usualmente empleados para estos paradigmas (López-Ramos y cols., 2007), debido al rendimiento submáximo esperado en estos animales. La intensidad del sonido fue menor, y la frecuencia de 6000 Hz fue menos excitadora para el animal. La duración e intensidad del US también provocaron menor reacción en el animal.

Estos experimentos constaron de varias sesiones de habituación, en las que el animal fue sometido a la presentación repetidas veces de sólo el estímulo condicionado (neutro inicialmente), para su desensibilización ante la presentación de éste, y para evitar en buena medida la respuesta de sobresalto. Se continuó con un número fijo de sesiones de condicionamiento, en las que se presentaron conjuntamente estímulo condicionado e incondicionado repetidamente durante un tiempo determinado, y que permitieron que el animal aprendiera la relación entre ambos estímulos y se obtuvieran las consiguientes respuestas condicionadas, que fueron la evidencia del aprendizaje. Finalmente, se realizaron las sesiones de extinción, en las que de nuevo sólo se presentó

el estímulo condicionado, con el fin de observar el tiempo que tardan en desaparecer las respuestas condicionadas. Las sesiones estuvieron organizadas de acuerdo a un protocolo intensivo diseñado en el laboratorio (López-Ramos J.C. y cols., 2007) que estableció en 5 el número de días empleados para la prueba.

De esta manera, cada sesión constó de 50 eventos (presentaciones de estímulos). Cada día se presentaron 4 sesiones (200 eventos en total), como se ilustra en la siguiente figura, en el que H representa las sesiones de habituación, C las de condicionamiento, y E las de extinción, y de las que fueron analizadas aquellas que figuran seguidas de su número de orden.

Día	1°				2°				3°				4°				5°				
Sesión	H1	H2	H3	C1	C2	C	C	C	C3	C	C	C	C4	E1	E	E	E	E2	E	E	E3

Figura 3.8. Representación esquemática y ordenada en el tiempo de las diferentes sesiones de habituación (H), condicionamiento (C) y extinción (E) realizadas durante el condicionamiento clásico de traza y el de demora. El número que le acompaña (1 – 4) indica el orden de aparición de la sesión en los gráficos donde se representan las curvas de condicionamiento.

Las tres primeras sesiones (habitación) se realizaron con los cinco grupos experimentales bajo presión atmosférica de 1 atm (760 mmHg). El resto de sesiones se realizaron según las particulares condiciones de presión definidas para cada grupo.

3.3.1.1. Procedimientos quirúrgicos utilizados para el condicionamiento clásico

Para la realización de estos experimentos fueron necesarias operaciones de microcirugía en ratones con el fin de implantarles un par de electrodos en el músculo orbicularis oculi (registro) y otro par en la rama supraorbitaria del nervio trigémino (estimulación) sobre el párpado.

Se anestesió a los animales con ketamina (Ketolar, Pfizer, Nueva York, EEUU) y xilacina (Rompun, Bayer Health Care, Leverkusen, Alemania), (35 + 8 mg/kg de peso, respectivamente). Durante el periodo efectivo de la anestesia, se aplicó un gel sobre la córnea del animal para evitar su deshidratación (Methocel al 2%, OmniVision,

Neuhausen, Suiza). Para la implantación de los electrodos, se realizó primeramente una incisión antero-posterior en el cuero cabelludo del ratón a lo largo de la línea media. La incisión cortó piel y tejido subcutáneo. A continuación se limpió la zona craneal expuesta con gasas estériles y se retiró el periostio con ayuda de un bisturí.

Como electrodos se usaron los *pinas* de un conector de cuatro vías (RS-Amidata, Madrid) que quedó fijado en el cráneo del animal por dos tornillos pequeños enroscados sobre el cráneo, ofreciendo sujeción al conector una vez unidos mediante cemento dental (Duralay, Dental Mfg. Co., Illinois, USA). Este cemento endureció en pocos minutos tras su aplicación, favoreciendo una mayor sujeción al conjunto conector-tornillos (*fig. 3.9.*).

Finalmente, la herida en la piel del cráneo fue cerrada mediante puntos de sutura, y en la zona se aplicó una crema cicatrizante y antibiótica (Blastoestimulina al 2 %, Almirall, Barcelona).

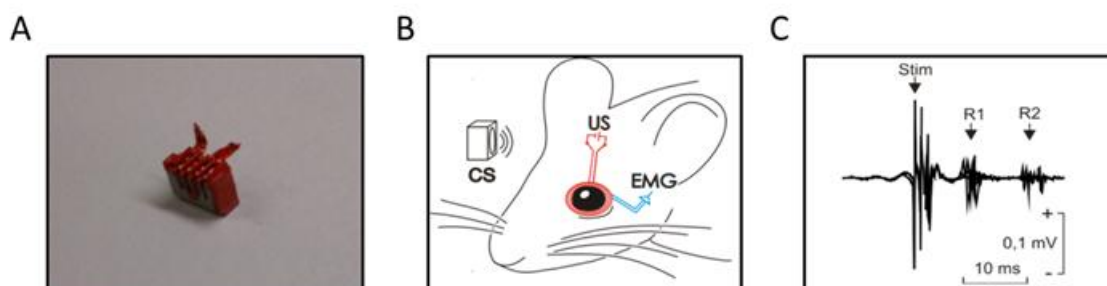


Figura 3.9. Detalles de los electrodos de estimulación y registro, la colocación y el registro en el músculo orbicularis oculi. **A**, Los electrodos utilizados para la estimulación y registro del párpado fueron los *pinas* de un conector de cuatro vías. **B**, Esquema de la implantación de los electrodos dentro del músculo del párpado. Se aprecia el estímulo condicionado (CS), en forma de tono; el estímulo incondicionado (US), en forma de descarga eléctrica; y el registro (EMG) de la actividad del músculo. **C**, Superposición de 5 registros electromiográficos del músculo *orbicularis oculi*, donde se observan el estímulo (Stim), y los componentes R1 y R2 característicos de su respuesta refleja.

Durante la cirugía y el postoperatorio, se recubrió el cuerpo del animal para evitar pérdidas excesivas de calor (los movimientos del ratón son mínimos bajo el efecto anestésico, y su temperatura tiende a disminuir). Tras 5-7 días de recuperación, se procedió a la experimentación.

3.3.1.2. Registro y análisis de la actividad electromiográfica

En cada sesión de condicionamiento, los animales se introdujeron en cajas de plástico individuales (10 x 18 x 15 cm), dentro de la cámara hipobárica. La electromiografía del párpado se registró mediante los electrodos que captaron la señal eléctrica consecuencia de la inervación motora del orbicularis oculi, y que fue posteriormente amplificada y filtrada, para su posterior análisis.

El registro electromiográfico se llevó a cabo mediante un amplificador diferencial Grass P511 (Grass Telefactor, West Warwick, RI, EEUU) con un ancho de banda de 1 Hz a 10 kHz. Los registros se visualizaron en directo en el osciloscopio (TDS 2014B, Tektronix, Beaverton, EE.UU.), y los datos se almacenaron digitalmente en un disco duro a través de un convertidor analógico-digital (CED 1401 Plus; Cambridge Electronic Design, Cambridge, Reino Unido) con una frecuencia de muestreo de 11 – 12 kHz y con una resolución de amplitud 12 bits (*fig. 3.10.*), para su posterior análisis con ayuda del programa Signal Average (Cambridge Instruments, Cambridge, Reino Unido) (*fig. 3.11.*). Para ello fue necesario un convertidor de pulsos TTL (Cibertec, Madrid). Posteriormente los registros se analizaron usando una hoja de cálculo diseñada con el programa Microsoft Excell (Microsoft Office 2010).

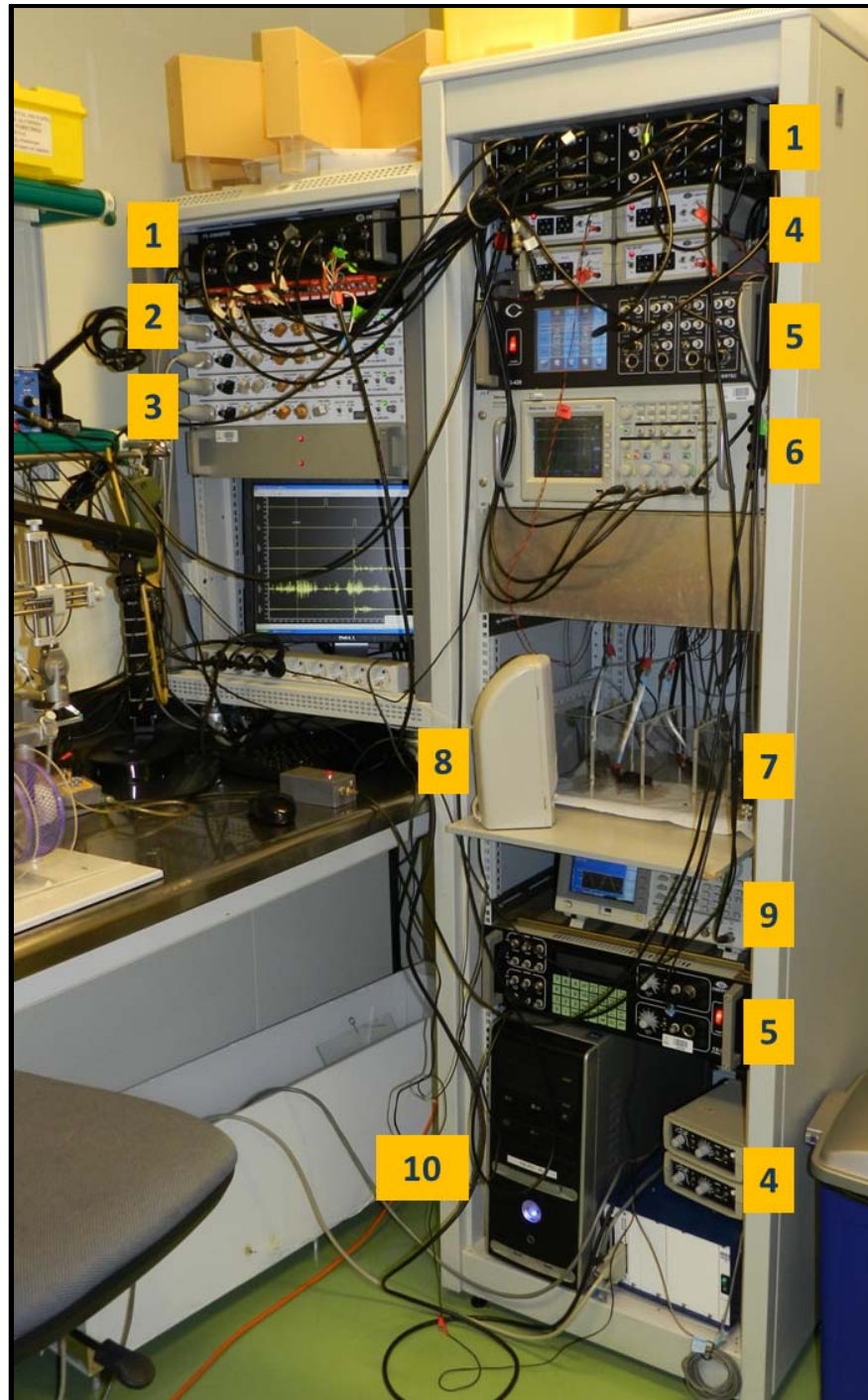


Figura 3.10. Vista general de los equipos con los cuales se realizan las pruebas de condicionamiento. La foto muestra el equipo completo de aparatos requeridos para la estimulación, registro y almacenamiento de datos durante la prueba. Distribuidos espacialmente: **1**, Convertidor de pulsos TTL. **2**, Convertidor analógico-digital CED 1401 Plus. **3**, Amplificadores diferenciales Grass P511. **4**, Unidades de aislamiento ISU 200 BIP. **5**, Estimuladores CS-220. **6**, Osciloscopio TDS 2014B. **7**, Jaulas de plástico individuales. **8**, Altavoz para emisión del CS. **9**, Generador de pulsos AFG 3022B. **10**, Ordenador equipado con el programa Signal Average.

Se consideró que un registro electromiográfico (EMG) correspondía a una respuesta condicionada cuando se cumplieron cada uno de los siguientes preceptos: a) su duración fuera superior a 10 milisegundos, b) no estuviera precedido de actividad espontánea c) comenzara 50 milisegundos tras la aplicación del CS, y d) su actividad fuera al menos 2,5 veces superior a la observada antes de la presentación del CS (Domínguez del Toro, 2004).

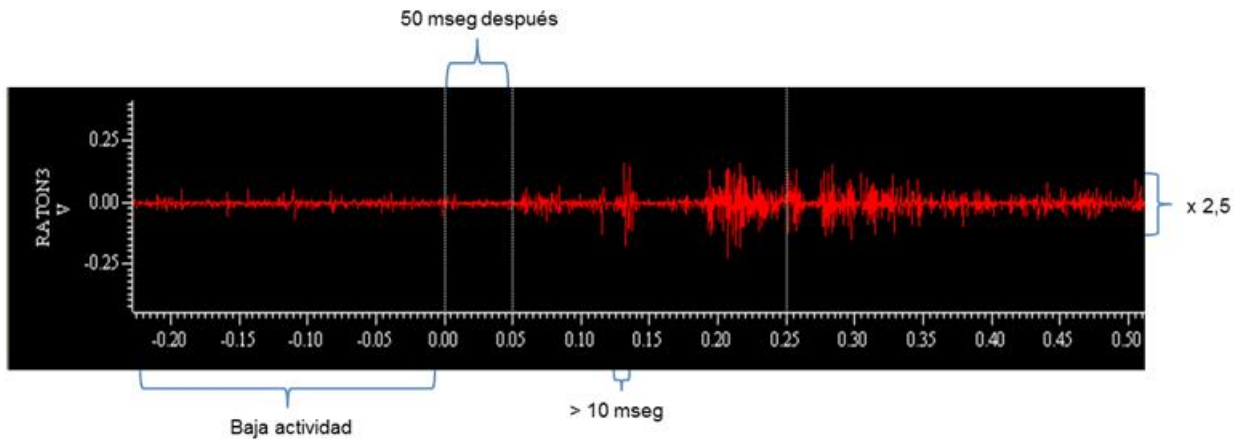


Figura 3.11. Registro electromiográfico real del músculo orbicularis oculi que recoge de forma esquemática los criterios establecidos para la consideración de respuestas condicionadas. El registro pertenece a una de las presentaciones de estímulos durante la tercera sesión de condicionamiento. En este caso, el registro reúne todos los requisitos para poder calificar la respuesta como condicionada.

El resultado final fue expresado como porcentaje de respuestas condicionadas obtenidas, representado gráficamente por sesiones con ayuda del programa de cálculo estadístico SigmaPlot 8.0 (SPSS Inc, Chicago, Illinois, EEUU) y terminado mediante el programa de dibujo CorelDraw X4 (Corel Corporation, Ottawa, Canadá). El análisis estadístico se realizó mediante un análisis de varianza (en inglés *Analysis of variance*, ANOVA) de *una vía*, realizado por PASW Statistics 18.0 para Windows (SPSS Inc, Chicago, Illinois, EEUU), con el fin de encontrar hipotéticas diferencias significativas entre grupos y sesiones.

Para estas pruebas, también se requirió del uso de un quinto grupo de ratones, animales pseudocondicionados, que sirvieron de controles para validar metodológicamente la prueba de condicionamiento clásico. A ellos se les aplicó un programa *aleatorio* de condicionamiento. De forma azarosa, al animal se le presentaron

los estímulos condicionados e incondicionados sin establecer relación temporal entre ellos. De esta forma, el animal no aprendió a asociar los estímulos.

3.3.2. Condicionamiento operante en caja de Skinner

El condicionamiento operante permite que un organismo adapte su conducta en función de las consecuencias de ésta, de forma que cuando es seguida por consecuencias favorables tiende a aparecer con más frecuencia, y cuando es seguida por consecuencias desfavorables tiende a ocurrir con menos frecuencia, pudiendo incluso desaparecer. Puede ser considerado como la formación de una relación predictiva entre un comportamiento y una recompensa o castigo. El comportamiento, en principio, puede ser espontáneo.

En este caso, la consecuencia fue un reforzador positivo (o recompensa) consistente en una porción de comida; la conducta estuvo representada por la acción de pulsado de una palanca, y fue inicialmente espontánea. Se emplearon 8 ratones por grupo.

Este tipo de condicionamiento se realizó en una caja de Skinner (*fig. 3.12*) de dimensiones 15.9 cm x 14.0 cm x 12.7 cm (MED Associates, EEUU) instalada dentro de la cámara hipobárica, en la cual se ubicó al animal durante las sesiones de condicionamiento, y que está provista de una palanca; la presión de la palanca proporciona una porción de pienso (Noyes formula P; 20 mg; Sandown Scientific, Hampton, UK), lo cual refuerza esta conducta. El vínculo acción-recompensa viene definido en una primera fase del experimento mediante la relación 1:1 y se le denomina paradigma de *razón fija 1*.

Cada sesión tuvo una duración de 20 minutos, y cada grupo experimental realizó las tareas en las condiciones de presión propias a cada uno de ellos, y detalladas con anterioridad.

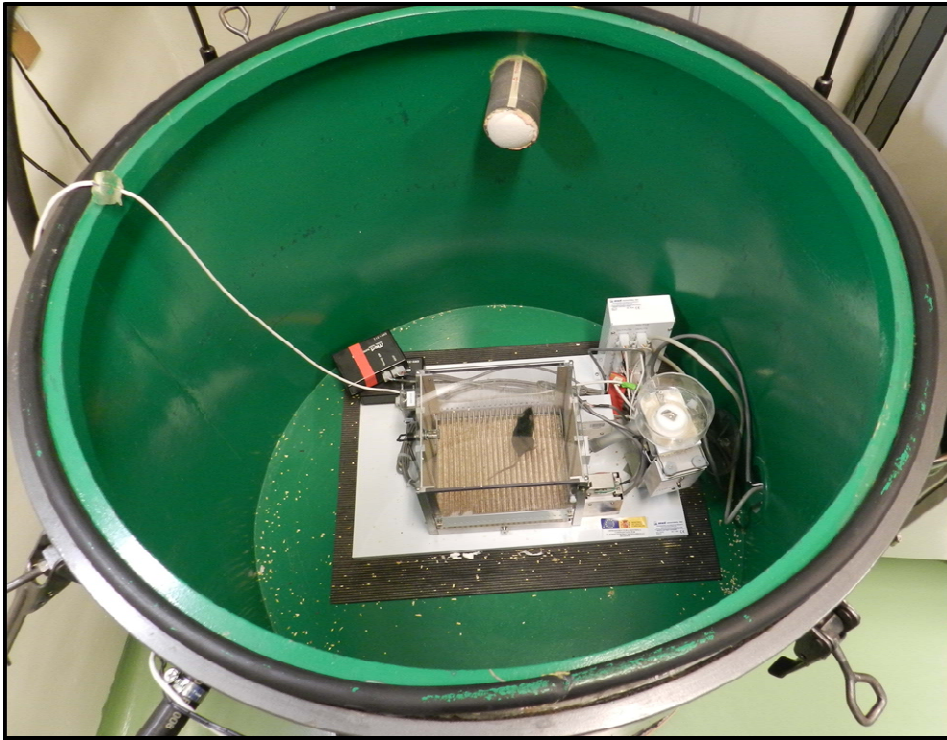


Figura 3.12. Imagen de la caja de Skinner utilizada durante las sesiones de condicionamiento dentro de la cámara hipobárica. Las acciones del ratón durante el tiempo de ejecución de la tarea quedaron registradas de forma externa a la cámara hipobárica, al estar conectada la caja de Skinner con el resto del equipo existente fuera de la cámara (ordenador y tarjeta digitalizadora) mediante la compuerta estanca intercambiabile para la entrada y salida del cableado.

El animal exploró la caja, y buscó comida con mayor asiduidad debido a un programa de restricción alimentaria aplicado que pretendió modular la motivación del animal para la adecuada realización de la tarea (Bruner, 2010).

El programa de restricción alimentaria en la dieta consistió en el racionamiento de la comida con el fin de disminuir el peso inicial de los ratones (pesados tres días antes de las pruebas) en un 15%, y así motivarlos para la búsqueda activa de comida durante el transcurso de las sesiones (Bruner, 2010). Dadas las condiciones ambientales en las que se encuentran los animales en el animalario, el mantenimiento de éstos al 85% de su peso inicial no supuso una mengua en su actividad física ni cognitiva recalable, y aseguró el cumplimiento de la normativa vigente en cuánto a protección animal (2003/65/CE y BOE 252/34367-91, 2005).

Se cuantificó el número de palancas pulsadas por cada animal durante las sesiones. Esta acción quedó registrada por el software MED-PC (MED Associates, EEUU)

mediante la conexión de los circuitos de la caja de Skinner a un ordenador. Diez sesiones fueron necesarias para alcanzar un nivel de aprendizaje asintótico para cada uno de los grupos de animales.

Con el fin de obtener un rendimiento submáximo, se aumentó la complejidad de la tarea en una fase posterior del experimento. Una vez que todos los animales (con excepción de los pertenecientes al grupo hipobárico agudo) alcanzaron un nivel, establecido como criterio de aprendizaje, igual o superior a 20 palancas pulsadas por sesión, se procedió a la realización de un paradigma de dificultad añadida.

Para tal paradigma, los animales obtuvieron una porción de comida (o pellet), tras cada acción de presionado de la palanca, únicamente cuando una luz presente en la caja estaba encendida; tras 20 segundos de luz encendida, la luz se apagaba durante 10 segundos. Durante el periodo de luz apagada, el animal debía aprender que la acción de pulsado no conllevaba la obtención de comida. Además, tal conducta conducía a un reforzador negativo, consistente en la prolongación del tiempo de luz apagada durante otros 10 segundos, que representaba el periodo de no obtención de comida. Transcurrido ese periodo, y si el animal no volvía a pulsar la palanca, la luz volvía a encenderse, y el reforzador positivo volvía a administrarse tras el pulsado de la palanca. Posteriormente, la luz volvía a apagarse, y así sucesivamente hasta completar la sesión. A este paradigma se le conoce como *aleatorio* (del inglés *random*). Se emplearon doce sesiones de 20 minutos para su realización.

Para analizar esta última fase, se dividió el número de palancas pulsadas durante el periodo de luz entre el número de palancas pulsadas durante el periodo sin luz, todo ello en relación a ese mismo índice obtenido en la primera sesión, y expresado en porcentaje. De tal forma que:

$$\text{Índice de presión de palancas} = \left(\frac{\left(\frac{\text{número de palancas pulsadas durante periodo de luz}}{\text{número de palancas pulsadas durante periodo de luz apagada}} \right)}{\left(\frac{\text{número de palancas pulsadas durante periodo de luz}}{\text{número de palancas pulsadas durante periodo de luz apagada}} \text{ en la primera sesión} \right)} \right) \times 100$$

Los resultados se representaron por sesiones con ayuda del programa SigmaPlot 8.0 (SPSS Inc, EEUU) y acabados con CorelDraw X4 (Corel Corporation, Ottawa, Canadá). El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA de *una vía*, realizado mediante el programa PASW Statistics 18.0 para Windows (SPSS Inc, Chicago, Illinois, EEUU), con el fin de hallar posibles diferencias significativas entre grupos y días, tanto para el paradigma de *razón fija 1*, como para el del programa *aleatorio*.

3.3.3. Reconocimiento de objetos

El reconocimiento de objetos es una prueba de memoria en la que al animal se le presentan simultáneamente dos objetos con características distintas en cuanto a color, formas o tamaño, que diferencia a ambos. En el presente trabajo, uno de los objetos colocados había sido previamente presentado (objeto familiar), frente al otro, que era presentado por primera vez, y que suponía una pequeña modificación del objeto familiar (objeto novedoso).

Con el fin de diseñar una tarea que se adecuara a la obtención de rendimientos submáximos, el objeto novedoso fue igual al familiar, pero introdujo un componente que le otorgó mayor complejidad en su morfología. Se utilizaron para ello combinaciones de piezas de juguetes de construcción para crear los objetos novedosos de complejidad creciente. Se utilizó una población de 16 animales por cada grupo experimental.

Se analizó la capacidad del animal para discriminar el aumento de complejidad de un objeto frente al otro. De este modo, se requirió mayor capacidad para la discriminación de ambos objetos, ya que el resto de características no se modificaron (textura, olor, tamaño relativo y forma general).



Figura 3.13. Cajas de plástico donde se realiza la tarea de reconocimiento de objetos. En su interior, sobre fondo negro, se muestran a un lado y otro, los objetos familiar y nuevo presentados en la tercera sesión, 12 horas después del inicio del experimento. Los cilindros que aparecen justo en el centro de las cajas fueron utilizados para retener al animal hasta que la cámara hipobárica fue despresurizada lo suficiente para alcanzar 5000 m de altura simulada (o una vez transcurrido el mismo tiempo, pero sin despresurización de la cámara, en los casos en los que esta condición no se requirió).

Los animales se habituaron primeramente a una caja de metacrilato de 45 x 25 x 16 cm dentro de la cámara hipobárica (*fig.* 3.13.). Al día siguiente, se iniciaron las sesiones, de 10 minutos de duración. En primer lugar se presentaron a los animales dos objetos (A1-A2) iguales (forma, color, textura) contrapuestos uno frente a otro y en cada extremo de la caja. Todos los grupos se expusieron a una presión atmosférica normal (\approx 1atm, 760 mmHg) en esta sesión. A partir de ese momento, las siguientes sesiones se realizaron en las condiciones requeridas para cada grupo (diferentes presiones atmosféricas, esto es, diferentes altitudes simuladas). Una hora después de la primera sesión, se volvió a presentar uno de los objetos anteriores (se conoce como familiar, A3) frente a uno novedoso (B1), igual al anterior, pero que incorporó una pieza añadida que incrementó su complejidad (A3-B1). 12 horas después, se presentó un objeto novedoso igual al anterior (B2) frente a uno nuevo (C1), de mayor complejidad que éste (B2-C1). Por último, 36 horas después de que se iniciase la prueba, a los animales se les presentó un objeto igual al nuevo de la sesión de las 12 horas (C2) frente a uno novedoso (D1) de mayor complejidad que este último (C2-D1). Se representa la serie sucesiva de presentaciones mediante la figura 3.14.:

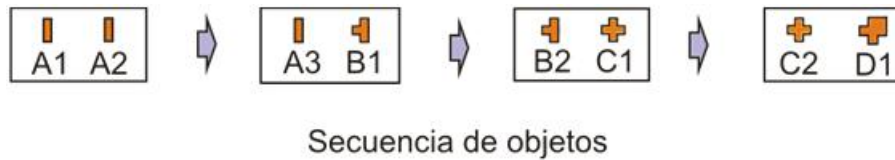


Figura 3.14. Representación esquemática de la secuencia de objetos presentados en cada sesión. Se detallan los objetos familiares, representados por A3, B2 y C2, y los objetos novedosos, representados por B1, C1 y D1. En cada sesión se alternó la posición del objeto que previamente se había presentado en la anterior sesión, con el fin de contrarrestar posibles preferencias espaciales por parte de los animales.

Se contabilizó el tiempo que el animal empleó en acercar el hocico al objeto o tocar cada objeto, indicativos de acciones explorativas. Los resultados obtenidos se representaron aplicando la fórmula del índice de exploración:

$$\text{Índice de exploración} = \left(\frac{\text{tiempo de exploración al objeto novedoso (seg)}}{\text{tiempo de exploración al objeto familiar (seg)}} \right) \times 100$$

Un índice de 100 indicó la no preferencia por ninguno de los objetos presentados. Un índice mayor que 100 indicó preferencia por el objeto nuevo.

Las gráficas y el estudio estadístico se realizaron mediante el programa SigmaPlot 8.0 (SPSS Inc, EEUU), y posteriormente las gráficas se acabaron de perfilar con CorelDraw X4 (Corel Corporation, Ottawa, Canadá). El ANOVA *de una vía* se realizó con ayuda del programa PASW Statistics 18.0 (SPSS Inc, EEUU).

3.3.4. Laberinto de 8 brazos

Los ratones, en restricción alimentaria, utilizando el mismo protocolo que en el condicionamiento operante, se situaron al 85% de su peso inicial, antes y durante la realización de la prueba. De esta forma, tuvieron tendencia a buscar comida con mayor asiduidad, dado el menor aporte calórico que recibieron. Esta condición facilitó el desarrollo de la prueba. Para ello se contó con una población de 16 ratones por cada grupo de experimentación.

El laberinto de ocho brazos es una prueba que se emplea para evaluar memoria espacial (Iwasaki y cols., 1996). Consta de un artilugio compuesto por 8 brazos radiales.

Cada brazo posee unas dimensiones de 6 cm de ancho × 25 cm de largo × 15 cm de alto, y se encuentra conectado por la base a una plataforma octogonal, que es el centro del laberinto. En el extremo final de cada brazo existe un pequeño recipiente que puede contener comida. Tres de los brazos incluyen en sus paredes indicaciones para facilitar la orientación de los ratones, que pueden coincidir, o no, con los brazos que contienen comida. Todos los brazos están conectados libremente entre sí a través del centro, por lo que se permite total libertad de movimientos al ratón.



Figura 3.15. Laberinto de 8 brazos instalado en el interior de la cámara hipobárica. En los extremos finales de cada brazo existe un orificio donde, contenido en un comedero, se puede encontrar un pellet o porción de comida. También se aprecia ligeramente una marca azul en el extremo distal del cuarto brazo (en sentido horario, comenzando desde el situado más arriba). En el centro del laberinto se colocó un cilindro (no se muestra en la imagen) donde quedaba retenido el animal hasta su liberación cuando la cámara obtenía un nivel de despresurización adecuado (o una vez transcurrió el mismo tiempo, sin despresurización de la cámara, en los casos en que esta condición no se requería).

Para el experimento, tres de los brazos contuvieron en sus recipientes un pellet de comida (Noyes formula P; 20 mg; Sandown Scientific) (siempre los mismos brazos, esto es, siempre en la misma ubicación espacial). Al inicio de cada sesión, el animal era liberado de una trampa cilíndrica ubicada en el centro del laberinto, mediante la elevación de ésta. A su finalización (hasta el momento en el que el animal visitó los 3

brazos que contenían la comida) se contabilizaron, el tiempo empleado para encontrar los 3 brazos, y la relación establecida entre el número de veces que el animal exploró los brazos con comida, frente al número de exploraciones hacia los brazos sin comida. Los valores obtenidos se normalizaron con respecto a sus valores iniciales obtenidos durante las correspondientes sesiones de entrenamiento. Se consideró que el animal encontró o exploró un brazo con comida cuando éste se introdujo hasta el extremo del brazo, donde se depositó la comida, y la ingirió. Las siguientes fórmulas representan las operaciones descritas:

$$T' = \left(\frac{\text{tiempo transcurrido hasta encontrar los 3 brazos con comida durante la sesión (seg)}}{\text{tiempo transcurrido hasta encontrar los 3 brazos con comida durante el entrenamiento (seg)}} \right)$$

$$\text{Relación} = \left(\frac{\left(\frac{\text{número de brazos con comida explorados}}{\text{número de brazos sin comida explorados}} \text{ hasta encontrar los 3 brazos con comida en la sesión} \right)}{\left(\frac{\text{número de brazos con comida explorados}}{\text{número de brazos sin comida explorados}} \text{ hasta encontrar los 3 brazos con comida en el entrenamiento} \right)} \right)$$

Las distintas sesiones se llevaron a cabo en las condiciones de presión correspondientes a cada grupo de animales y definidas en este trabajo. Tras una primera sesión de entrenamiento, se realizó una segunda a los 60 minutos de ésta, y otra posterior a las 24 horas.

El análisis estadístico y las representaciones gráficas de los resultados se realizaron con ayuda del programa SigmaPlot 8.0 (SPSS Inc, EEUU) y posteriormente las gráficas obtenidas fueron acabadas con el programa de dibujo CorelDraw X4. El test ANOVA *de una vía* se ejecutó con la ayuda del programa PASW Statistics 18.0.

3.4. ANÁLISIS DE LOS POTENCIALES EXCITATORIOS POSTSINÁPTICOS PROVOCADOS EN LA VÍA TÁLAMO-PREFRONTAL A DIFERENTES ALTURAS SIMULADAS

Para este experimento, se utilizó un único grupo de animales, cuyas condiciones de estabulación fueron similares a las definidas anteriormente para un grupo control. Se utilizaron 32 ratones para la prueba.

Durante la prueba, los animales fueron expuestos a condiciones variables de hipoxia hipobárica, en el interior de la cámara. Se procedió a la estimulación eléctrica en el núcleo mediodorsal del tálamo y el registro en la corteza prefrontal medial. Para ello, se practicaron técnicas quirúrgicas con el fin de implantar electrodos en dichas regiones y posibilitar así tanto la estimulación como el registro electrofisiológico (*fig. 3.16.*).

3.4.1. Procedimientos quirúrgicos necesarios para la estimulación y registro

Los animales se anestesiaron previamente siguiendo los mismos preceptos anteriormente detallados. Para la cirugía cerebral se requirió de un equipo estereotáxico (David Kopf Instruments, California, EE.UU.), para localizar las coordenadas necesarias donde ubicar los electrodos, y para dirigir éstos a las zonas descritas. Tras la correcta colocación y fijación de la cabeza, y con el animal anestesiado, se dirigieron los electrodos a los siguientes núcleos de interés, y cuyas coordenadas, obtenidas de un atlas estereotáxico (Paxinos y Franklin, 2001), se expresan respecto al punto de Bregma:

- Electrodo bipolar de estimulación en núcleo mediodorsal del tálamo: Localización anteroposterior = 1,9 mm posterior.
Localización lateral = 0,4 mm a la derecha de la línea media.
Profundidad = 3,4 mm.
- Electrodo monopolar de registro en la corteza prefrontal medial:
Localización anteroposterior = 1,9 mm anterior.
Localización lateral = 0,3 mm a la derecha de la línea media.
Profundidad = 3,1 mm.

Los electrodos bipolares de estimulación se fabricaron trenzando dos hilos de 50 μm de diámetro fabricados en tungsteno y aislados con teflón (Advent Research, Eynsham, Reino Unido). Antes de insertarlos, se retiró el teflón de los extremos de los electrodos ($\approx 200 \mu\text{m}$) para permitir la transmisión eléctrica. El electrodo de registro fue del mismo material que los de estimulación. Se utilizó además una conexión a tierra (AM Systemseg, Inc., Carlsborg, WA, EEUU), de plata. Ésta se soldó a un tornillo (*fig. 3.16.A*) que quedó enroscado al cráneo del animal para su mejor fijación. El resto de prácticas durante la cirugía y los cuidados postoperatorios fueron los mismos que los descritos en anteriores apartados.

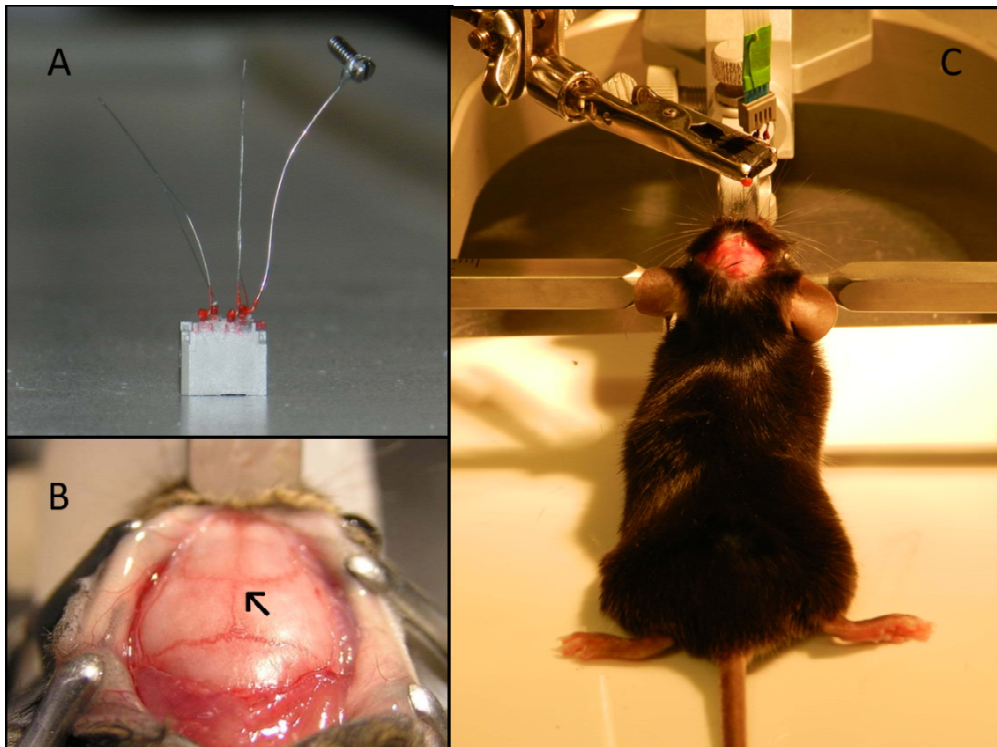


Figura 3.16. Fotografías durante la cirugía para la implantación de los electrodos de estimulación y registro. A, Electrodos fijados al conector de cuatro vías. B, Hueso del cráneo donde se visualiza (flecha) el área circundante al punto de Bregma, coordenada de referencia en los atlas anatómicos. C, Instantánea que recoge la implantación de los electrodos dentro del cerebro del animal durante el desarrollo de la cirugía, con el uso del aparato estereotáxico. Nótese como queda inmovilizada la cabeza del animal mediante unas barras de fijación regulables sobre el hueso timpánico (porción ósea del conducto auditivo externo).

3.4.2. Protocolo de estimulación y registro

Tras la recuperación postquirúrgica se ejecutó un protocolo consistente en la aplicación en el núcleo mediodorsal de dobles pulsos cuadrados de 25 microsegundos de duración cada uno y con un intervalo entre pulsos de 100 milisegundos. La intensidad aplicada representó la tercera parte de aquella que provoca la máxima amplitud (Gureviciene y cols., 2004) en los potenciales excitatorios postsinápticos (PEPS) de las neuronas de la corteza prefrontal medial. Los amplificadores y el convertidor analógico-digital fueron los mismos empleados para los registros de condicionamiento.

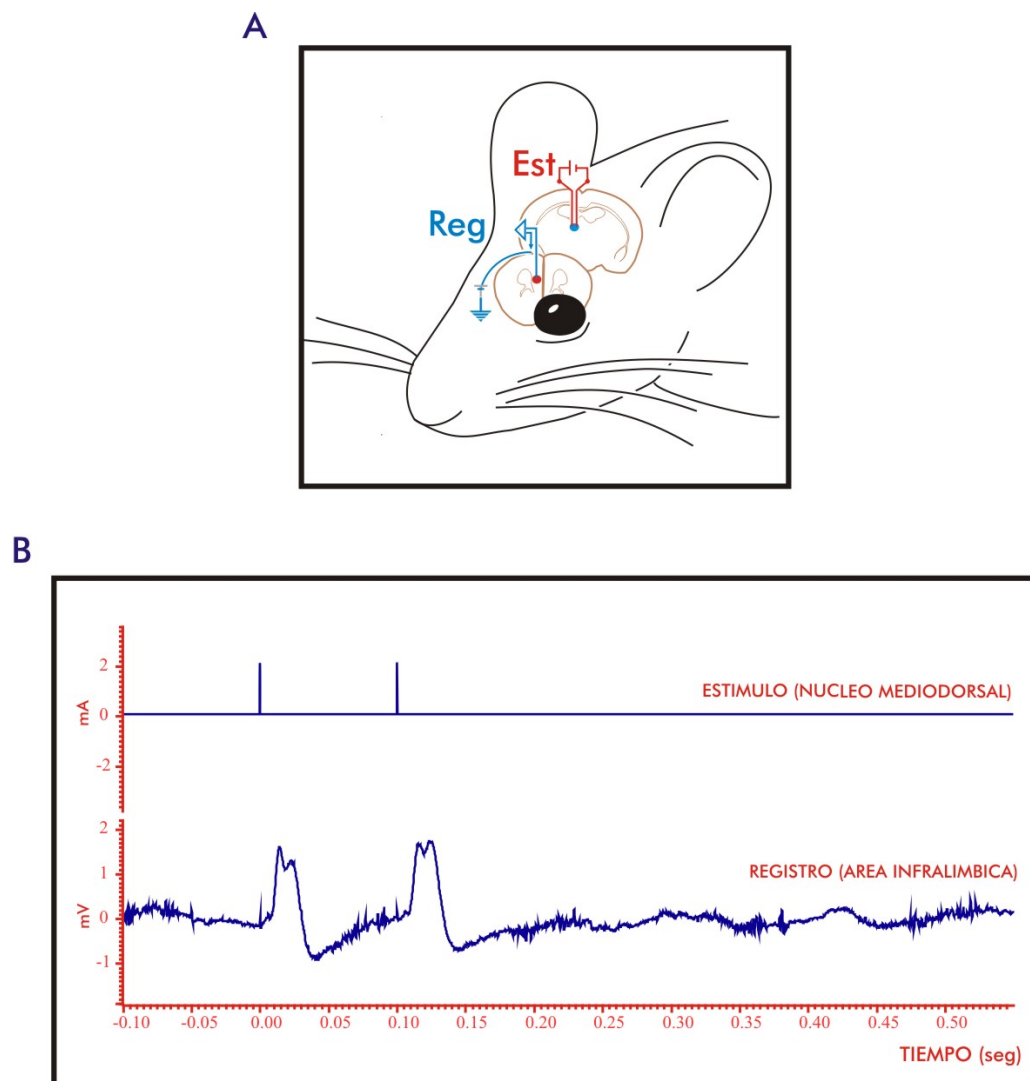


Figura 3.17. Esquema ilustrativo de la estimulación y el registro llevados a cabo durante la prueba para medir la actividad electrofisiológica a distintas alturas simuladas. **A**, Dibujo esquemático de la implantación de los electrodos de registro (Reg) y los electrodos de estimulación (Stim) en el cerebro del animal. **B**, Representación de la posición temporal de los estímulos aplicados (arriba). Registro real de un ratón durante la prueba a 5000 m de altura simulada (abajo).

Para realizar este protocolo se comenzó registrando los potenciales excitatorios postsinápticos, provocados en la corteza prefrontal medial por estimulación en el núcleo mediodorsal, a un nivel de presión atmosférica próxima a la del nivel del mar (a la presión correspondiente a 35 metros de altura \approx 760 mmHg). Posteriormente se repitió la operación a unos niveles de presión equivalente a 5000 metros (394 mmHg) y a 6500 metros (332 mmHg) de altura. Se calculó para cada animal el promedio de la amplitud y la pendiente de los potenciales postsinápticos excitatorios originados en la corteza prefrontal tras la estimulación de 20 pares de pulsos en el núcleo mediodorsal, a cada una de las mencionadas presiones (o alturas simuladas equivalentes). Las mediciones, realizadas con ayuda del programa de análisis de señales Signal (Cambridge Instruments, Reino Unido) tanto para amplitud como para pendiente, se compararon con las obtenidas a una presión de 760 mmHg.

Se procedió, a continuación, al análisis estadístico mediante un test de Student (SigmaPlot 8.0, SPSS Inc, EEUU) y a la representación gráfica del análisis de los registros a distintas alturas. Los gráficos fueron terminados con ayuda del programa CorelDraw X4 (Corel Corporation, Canadá).

3.4.3. Perfusión y procesamiento del tejido cerebral

Tras la realización del experimento se procedió a perfundir los animales usados para esta prueba para la fijación del tejido cerebral y la posterior localización de la ubicación de los electrodos mediante microscopía óptica.

Previamente a la perfusión, se administró hidrato de cloral al 4%, con una dosis correspondiente a 100 ml/kg de peso. Se procedió a la perfusión transcardiaca mediante la inyección de una solución de tampón fosfato salino (en inglés *phosphate-buffered saline*, PBS) 0,1M y pH 7,4 para lavar la sangre contenida en los tejidos, durante 2-3 minutos, y un volumen de 10-12 mililitros. Tras ello, se les perfundió una solución de paraformaldehído (PFA) al 4% en tampón fosfato (PB) 0,1 M, durante unos 7 minutos y 60-80 mililitros de volumen inyectado.

Tras la extracción de los cerebros, se les realizó una postfijación durante 4 horas con el mismo medio fijador. A continuación, se añadieron a una solución crioprotectora de sacarosa al 30% en tampón fosfato 0,1 M; cuando la densidad del tejido superó a la del medio, los cerebros se almacenaron a una temperatura de -20°C, para luego ser cortados con un criostato (Leica CM1900, Wetzlar, Alemania). Para ello, los cerebros se colocaron en posición adecuada en el criostato para la realización de cortes coronales. Se realizaron cortes seriados de 40 µm. Posteriormente a ello, se montaron en porta objetos (O. Kindler GmbH, Freiburg, Alemania) gelatinizados (Gelatina Blooms, Panreac, Barcelona) a una concentración del 0,045%, conteniendo la solución de gelatina azida sódica al 0,005% y alumbre de cromo al 0,015%. Se dejaron secar a temperatura ambiente durante aproximadamente 24 horas.

Tras ello, se aplicó el protocolo de tinción de Nissl, utilizando como colorante acidófilo el azul de toluidina, que tiene la capacidad de teñir el ADN y el ARN, entre otros componentes celulares. La metodología empleada fue la siguiente:

- Los cortes pasaron rápidamente por agua destilada para eliminar restos de tampón.
- Se sumergieron en el colorante azul de toluidina durante 5 min.
- A continuación pasaron por una fase de aclarado, sumergiendo la preparación en un baño de agua destilada durante unos segundos.
- Las muestras pasaron por sucesivas soluciones de alcohol de graduación creciente (50, 70º, 96º, 100º), para su deshidratación. Los tiempos a los que se expusieron cada uno de ellos fue de 2, 2, 1 y 1 minutos, respectivamente.
- Las muestras pasaron por dos baños consecutivos en xilol puro durante 5 minutos, para eliminar el alcohol.

Una vez finalizada la tinción, se procedió a cubrir las muestras con cubre objetos (O. Kindler GmbH, Freiburg, Alemania) usando como medio de montaje una resina sintética (DPX, Distyrene Plasticizer Xylene, Panreac, Barcelona). La utilización de cubre objetos y el DPX mejoró la visualización de las muestras en el microscopio óptico, al mismo tiempo que permitió la conservación en el tiempo del preparado. Las muestras fueron visualizadas con un microscopio óptico Leica modelo DMR (Leica Microsystemseg

GmbH, Wetzlar, Alemania) con cámara acoplada Leica DC 500 (Leica Camera AG, Solmseg, Alemania); las fotografías fueron tomadas digitalmente en modo de luz transmitida. Se utilizó el software Leica IM 500 (Leica Microsystemseg GmbH, Wetzlar, Alemania).

3.5. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA EXPOSICIÓN Y DE LA ACLIMATACIÓN A ALTURA SOBRE EL SISTEMA COLINÉRGICO

Las siguientes técnicas fueron empleadas para cuantificar la presencia de enzimas colinérgicas en el tejido cerebral de los ratones objeto de estudio; dichas enzimas a detectar fueron la colina acetiltransferasa (ChAT), y la acetil colinesterasa (AChE).

3.5.1. Perfusión y tratamiento del tejido cerebral

Tras la exposición a hipoxia hipobárica de ratones hipobáricos agudos (2 horas de exposición) y de ratones aclimatados (2 semanas de exposición), y junto con los ratones del grupo control, se procedió a su perfusión.

Como en el procedimiento aplicado en el anterior apartado, se anestesió a los animales con hidrato de cloral, en las concentraciones anteriormente descritas. Se procedió a la perfusión transcardiaca mediante la inyección, primero de una solución de PBS durante 2-3 minutos, y posteriormente PFA al 4% en PB 0.1 M durante 12-14 minutos y 100-150 mililitros de volumen inyectado.

Una vez extraídos los cerebros, se realizó la postfijación con el mismo medio fijador (4 horas) y se añadieron a la solución de sacarosa para la crioprotección del tejido. Unas 24 horas después, éstos se almacenaron a una temperatura de -20 °C. Para la identificación de cada hemisferio, se realizó una punción dirigida de forma paralela a la línea media del cerebro que abrió un pequeño orificio en el eje rostrocaudal del hemisferio izquierdo.

Los cerebros fueron colocados en posición adecuada en el criostato para la realización de cortes coronales. Los cortes obtenidos fueron de un grosor de 40 μm . A continuación éstos se sumergieron en una solución anticongelante (30% de glicerol, 30% de etilenglicol y 40% de PB 0,1 M), y se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta ser procesados.

3.5.2. Técnicas inmunohistoquímicas

Para detectar la presencia de las enzimas ChAT y AChE, sirvió de aplicación un protocolo común (Gruart y cols., 2000b) de técnicas inmunohistoquímicas con algunas variantes introducidas (López-Ramos y cols., 2007). Se basó en la utilización de anticuerpos específicos, marcados mediante un componente que tiene la propiedad de dar visibilidad a sus antígenos, en este caso ChAT y AChE, cuando los anticuerpos forman un complejo con éstos, aplicado a una muestra de tejido cerebral correctamente fijada.

Por un lado, se realizó un revelado tradicional basado en el procedimiento *avidina-biotina peroxidasa* (en inglés *avidin–biotin peroxidase complex, ABC*), con la incorporación del reactivo diaminobencidina, y por otro, se procedió a un revelado mediante inmunofluorescencia.

3.5.2.1. Procedimiento de revelado basado en el complejo avidina-biotina peroxidasa

Este método se utilizó para el marcaje y la posterior cuantificación de los marcadores seleccionados.

Se procedió por separado a la detección de ChAT y AChE. Salvo en la adición del anticuerpo primario y el anticuerpo secundario específicos para cada una de las enzimas a hallar, el protocolo para ambos fue el mismo. Para ello se empleó el procedimiento ABC (Hsu y Raine, 1981, Rodrigo 1994) que permitió detectar las enzimas inmunoreactivas.

Los cortes coronales, previamente almacenados en solución anticongelante, fueron lavados con una solución de PBS 0,1M y pH 7,4 en un agitador orbital (Rotamax 120 de Heidolph, Schwabach, Alemania) durante diez minutos. Para asegurar la correcta eliminación de los restos de anticongelante, se procedió a repetir los lavados dos veces más. A continuación, para eliminar la actividad de tipo peroxidasa que pudo existir en la sangre de los tejidos, se añadió a las secciones agua oxigenada (H₂O₂) al 0,3% en PBS, agitando la solución durante treinta minutos. De nuevo se procedió al lavado de los cortes con el fin de eliminar el H₂O₂ que pudo permanecer al final de este paso. La metodología fue la misma empleada anteriormente; tres lavados continuos en PBS de 10 minutos cada uno.

Posteriormente, se añadió el anticuerpo primario correspondiente diluido en una solución de bloqueo. Dicha solución estuvo compuesta por Triton X-100 al 0,2% (v/v) (Sigma Aldrich, St Louis, MO, EEUU) y suero bovino de albúmina (en inglés, *albumin from bovine serum*, BSA) al 3% (Sigma Aldrich, St Louis, MO, EEUU) diluidos en PBS 0,1 M. Los anticuerpos a emplear fueron el específico contra ChAT (*polyclonal antisera against Choline Acetyltransferase*, Millipore, MA, EEUU) con una dilución 1:100 en solución de bloqueo, y el específico contra AChE (en inglés, *polyclonal antisera against Acetylcholinesterase*, Novus Biologicals, CO, EEUU) en una dilución 1:400. El primero se empleó para la detección de la enzima ChAT, y el segundo para AChE. La incubación se llevó a cabo en agitación durante 48 horas a 4 °C.

Transcurrido ese tiempo, se practicó de nuevo el protocolo de lavado definido anteriormente. A continuación, se preparó el anticuerpo secundario biotinilado correspondiente para cada anticuerpo primario; para ChAT (en inglés, *biotinylated rabbit anti-goat immunoglobulin*, Invitrogen, Life Technologies, San Francisco, CA, EEUU) y para AChE (en inglés, *biotinylated goat anti-rabbit*, Vector Laboratories, CA, EEUU). Cada uno de ellos fue llevado a la solución de bloqueo en dilución de 1:250, durante 60 minutos. Se volvieron a realizar los tres lavados en PBS.

Tras ello, se incubaron en solución ABC (Vector Laboratories, CA, EEUU). Este complejo se preparó conjugando previamente durante 30 minutos una solución de

avidina con una solución de peroxidasa biotinilada. La incubación fue de 60 minutos. A continuación, se procedió al lavado en PBS.

El último paso consistió en la adición del cromógeno diaminobencidina (DAB) concentrado al 0,05 % y diluido en PB 0,1 M. A éste se le añadió, antes de su aplicación en los cortes, sulfato de níquel concentrado al 1 % y diluido 1:50 en PB 0,1 M. Esta solución ayudó al revelado del complejo formado antígeno-anticuerpo-avidina (Shu, 1988) confiriendo color negro a la reacción. La peroxidasa respondió oxidando el DAB-níquel, lo que hizo oscurecer las moléculas que presentaban el complejo, que eran al mismo tiempo las que contenían las enzimas a detectar, es decir, ChAT o AChE. Para que la reacción pudiera desencadenarse, fue necesaria la administración de H₂O₂ diluida al 1:100 en PB 0,1M, tras 15 minutos de incubación del tejido con la solución de DAB, momento en el cual ocurrió la oxidación del DAB y el níquel precipitó.

Se utilizó como medio de montaje rápido DPX (Panreac, Barcelona) para cubrir los cortes tratados y montados en portas gelatinizados, como anteriormente se describió. Tras varias horas de secado, se procedió a la visualización con microscopio óptico.

3.5.2.2. Procedimientos de inmunofluorescencia

Este método se utilizó para evidenciar hipotéticas colocalizaciones de las enzimas tratadas.

Se procedió a la detección conjunta de ambas enzimas en una misma muestra, aprovechando la distinta emisión de luz en el espectro de ondas producida por cada complejo.

Para ello, se procedió a seguir los mismos pasos que en el protocolo anteriormente descrito, incluyendo la adición conjunta de los anticuerpos primarios para ChAT y AChE, y su posterior lavado. A partir de ese momento, se añadió el anticuerpo secundario para ChAT (en inglés, *donkey anti-goat Alexa fluor 488 conjugated*) y el anticuerpo secundario para AChE (en inglés, *donkey anti-rabbit Alexa*

fluor 555 conjugated), ambos de Invitrogen Life Technologies (San Francisco, CA, EEUU), y con propiedades fluorescentes. La dilución correspondiente para ambos fue 1:200 en solución de bloqueo y la incubación se realizó durante 60 minutos. A la aplicación de anticuerpos secundarios para detectar de forma conjunta estas enzimas se le sumó el marcador fluorescente de diamidinofenilindol (DAPI), que reaccionó sobre la doble hélice de ADN, permitiendo una mejor identificación de los núcleos celulares. Se utilizó una dilución 1:1000 en solución de bloqueo, y se incubó junto con los otros dos anticuerpos secundarios. Posteriormente, se procedió al montaje de los cortes con el medio ProLong Gold (*ProLong Gold Antifade Reagent*, Invitrogen Life Technologies, San Francisco, CA, EEUU).

Las muestras fueron visualizadas por medio de un microscopio de fluorescencia con sistema de disección óptica Axio Observer.Z1 (Carl Zeiss, Inc., Jena, Alemania).

3.5.3. Captura fotográfica en microscopio óptico

Las muestras provenientes del procedimiento ABC, teñidas con diaminobencidina fueron visualizadas en un microscopio óptico Leica modelo DMR con cámara acoplada Leica DC 500 (Leica Microsystemseg GmbH, Alemania); las fotografías se tomaron digitalmente en modo de luz transmitida. Se utilizó el software Leica IM 500 (Leica Microsystemseg GmbH, Alemania). Se seleccionaron cuatro regiones para la captura fotográfica: septum medial, corteza piriforme, corteza visual y área CA1 del hipocampo.

Todas las fotos se realizaron en las mismas condiciones naturales de luz, resolución, y demás características que se describen a continuación:

- Polarizador: no procedió
- Diafragma: abierto completamente
- Tiempo de exposición: 5,1 mseg
- Ganancia: 1x
- Color: escala de grises

Se tuvo especial cuidado a la hora de mantener en el mismo plano la intersección entre los ejes dorsoventral y rostrocaudal en cada captura de imagen.

Cada una de las regiones cerebrales seleccionadas para la captura fotográfica y posterior análisis tuvieron otra serie de especificaciones:

- Para septum se utilizaron lentes de aumento 5×. Se seleccionaron los cortes comprendidos desde 1,10 mm hasta 0,62 mm anteriores al punto Bregma.
- Para la región CA1 del hipocampo, se utilizó una lente de aumento 40×. Los cortes se tomaron desde 1,34 mm hasta 2,30 mm posteriores al punto Bregma. Se tomaron fotografías tanto del hipocampo izquierdo como del derecho.
- Se emplearon lentes de aumento 10× para la corteza piriforme. Se tomaron cortes desde 1,94 mm anterior a Bregma hasta 2,30 mm posterior a Bregma. Se fotografió la corteza correspondiente al hemisferio derecho y al izquierdo.
- Para la corteza visual secundaria mediomedial, se utilizó una lente de aumento 20×. Se tomaron cortes desde 2,18 mm hasta 3,52 mm posteriores al punto Bregma. Se tomaron fotomicrografías tanto del hemisferio izquierdo como del derecho.

3.5.3.1. Cálculo del área inmunoreactiva mediante el análisis de imagen

Se analizaron un total de 260 imágenes del septum, 146 imágenes de CA1, 524 imágenes de la corteza piriforme y 161 de corteza visual secundaria. Tanto en CA1 como en las cortezas piriforme y visual se analizaron imágenes de ambos hemisferios.

Las imágenes se analizaron utilizando el software libre Image J (National Institute of Health, EEUU). En concreto, se calculó, tras definir el área de interés en cada corte incluido en las zonas acotadas previamente descritas, el área relativa marcada con DAB (inmunoteñida). Este área marcada representa el área inmunoreactiva para los anticuerpos de la enzima ChAT (anti-ChAT o α -ChAT) y de la enzima AChE (anti-AChE o α -AChE), y es directamente proporcional a la presencia de cada enzima en las muestras. La relación quedó definida así:

$$\text{Área inmunoreactiva para } \alpha\text{-ChAT} / \alpha\text{-AChE (\%)} = \left(\frac{\text{área inmunoteñida (mm}^2\text{)}}{\text{área total seleccionada (mm}^2\text{)}} \right) \times 100$$

Como criterio, se consideró marcaje inmunoreactivo en cada punto de la imagen un valor superior al prestablecido de una serie numérica en la escala de grises.

En la figura 3.18., se muestran las áreas de interés analizadas en septum, corteza piriforme, CA1 y corteza visual secundaria.

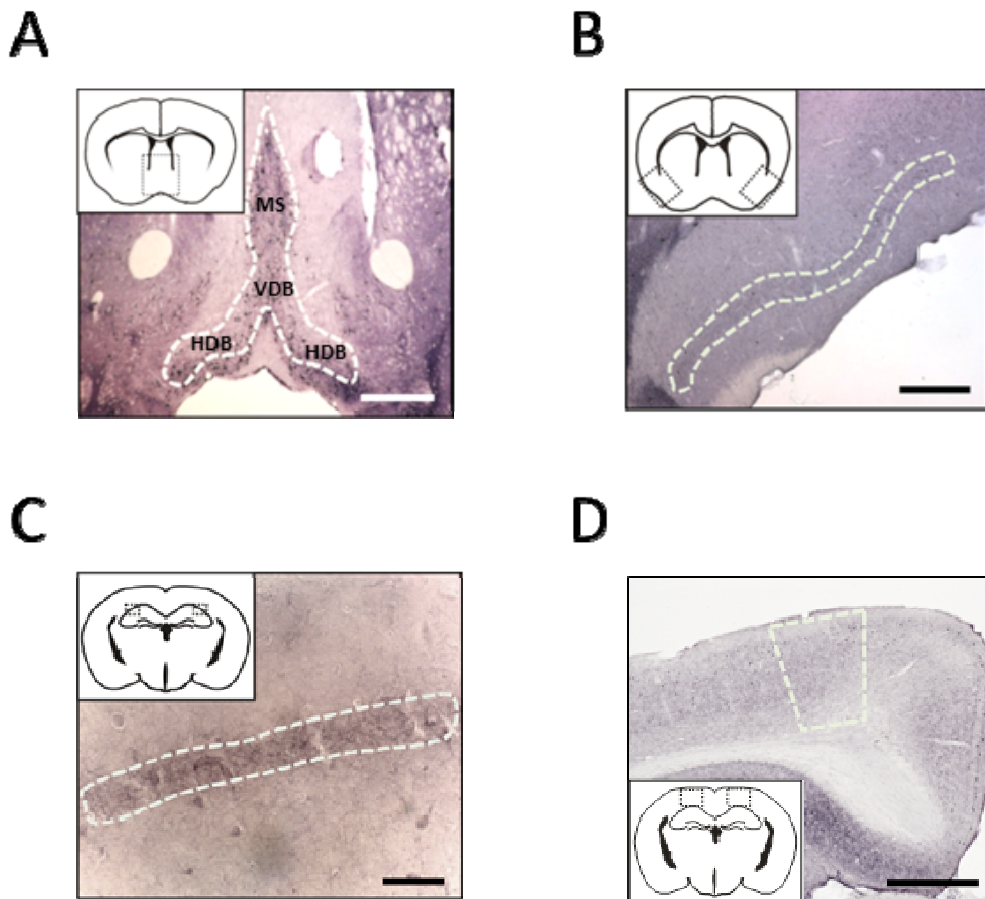


Figura 3.18. Representación de las regiones analizadas para el estudio de la presencia de los marcadores α -ChAT y α -AChE. **A**, Fotomicrografía de un corte coronal mostrando el septum medial (MS), rama vertical de la banda de Broca (VDB) y rama horizontal de la banda de Broca (HDB) acotados mediante línea discontinua. En la esquina superior izquierda se muestra de forma esquemática el corte con la zona fotografiada enmarcada. La barra de escala representa 500 μ m. Nótese en la parte superior derecha el orificio presente en el tejido, producto de la punción realizada sobre el hemisferio izquierdo para su identificación. **B**, Fotomicrografía de la corteza piriforme acotada y esquema del corte coronal donde se muestra su ubicación. La barra de escala representa 250 μ m. **C**, Fotomicrografía del área CA1 de hipocampo y esquema general de su ubicación. La barra de escala representa 50 μ m. **D**, Fotomicrografía de la corteza visual secundaria mediomedial y esquema general de su ubicación. La barra de escala representa 500 μ m. Las zonas acotadas correspondieron a las áreas de interés analizadas.

Los datos se exportaron a una hoja de cálculo (Excell, Microsoft Office 2010) y la representación gráfica se llevó a cabo mediante SigmaPlot (SPSS Inc, EEUU) y CorelDraw X4 (Corel Corporation, Ottawa, Canadá). El análisis estadístico se llevo a cabo con el programa PASW Statistics 18.0 con el fin de buscar diferencias significativas entre grupos y hemisferios, mediante el test ANOVA de *una vía* y mediante las pruebas *post hoc* de Bonferroni.

3.5.4. Captura fotográfica en microscopio de fluorescencia

Las muestras marcadas mediante inmunofluorescencia se fotografiaron con el microscopio Axio Observer.Z1 (Carl Zeiss, Inc., Alemania), equipado con el disector óptico ApoTome, que permitió generar secciones ópticas de las muestras semejantes a las obtenidas mediante microscopía confocal. Éste es un accesorio que se acopla al equipo y que cuando está activo captura imágenes de mayor contraste mediante el método de proyección de franjas, según el cual la captura de la imagen sólo se produce parcialmente en cada sección óptica. Se genera así un *grid* (franjas horizontales en la imagen donde hay captura, separadas de espacios de sombra donde no la hay). Tras la recopilación de varias secciones ópticas, en las que la localización de los espacios sombra siempre varía de posición, se compiló una imagen con un efecto de mayor contraste y nitidez. En la figura 3.19. se esquematiza el proceso de composición de la imagen:

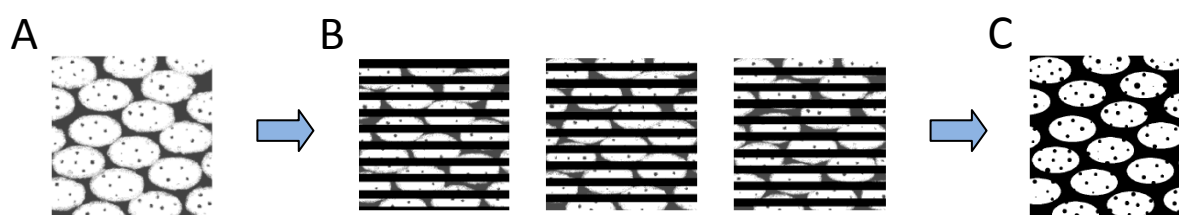


Figura 3.19. Representación esquemática del efecto de la aplicación del *grid* utilizado por el disector óptico ApoTome. A partir de la captura de la imagen inicial (A), se obtuvo una nueva imagen (C) de mayor calidad y nitidez mediante la compilación de secciones ópticas a través del *grid* (B). Los espacios de sombra donde no hay captura son en realidad mucho más estrechos y se presentan en mayor número.

Para detectar zonas de colocalización de las enzimas ChAT y AChE se seleccionaron las mismas regiones que para la cuantificación de su inmunoreactividad.

El control del microscopio Axio Observer.Z1 fue dirigido por el software de AxioVision 4.8 (Carl Zeiss, Inc.). De éste, se utilizaron las herramientas *Z-stack*, que permite la adquisición multidimensional, y *Multichannel Fluorescence*, que permite unir en una misma composición imágenes tomadas con distinta longitud de onda.

Estas dos herramientas fueron útiles para revelar regiones cerebrales con colocalización de enzimas. A continuación se detallan las diferentes longitudes de onda (λ) a la que se excitaron las enzimas marcadas con fluorescencia, y la longitud de onda correspondiente a la que emitieron cada una:

- ChAT marcado con Alexafluor 488 → máxima absorción a 495 nm de λ → máxima emisión a 519 nm de λ
- AChE marcado con Alexafluor 555 → máxima absorción a 555 nm de λ → máxima emisión a 565 nm de λ
- Marcador DAPI → máxima absorción a 358 nm de λ → máxima emisión a 461 nm de λ

A continuación se exponen los resultados del análisis realizado a los datos obtenidos tras realizar las pruebas electrofisiológicas, comportamentales e inmunohistoquímicas previamente descritas.

4.1. ESTUDIO COMPORTAMENTAL

4.1.1. Condicionamiento clásico

Los dos paradigmas de condicionamiento clásico de reflejo corneal estudiados tuvieron paralelismos en sus resultados; no obstante, se presentan de manera separada.

4.1.1.1. Condicionamiento clásico de reflejo corneal. Paradigma de traza

En general, el porcentaje de respuestas condicionadas generadas en los animales durante toda la prueba de condicionamiento se mantuvo bajo; no obstante, se obtuvieron diferencias significativas entre los distintos grupos de animales.

Partiendo de un análisis por sesiones, el porcentaje de respuestas durante la habituación fue muy pequeño (*fig.* 4.1). Aunque el tipo de respuestas obtenidas durante esta fase no puede calificarse como verdaderas respuestas condicionadas, sino como respuestas de sobresalto, como se discute más adelante, se incluye dentro del análisis de respuestas condicionadas para ofrecer una idea más completa de la evolución del porcentaje de respuestas. Este porcentaje osciló entre el 10-20% del total de eventos (presentaciones del estímulo neutro, en este caso). Así, durante la tercera sesión de habituación, el grupo control (C) experimentó un porcentaje de respuestas reflejas de 11.4 ± 1.3 ; media \pm E.E.M., $n = 16$, mientras que para el grupo de animales hipobáricos agudos (H) el porcentaje fue de 7.9 ± 1.2 ; media \pm E.E.M., $n = 15$. En el caso de los animales aclimatados, alcanzaron unos porcentajes que para el grupo que realizó las pruebas en condiciones control (AT) fue de 13.8 ± 2.9 ; media \pm E.E.M., $n = 14$, y para el grupo que las realizó en altura simulada (AH) fue de unos valores de 8.0 ± 1.0 ; media \pm E.E.M., $n \geq 8$.

Durante las sesiones de condicionamiento se originaron las auténticas respuestas condicionadas, y su porcentaje aumentó según transcurrieron las sucesivas sesiones, excepto en el grupo de hipobáricos agudos H (14.5 ± 3.8 ; media \pm E.E.M., $n = 16$), y el grupo de pseudocondicionados (*figs.* 4.1., 4.2., respectivamente), en los que apenas se apreció incremento. Los valores máximos ocurrieron, ya en la tercera sesión, cuando el porcentaje de respuestas alcanzó un nivel asintótico. El grupo control, en cambio, alcanzó el máximo de respuestas el cuarto día de condicionamiento (39.4 ± 4.9 ; media \pm E.E.M., $n = 16$).

Con el análisis de medidas repetidas aplicado a los datos correspondientes a las cuatro sesiones de condicionamiento, y con el estadístico ANOVA de una vía, se detectaron diferencias significativas entre los distintos grupos [$F_{(3,55)} = 9.1$; $P < 0.001$]. El análisis indicó diferencias significativas también entre las distintas sesiones [$F_{(3,165)} = 29.0$; $P < 0.001$] y en la interacción entre los diversos grupos por sesión [$F_{(9, 165)} = 2.9$; $P < 0.01$].

Examinando los datos para el día en el cual se experimentó el máximo de respuestas condicionadas en la mayor parte de grupos (tercera sesión de condicionamiento), el grupo control presentó un porcentaje de 32.1 ± 4.8 (media \pm E.E.M., $n = 16$). Para el grupo de aclimatados y condicionados a 5000 metros de altura simulada (AH), el porcentaje de respuestas alcanzó el 27.4 ± 5.5 (media \pm E.E.M., $n = 14$). El otro grupo de aclimatados a altura, condicionado a una presión equivalente al nivel del mar (≈ 760 mmHg) (AT), mostró unos valores de 45.7 ± 8.1 (media \pm E.E.M., $n = 14$). El porcentaje de respuestas fue mucho menor en el caso del grupo H, grupo no aclimatado a altura y condicionado a 5000 metros de altura simulada (394 mmHg de presión), que llegó al 4.7 ± 1.1 (media \pm E.E.M., $n = 15$) de respuestas condicionadas. El grupo control alcanzó valores significativamente más altos que este último grupo durante la tercera y cuarta sesión de condicionamiento ($P < 0,01$). El grupo AH mostró diferencias significativas respecto al grupo H únicamente en la tercera sesión ($P < 0,05$). En cambio, el grupo AT alcanzó diferencias significativas con el mencionado grupo en todas las sesiones de condicionamiento ($P < 0,01$).

En lo referido a las distintas sesiones de extinción, tanto el grupo control como el grupo de aclimatados AT alcanzaron valores relativamente altos de respuestas

Resultados

condicionadas en la primera y segunda sesión (*fig. 4.1*). En la tercera sesión, todos los grupos experimentaron un notable descenso en el porcentaje de respuestas. Aplicando el análisis de medidas repetidas durante todo el proceso de extinción, se evidenciaron diferencias significativas entre grupos [$F_{(3,55)} = 6.89$; $P < 0.01$], entre sesiones [$F_{(2,110)} = 11.4$; $P = 0.001$], pero no así para la interacción entre grupos por sesiones [$F_{(6,110)} = 1.34$; $P = 2.44$].

En la primera sesión de extinción se registraron unos valores de 23.1 ± 3.3 (media \pm E.E.M., $n = 16$) para el grupo control y de 25.9 ± 6.6 (media \pm E.E.M., $n = 14$) para el grupo AT. En el grupo de aclimatados y condicionados en altura AH, el porcentaje de respuestas en esta sesión fue de 14.2 ± 2.3 (media \pm E.E.M., $n = 14$). El grupo de no aclimatados (H) no sobrepasó en ninguna sesión el 10% de respuestas condicionadas. Las diferencias significativas entre grupos se manifestaron en la primera y segunda sesión. En la tercera sesión, debido al descenso pronunciado en el porcentaje de respuestas en todos los grupos, los valores tendieron a igualarse. Así, el grupo control marcó diferencias significativas ($P < 0,05$) con el grupo H, mientras el grupo AT evidenció mayores diferencias ($P < 0,01$) con ese mismo grupo.

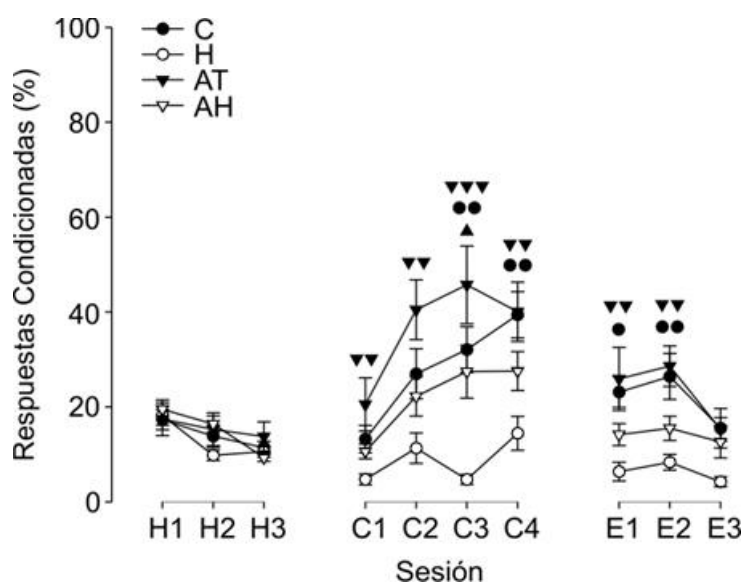


Figura 4.1. Representación del porcentaje de respuestas palpebrales condicionadas alcanzado por los grupos experimentales durante el paradigma de condicionamiento clásico de tipo traza. Se muestran los resultados obtenidos por grupo control (C), hipobárico agudo (H), aclimatado a hipobaría y condicionado en condiciones de presión normal (760 mmHg) (AT), y aclimatado y condicionado en condiciones de hipobaría (AH) durante las diez sesiones del protocolo analizadas. Las condiciones de hipobaría se caracterizaron por una presión de 394 mmHg, equivalente a 5000 metros de altura simulada. La exposición a hipobaría se llevó a cabo durante las sesiones de condicionamiento y extinción en los grupos H y AH. H1-H3 representan los datos obtenidos en las sesiones de habituación, C1-C4 los datos en las sesiones de condicionamiento, y E1-E3 los datos recogidos a lo largo de la extinción. Los valores vienen indicados como promedios de respuestas condicionadas \pm el error estándar de la media, expresados como porcentajes ($n \geq 14$). Diferencias significativas entre los grupos AT y H: $\blacktriangledown\blacktriangledown$ $P < 0.01$, $\blacktriangledown\blacktriangledown\blacktriangledown$ $P < 0.001$; entre los grupos C y H: \bullet $P < 0.05$, $\bullet\bullet$ $P < 0.01$; y entre los grupos AH y H: \blacktriangle $P < 0.05$. ANOVA de una vía; prueba *post hoc*: Test de Bonferroni.

En la figura 4.1., se puede apreciar la tendencia de las curvas de aprendizaje de los animales aclimatados y los hipobáricos agudos en relación al comportamiento del grupo control. La aclimatación a altura impidió la afección del aprendizaje durante el condicionamiento clásico de reflejo palpebral, como se comprueba al comparar los resultados de los grupos AH y H. Este tipo de aclimatación favoreció que el grupo AT superara en número de respuestas palpebrales condicionadas al grupo control, cuando ambos grupos se condicionaron a una presión normal (≈ 760 mmHg).

El porcentaje de respuestas condicionadas durante todo el experimento por el grupo de ratones pseudocondicionados (fig. 4.2.) no mostró una clara tendencia; el análisis estadístico tampoco proporcionó diferencias significativas entre ninguna de las

sesiones de la habituación, el condicionamiento, o la extinción [$F_{(9,63)} = 1.22$; $P = 0.32$]. En comparación con el grupo control, en el que el aumento de porcentaje de respuestas condicionadas siguió una clara tendencia alcista, el grupo de animales pseudocondicionados no reflejó tal tendencia.

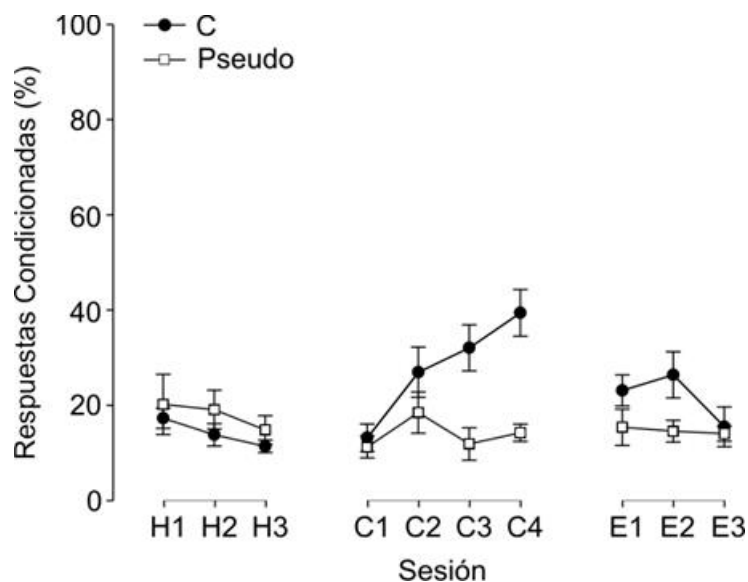


Figura 4.2. Representación del porcentaje de respuestas palpebrales condicionadas alcanzado por el grupo pseudocondicionado durante el paradigma de condicionamiento clásico de tipo traza. Se muestran los resultados del grupo control (C) y los ratones del grupo pseudocondicionados (Pseudo). H1-H3 representan las sesiones de habituación, C1-C4 las sesiones de condicionamiento, y E1-E3 las sesiones de extinción. Los valores vienen indicados como promedios de respuestas condicionadas \pm el error estándar de la media, expresados como porcentajes ($n \geq 8$).

4.1.1.2. Condicionamiento clásico de reflejo corneal. Paradigma de demora

Esta prueba presentó diferencias en los resultados con respecto al condicionamiento de tipo traza. Desde el comienzo de la habituación, se observó un considerable incremento de respuestas respecto al condicionamiento de traza.

A lo largo de las sesiones de habituación, se produjo una tendencia descendente en la presencia de respuestas, salvo en el grupo de aclimatados AT. Así, durante la tercera sesión, el grupo control (C) obtuvo un porcentaje de respuestas de 37.3 ± 6.1 (media \pm E.E.M., $n = 8$). El grupo de aclimatados a altura, condicionados a una presión equivalente a la del nivel del mar (≈ 760 mmHg) (AT), alcanzó un porcentaje de $37.9 \pm$

5.8 (media \pm E.E.M., $n = 9$). En el otro grupo de aclimatados, condicionados a 5000 metros de altura simulada, AH, el porcentaje de respuestas alcanzó el 29.0 ± 5.2 (media \pm E.E.M., $n = 8$).

En las sesiones de condicionamiento, todos los grupos, con la excepción de los animales pseudocondicionados (*fig. 4.4.*), fueron aumentando el porcentaje de respuestas palpebrales condicionadas a medida que avanzaron las sesiones, hasta encontrar los máximos en la tercera sesión (grupos C y H) o en la cuarta sesión (grupos AT y AH) (*fig. 4.3.*). El análisis de medidas repetidas, utilizado para el tratamiento de datos en las sesiones de condicionamiento, estableció diferencias significativas para los distintos grupos [$F_{(3,27)} = 7.9$; $P < 0.01$]. El análisis marcó además diferencias entre las distintas sesiones [$F_{(3,81)} = 18.6$; $P < 0.001$] pero no para la interacción entre grupos y sesiones [$F_{(9, 81)} = 0.9$; $P = 0.4$].

En el grupo C, el porcentaje en la tercera sesión fue 50.1 ± 7.4 (media \pm E.E.M., $n = 8$) de respuestas condicionadas. En los dos grupos de animales aclimatados, cuyos máximos porcentajes de respuesta se encontraron en la cuarta sesión de condicionamiento, se registraron unos porcentajes para ese día de 66.7 ± 5 (media \pm E.E.M., $n = 9$) en el caso del grupo AT, y de 56.6 ± 8.1 (media \pm E.E.M., $n = 8$) en el del AH. El grupo de aclimatados a altura y condicionados a 760 mmHg de presión (AT) marcó diferencias con el grupo de hipobáricos agudos (H) desde la primera sesión de condicionamiento ($P < 0,05$), mientras que también las estableció con el otro grupo de aclimatados (AH) durante el primer día de condicionamiento ($P < 0,05$). Además, este último grupo también mostró diferencias estadísticamente significativas con el grupo H en la sesión última de condicionamiento ($P < 0,05$).

La extinción supuso una disminución en el porcentaje de respuestas palpebrales desde la primera a la tercera sesión en todos los grupos. De esta forma, los porcentajes descendieron en la primera sesión de extinción al 32.3 ± 6.2 (media \pm E.E.M., $n = 8$) en el grupo control, al 46.3 ± 7.6 (media \pm E.E.M., $n = 9$) en el grupo AT, al 24.2 ± 6.2 (media \pm E.E.M., $n = 8$) en el grupo AH y al 12.4 ± 7.8 (media \pm E.E.M., $n = 7$) en el grupo H. Tras el estudio estadístico, éste confirmó diferencias entre grupos [$F_{(3,27)} = 5.0$; $P < 0.01$], entre sesiones [$F_{(2,54)} = 15.4$; $P < 0.001$], pero no en la interacción entre grupos por sesión [$F_{(6,$

Resultados

$s_4 = 2.9; P = 0.6$]. Solo el grupo AT presentó diferencias significativas con el grupo H ($P < 0,05$). El grupo AT, además, alcanzó diferencias en la última sesión de extinción con el otro grupo de aclimatados (AH) ($P < 0,05$).

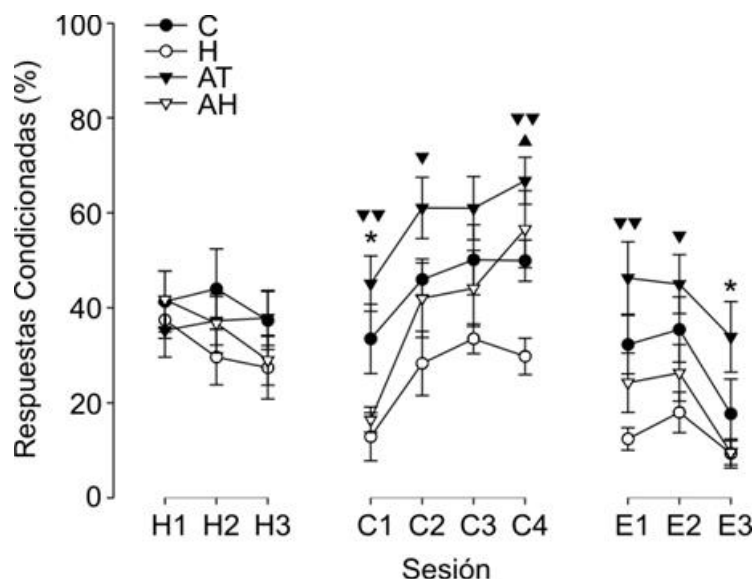


Figura 4.3. Representación del porcentaje de respuestas palpebrales condicionadas alcanzado por los grupos experimentales durante el paradigma de condicionamiento clásico de tipo demora. Se muestran los resultados del grupo control (C), hipobárico agudo (H), aclimatado a hipobaría y condicionado en condiciones de presión normal (760 mmHg) (AT), y aclimatado y condicionado en condiciones de hipobaría (AH). Las condiciones de hipobaría se caracterizaron por una presión de 394 mmHg, equivalente a 5000 metros de altura simulada. La exposición a hipobaría se llevó a cabo durante las sesiones de condicionamiento y extinción en los grupos H y AH. H1-H3 representan los datos obtenidos en las sesiones de habituación, C1-C4 los datos en las sesiones de condicionamiento, y E1-E3 los datos recogidos a lo largo de la extinción. Los valores vienen indicados como promedios de respuestas condicionadas \pm el error estándar de la media, expresados como porcentajes ($n \geq 7$). Diferencias significativas entre los grupos AT y H: $\blacktriangledown P < 0.05$, $\blacktriangledown\blacktriangledown P < 0.01$; entre los grupos AT y AH: $* P < 0.05$; y entre los grupos AH y H: $\blacktriangle P < 0.05$. ANOVA de *una vía*; prueba *post hoc*: Test de Bonferroni.

Como se aprecia en la figura 4.3., durante las sesiones de condicionamiento todos los grupos representados aumentaron gradualmente el porcentaje de respuestas condicionadas; posteriormente en la extinción se invirtió esta tendencia hasta encontrar unos valores menores a los obtenidos en la habituación. No sucedió así en los ratones pseudocondicionados, cuyo porcentaje no aumentó a lo largo de las sesiones de condicionamiento; el análisis estadístico tampoco proporcionó diferencias significativas

entre ninguna de las sesiones. En la figura 4.4., se representan en comparación con el grupo de animales control.

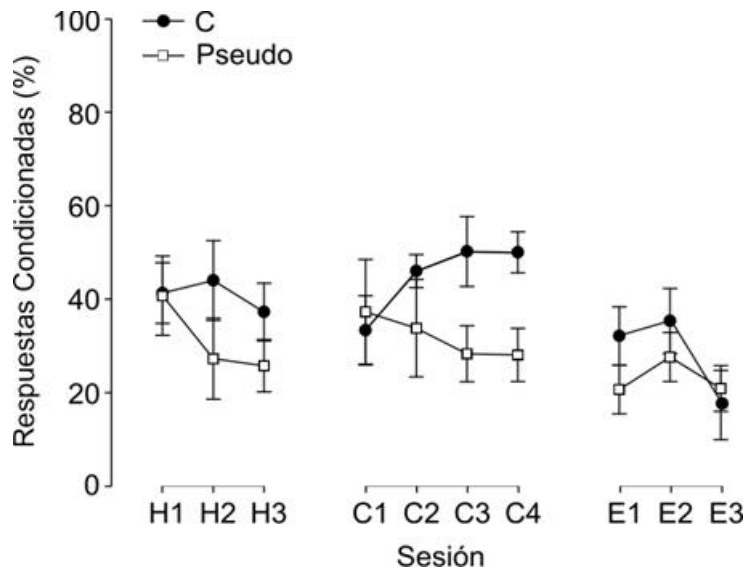


Figura 4.4. Representación del porcentaje de respuestas palpebrales condicionadas alcanzado por el grupo pseudocondicionado durante el paradigma de condicionamiento clásico de tipo demora. Se muestran los resultados del grupo control (C) y los ratones del grupo pseudocondicionados (Pseudo). H1-H3 representan los datos obtenidos en las sesiones de habituación, C1-C4 los datos en las sesiones de condicionamiento, y E1-E3 los datos recogidos a lo largo de la extinción. Los valores vienen indicados como promedios de respuestas condicionadas \pm el error estándar de la media, expresados como porcentajes ($n \geq 8$).

4.1.2. Condicionamiento operante en caja de Skinner

4.1.2.1. Programa de razón fija 1

En el caso del programa de razón fija 1, se analizaron los resultados correspondientes a cada uno de las diez sesiones consecutivas. No se representan los resultados de las cuatro primeras sesiones, dados los insignificantes incrementos en el número de palancas pulsadas por parte de los animales para la obtención de comida. A partir de la sexta sesión, se produjo un notable y progresivo incremento del número de palancas presionadas (*fig.* 4.5.). El análisis de medidas repetidas estableció sobre el conjunto de datos diferencias significativas entre el grupo H y el resto de grupos (C, AT y

Resultados

AH). Éstas se produjeron durante la sexta [$F_{(3,30)} = 3.1; P < 0.05$], la séptima [$F_{(3,30)} = 3.8; P < 0.05$], la octava [$F_{(3,29)} = 6.39; P < 0.01$], la novena [$F_{(3,29)} = 9.7; P < 0.001$] y la décima sesión de condicionamiento [$F_{(3,19)} = 6.2; P < 0.01$].

Durante la quinta sesión de condicionamiento, el promedio de palancas presionadas por los animales de los grupos control (C), aclimatados AT y AH, e hipobárico agudo (H) fue de 8.0 ± 2.6 , 5.3 ± 2.0 , 7.2 ± 2.4 y 0.0 ± 0.0 (media \pm E.E.M., $n \geq 7$), respectivamente. Según avanzaron las sesiones, se apreció un aumento progresivo en el número de palancas presionadas. El máximo de ellos se obtuvo en la novena sesión de condicionamiento en el caso de los animales aclimatados a altura. Entre estos, el grupo testado a una presión normal (≈ 760 mmHg) (AT), alcanzó 35.0 ± 4.9 (media \pm E.E.M., $n = 8$), mientras el grupo testado a una presión de 5000 metros de altitud simulada (≈ 360 mmHg) (AH), se situó en 32.4 ± 6.2 (media \pm E.E.M., $n = 8$). El grupo control y el de hipobáricos agudos (H) por su parte, alcanzaron sus máximos en el décimo día de sesión, llegando a 26.3 ± 17.5 y 2.9 ± 1.1 palancas presionadas (media \pm E.E.M., $n = 7$), respectivamente. Desde la sexta sesión, el grupo de ratones aclimatados a altura y condicionados a presión normal (≈ 760 mmHg) (AT), marcó diferencias significativas respecto al grupo de hipobáricos H ($P < 0,05$). El otro grupo de aclimatados (AH), y el grupo control, obtuvieron diferencias significativas a partir del séptimo día ($P < 0,05$).

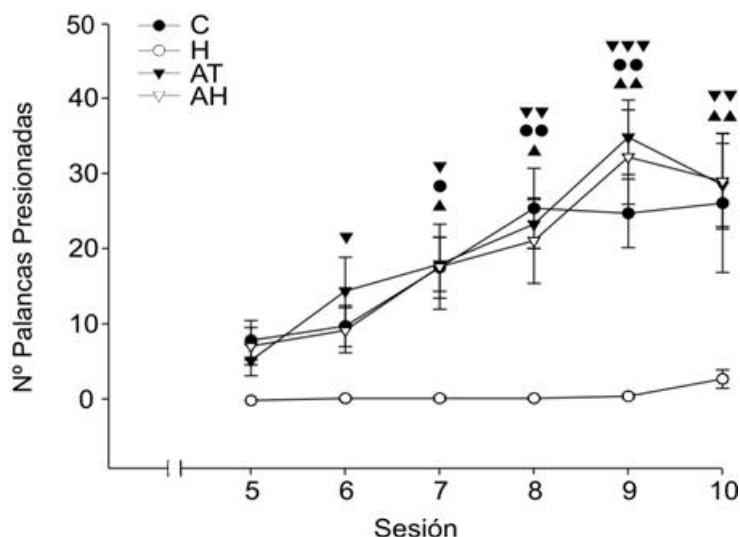


Figura 4.5. Condicionamiento operante en caja de Skinner durante el programa de razón fija 1. Representación del número de palancas presionadas desde la quinta hasta la décima y última sesión. Se encuentran graficados los promedios de los valores de los grupos control (C), hipobárico agudo (H), aclimatado a altura y condicionado a ≈ 760 mmHg (AT), y aclimatado a a altura y condicionado a 394 mmHg de presión (AH). Los valores vienen indicados como promedios de palancas pulsadas \pm el error estándar de la media ($n \geq 7$). Diferencias significativas entre los grupos AT y H: ▼ $P < 0.05$, ▼▼ $P < 0.01$, ▼▼▼ $P < 0.001$; entre los grupos C y H: ● $P < 0.05$, ●● $P < 0.01$; y entre los grupos AH y H: ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$. ANOVA de una vía; prueba *post hoc*: Test de Bonferroni.

Como muestra la figura 4.5., todos los grupos, con la excepción de los no aclimatados y condicionados a 5000 metros de altura simulada (grupo H), aumentaron de forma lineal el número de palancas presionadas durante la tarea de condicionamiento operante. No se apreciaron entre ellos diferencias en sus promedios ni en las tendencias que describieron a lo largo de las sesiones. Sí se apreciaron, en cambio, diferencias significativas entre cada uno de ellos con el grupo H, debido a que este último grupo no consiguió aprender la tarea de condicionamiento operante; el último día de sesión este grupo alcanzó, en promedio, un número de 3 palancas presionadas durante los 20 minutos de tarea, una cantidad que no se consideró indicativa de aprendizaje asociativo entre la acción de presionado de la palanca y el reforzador aplicado.

4.1.2.2. Programa aleatorio

En la siguiente prueba en caja de Skinner se utilizó el programa aleatorio, en el cual la complejidad de la tarea aumentó con el fin de obtener rendimientos submáximos

Resultados

en los ratones. Para su ejecución, esta nueva tarea exigió del conocimiento previo de la prueba anterior. Para ello, los ratones del grupo H, que inicialmente no aprendieron a asociar los estímulos (*fig. 4.5.*), fueron de nuevo entrenados en razón fija 1 a una presión normal hasta que aprendieron la asociación (aproximadamente cuando presionaron la palanca al menos 20 veces por sesión). Posteriormente, se procedió a la ejecución del programa aleatorio.

Como se aprecia en la figura 4.6., se observó una clara tendencia ascendente del número de palancas pulsadas por el grupo AT a lo largo de las sesiones. En el otro grupo de aclimatados (AH), la evolución ascendente no estuvo tan definida; solo en los dos últimos días de condicionamiento operante se obtuvieron valores superiores, en ningún caso con diferencias significativas. El grupo control presentó diferencias con el grupo de hipobáricos agudos en cuanto a la tendencia, ya que ninguno se alejó de los valores registrados durante el primer día de condicionamiento. De ninguno de ellos se pudo decir, por tanto, que hubieran aprendido a ejecutar la tarea satisfactoriamente.

Los resultados de la nueva tarea reportaron mayores diferencias intergrupales. De esta forma, los ratones aclimatados a altura y condicionados a presión normal (≈ 760 mmHg, AT) destacaron en conjunto sobre el resto de grupos a partir de la séptima sesión. Tras el análisis de medidas repetidas, se constataron diferencias entre el grupo AT y el resto de los grupos para la séptima [$F_{(3,28)} = 4.6; P < 0.05$], novena [$F_{(3,28)} = 6.8; P < 0.01$], onceava [$F_{(3,28)} = 4.7; P < 0.01$] y duodécima sesiones [$F_{(3,28)} = 6.7; P < 0.01$].

La evolución de los valores durante todo el experimento (obtenidos al dividir el número de palancas presionadas con luz encendida entre el número de palancas presionadas con luz apagada, y a su vez normalizado sobre el valor obtenido durante la primera sesión) fue poco definitoria, con la excepción del grupo AT, que experimentó un aumento muy apreciable en progresión con las sesiones. Así, el día cuarto de sesión este grupo presentó como índice 183.4 ± 68.4 (media \pm E.E.M., $n = 7$), mientras el duodécimo (último) día fue de 478.7 ± 136.3 (media \pm E.E.M., $n = 7$). No hubo una clara evolución positiva en los índices del resto de grupos; así, el grupo control obtuvo 110.4 ± 36.7 en la cuarta sesión y 86.5 ± 18.12 en la duodécima (media \pm E.E.M., $n = 7$), y el grupo H un valor de 112.3 ± 48.8 y 103.3 ± 10.3 en la cuarta y duodécima sesiones (media \pm E.E.M.,

n =7), respectivamente. El otro grupo de aclimatados a altura (AH), sí registró cierta tendencia positiva, al pasar en la cuarta jornada de 93.3 ± 8.6 a 220.8 ± 23.1 en la duodécima (media \pm E.E.M., n =7); no obstante, éste grupo no se diferenció significativamente del resto.

Solo el grupo AT estableció diferencias significativas. Éstas fueron con respecto a los grupos control y H. Tanto con el primero como con el segundo marcó diferencias los días nueve, once y doce de sesión ($P < 0,05$); para el día séptimo también se produjeron diferencias con el grupo control ($P < 0,01$).

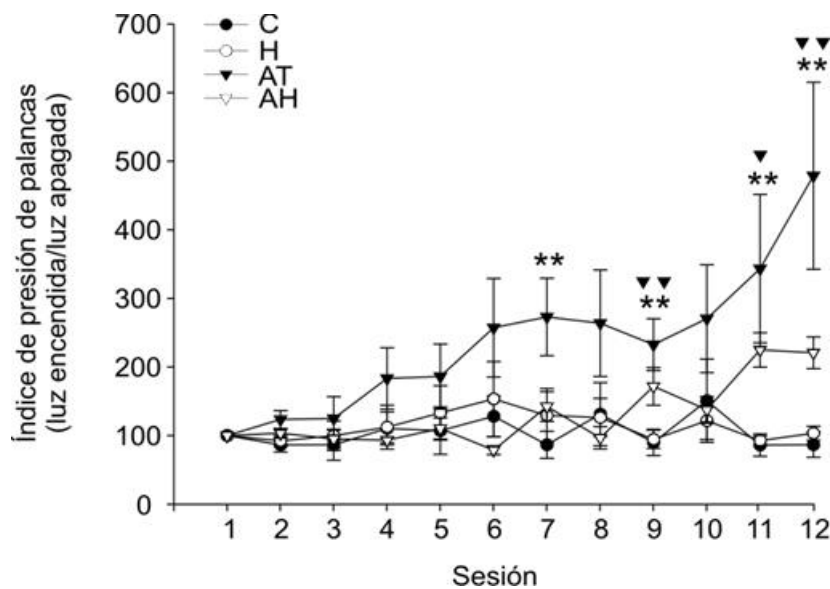


Figura 4.6. Condicionamiento operante en caja de Skinner durante el programa aleatorio. Representación del cociente entre el número de palancas presionadas durante el periodo de luz y el número de palancas presionadas durante el periodo sin luz, normalizados con respecto al mismo cociente obtenido durante la primera sesión. Durante el periodo sin luz, los pellets de comida no fueron dispensados tras el pulsado de la palanca, y este periodo se incrementó en 10 segundos cada vez que el animal la pulsaba. Los valores de los grupos C, H, AT y AH vienen indicados como promedios de respuestas condicionadas \pm el error estándar de la media, expresados como porcentajes (n \geq 7). Diferencias significativas entre los grupos AT y H: ▼ $P < 0,05$, ▼▼ $P < 0,01$; y entre los grupos AT y C: ** $P < 0,01$. ANOVA de una vía; prueba *post hoc*: Test de Bonferroni.

4.1.3. Reconocimiento de objetos

En general, los resultados de esta prueba de memoria visual indicaron la existencia de diferencias en el largo plazo; al comparar los índices de exploración entre la sesión primera y las sesiones realizadas 12 y 36 horas después, se obtuvieron diferencias significativas en los animales aclimatados, como más adelante se detalla.

Al observar la figura 4.7., se comprueba cómo los resultados mostraron en mayor o menor medida preferencia por el objeto novedoso, y que esta mayor preferencia dependió de la sesión y de cada grupo experimental. Así, a medida que sucedían las sesiones, los grupos mostraron un aumento en la preferencia por el objeto nuevo. En la mayoría de casos, aunque los animales mostraran mayor índice de exploración por el objeto nuevo, esas diferencias no pudieron ser validadas estadísticamente. El grupo de animales AH invirtió esta tendencia en la sesión de las 12 horas, como a continuación pasa a describirse.

Los valores del índice de exploración en la primera sesión de presentaciones (0 horas) para los grupos C, H, AT y AH, fueron de 106.7 ± 6.3 , 116.6 ± 7.0 , 101.2 ± 3.8 y 109.6 ± 7.6 (media \pm E.E.M., $n \geq 16$), respectivamente. Estos datos mostraron una ligera tendencia hacia una mayor exploración de los objetos orientados hacia uno de los lados, aunque no se pudo calificar de preferencia debido a que las diferencias fueron no significativas e, individuo por individuo, no se apreciaron tendencias determinantes.

La última sesión del experimento (realizada a las 36 horas) registró los valores más altos en el índice de exploración. Todos los grupos superaron los valores indicados para la primera sesión. Así, el grupo control obtuvo un índice de 125.5 ± 7.6 , mientras que el grupo de animales hipobáricos agudos obtuvo un valor de 123.8 ± 11.4 (media \pm E.E.M., $n \geq 16$). Los grupos de animales aclimatados AT y AH alcanzaron índices de 137.1 ± 6.1 y 123.0 ± 4.8 (media \pm E.E.M., $n \geq 16$), respectivamente. Resaltar que el máximo valor para el índice (proporcional a una mayor preferencia a explorar objetos novedosos) se dió en el grupo de aclimatados experimentados a presión normal (AT).

Tras hacer una comparación entre sesiones, se detectaron diferencias entre éstas. Sólo el grupo de aclimatados que realizó la prueba a presión normal (≈ 760 mmHg,

AT) presentó diferencias significativas tras comparar sus valores iniciales con respecto a la sesión correspondiente a las 36 horas [$F_{(3,75)} = 5.16$; $P < 0.01$]; prueba *post hoc*: Test de Dunnett.

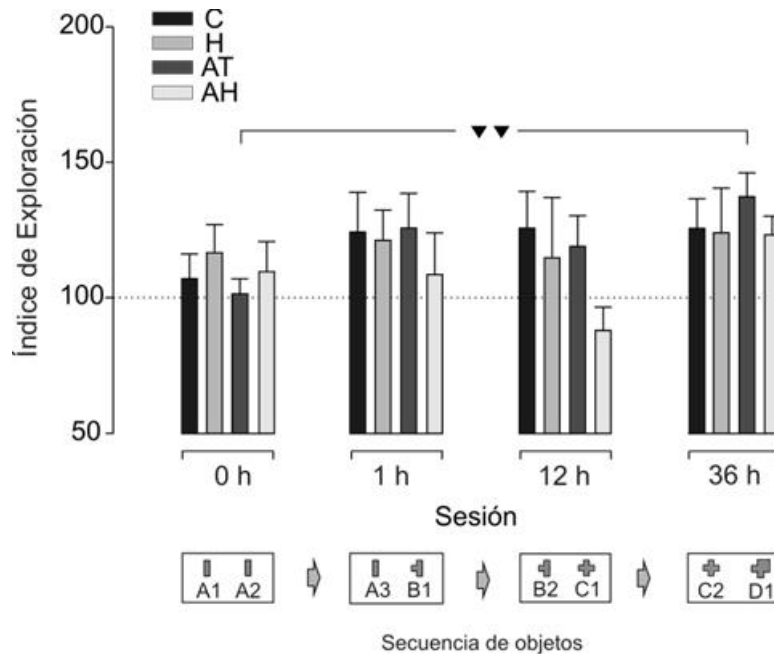


Figura 4.7. Representación de los resultados obtenidos durante la prueba de reconocimiento de objetos.

Se muestran los resultados de los cuatro grupos experimentales C, H, AT y AH (control, hipobárico agudo, aclimatado a altura y experimentado a ≈ 760 mmHg, y aclimatado a a altura y experimentado a 394 mmHg de presión, respectivamente) en las 4 sesiones reconocimiento (0 horas, 1 hora, 12 horas y 36 horas). Todos los grupos estuvieron expuestos a una presión atmosférica normal (≈ 760 mmHg) en la primera sesión. El resto de sesiones se llevaron a cabo en las condiciones de presión particulares de cada grupo. Los valores del eje de ordenadas representan el índice de exploración (porcentaje de tiempo, en promedio, dedicado a la exploración del objeto novedoso). Los valores de los distintos grupos vienen indicados como promedios de índices de preferencia \pm el error estándar de la media, y expresados en porcentaje ($n \geq 16$). Diferencias significativas en el grupo AT entre las sesiones 0 horas y 36 horas: ▼▼, $P < 0.01$. ANOVA de *una vía*; prueba *post hoc*: Test de Dunnett.

Como se aprecia en la figura 4.7., los resultados del grupo de ratones aclimatados AH no siguieron la tendencia general de los demás grupos. En la sesión correspondiente a las 12 horas, este grupo de aclimatados disminuyó su preferencia por el objeto novedoso respecto a sus valores iniciales, y lo hizo hasta invertir la preferencia (87.8 ± 6.2 ; media \pm E.E.M., $n \geq 16$), esto es, invirtiendo más tiempo en explorar el objeto familiar.

4.1.4. Laberinto de 8 brazos

Tras la recopilación simultánea de los datos correspondientes a los índices *Relación de brazos visitados*, y *Tiempo de exploración*, se procedió al análisis de los resultados.

4.1.4.1. Tiempo de exploración

El primero de los índices dio como resultado diferencias significativas entre sesiones para los grupos control [$F_{(2,45)} = 5.1$; $P < 0.05$] y aclimatado a altura simulada y experimentado a presión normal (AT) [$F_{(2,43)} = 9.4$; $P < 0.001$]. Estas diferencias se debieron a que, tanto los animales del grupo control, como los del grupo AT, emplearon más tiempo en encontrar los brazos con comida durante la sesión 1 hora, respecto al entrenamiento (*fig. 4.8.*). Así, el grupo control tardó 2.05 ± 0.4 veces más tiempo en encontrar los brazos en la sesión 1 hora que durante el entrenamiento, mientras el grupo de aclimatados empleó 1.64 ± 0.4 veces más tiempo durante dicha sesión. El otro grupo de aclimatados, AH, se acercó al nivel obtenido durante el entrenamiento (1.13 ± 0.3). En cambio, el grupo de ratones hipobáricos agudos (H) sobrepasó en mayor grado el tiempo empleado en encontrar los brazos con comida en la sesión 1 hora, referido al valor del entrenamiento (3.32 ± 1.3) (media \pm E.E.M., $n \geq 16$).

En cuanto a la sesión de las 24 horas, todos los grupos, con la excepción de los aclimatados AH, rebajaron sus tiempos respecto a la sesión 1 hora. El grupo de aclimatados AT, además, alcanzó diferencias significativas ($P < 0.001$) respecto a la sesión 1 hora (0.63 ± 0.08) (media \pm E.E.M., $n \geq 16$).

La representación gráfica del índice de tiempo de exploración, normalizado sobre el valor alcanzado durante el entrenamiento, se ilustra en la figura 4.8.

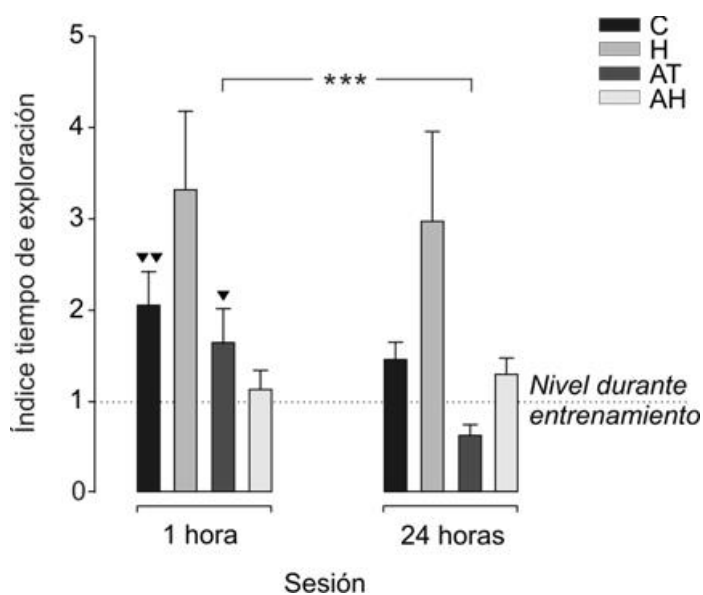


Figura 4.8. Representación de los resultados obtenidos para el índice *tiempo de exploración* en el paradigma del laberinto de ocho brazos. Se representan los grupos de animales control (C), hipobárico agudo (H), aclimatado y experimentado a presión normal (≈ 760 mmHg, AT) y aclimatado y experimentado a 394 mmHg (AH). Los resultados vienen indicados como promedios del tiempo de exploración \pm el error estándar de la media ($n \geq 16$). La línea discontinua sobre el valor 1 representa los índices alcanzados durante la sesión de entrenamiento. Diferencias significativas entre la sesión de entrenamiento con el resto de sesiones: ▼, $P < 0.05$, ▼▼, $P < 0.01$. Diferencias significativas entre las sesiones 1 hora y 24 horas: ***, $P < 0.001$. ANOVA de *una vía*; prueba *post hoc*: Test de Bonferroni.

4.1.4.2. Relación de brazos visitados

Los resultados obtenidos respecto a la *relación de brazos visitados* mostraron, como dato más significativo, que solo el grupo de aclimatados a altura y experimentados a presión normal (AT) alcanzó diferencias significativas [$F_{(2,45)} = 3.6$; $P < 0.05$] entre sesiones, una vez realizado el análisis de medidas repetidas. De esta forma, mientras el índice obtenido por este grupo durante el entrenamiento se estableció como su valor 1, el valor alcanzado a las 24 horas fue de 1.43 ± 0.14 (media \pm E.E.M., $n = 16$). Por tanto, estos animales, en promedio, visitaron más veces los brazos que contenían comida respecto a los brazos que no la contenían y, respecto al valor obtenido durante el entrenamiento, la frecuencia de visita a brazos con comida fue mayor. Esto ocurrió además en el grupo control (C) y en el otro grupo de aclimatados (AH), cuyos valores para la sesión de las 24 horas fueron 1.20 ± 0.17 y 1.22 ± 0.11 (media \pm E.E.M., $n = 16$), respectivamente, aunque ambos sin alcanzar diferencias significativas. El grupo de

hipobaría aguda (H) mostró una baja tendencia a visitar los brazos con comida, tanto en la sesión 1 hora (0.79 ± 0.09), como en la sesión 24 horas (0.89 ± 0.18 ; media \pm E.E.M., $n = 16$). Como se aprecia en la figura 4.9., la mayor tendencia a visitar brazos con comida se halló en el grupo AT, en la sesión de las 24 horas.

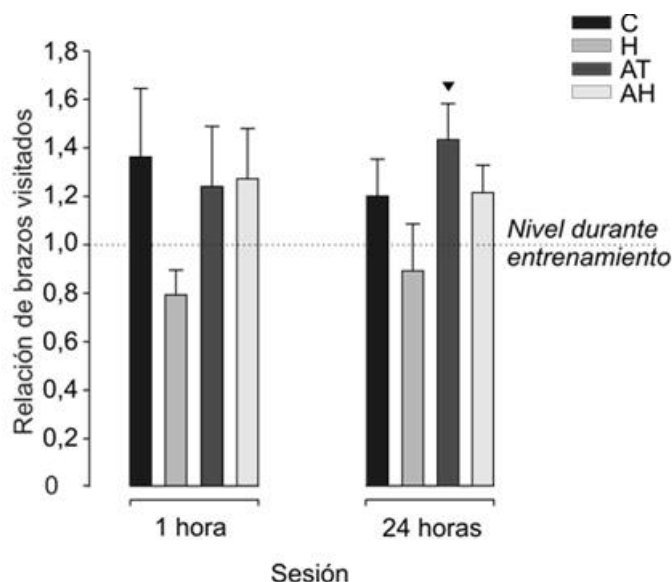


Figura 4.9. Representación de los resultados obtenidos para el índice *relación de brazos visitados* en el paradigma de laberinto de ocho brazos. Se representan los grupos de animales control (C), hipobárico agudo (H), aclimatado y experimentado a presión normal (≈ 760 mmHg, AT) y aclimatado y experimentado a 394 mmHg (AH). Los resultados vienen indicados como promedios de la relación de brazos visitados \pm el error estándar de la media ($n \geq 16$). La línea discontinua sobre el valor 1 representa los valores obtenidos durante la sesión de entrenamiento. Diferencias significativas entre la sesión de entrenamiento con el resto de sesiones: \blacktriangledown , $P < 0.05$. ANOVA de una vía; prueba *post hoc*: Test de Bonferroni.

4.2. ANÁLISIS DE LOS POTENCIALES EXCITATORIOS POSTSINÁPTICOS PROVOCADOS EN LA VÍA TÁLAMO-PREFRONTAL A DIFERENTES ALTURAS SIMULADAS

Tras la exposición de los animales a distintas alturas similares, y posterior perfusión y fijación del tejido, se comprobó la localización exacta de los electrodos implantados en cada animal. A partir de la comprobación exacta de las zonas de estimulación y registro en cada animal, se prescindió de los datos provenientes de aquellos animales en los que los electrodos de estimulación o los de registro no se localizaban en el sitio correcto.

En la figura 4.10., se muestran dos fotomicrografías de ejemplos válidos de localización de un electrodo de estimulación y otro de registro en uno de los animales.

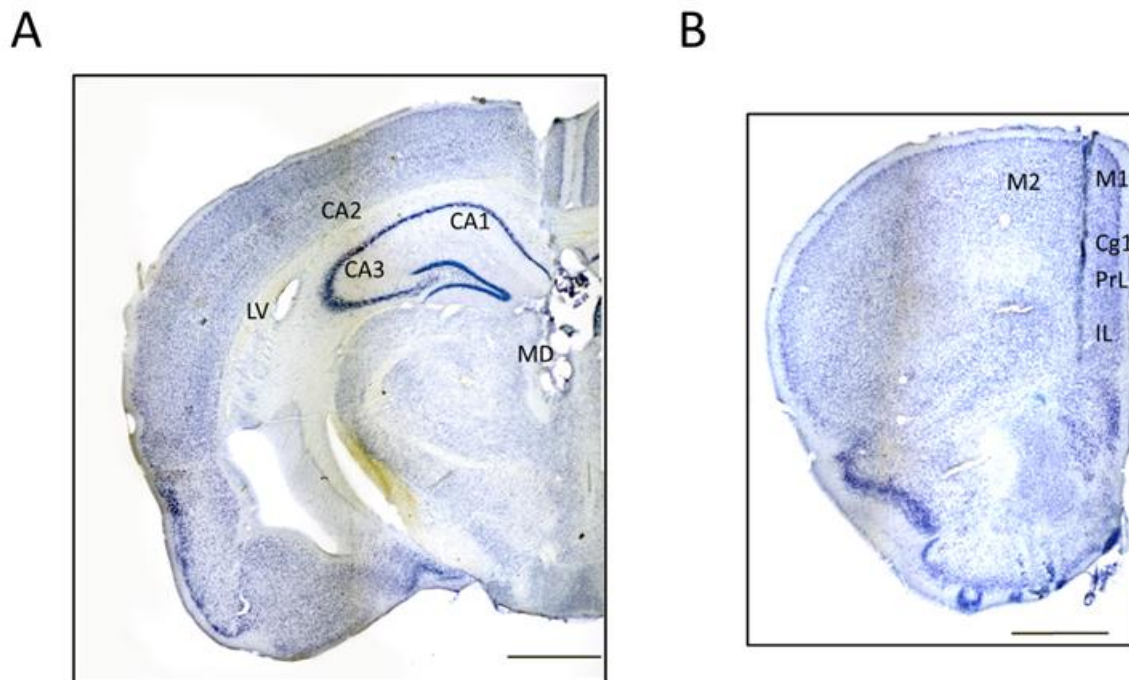


Figura 4.10. Fotomicrografías de tejido cerebral mostrando la posición de los electrodos durante la prueba en uno de los ratones utilizados para el ensayo. Los cortes coronales tuvieron un grosor de 40 μm . Tras el montaje, se aplicó la Tinción de Nissl, usando como colorante azul de toluidina. **A**, Fotomicrografía donde se observa en la zona central el núcleo mediodorsal del tálamo y la marca producida por la implantación del electrodo bipolar de estimulación. **B**, Fotomicrografía de la corteza prefrontal con la zona marcada producto de la implantación del electrodo monopolar de registro. Abreviaturas: Cg1, corteza cingulada primaria; IL, corteza infralímbica; LV, ventrículo lateral; MD, núcleo mediodorsal del tálamo; M1, corteza motora primaria; M2, corteza motora secundaria; PrL, corteza prelímbica. La barra de escala representa 1mm.

4.2.1. Amplitud de los potenciales excitatorios postsinápticos

Se midió la amplitud de los PEPS provocados por cada uno de los pares de pulsos de estimulación aplicados. Los registros se hicieron en cada uno de los tres niveles de presión descritos. Los resultados se ilustran en la figura 4.11.

Resultados

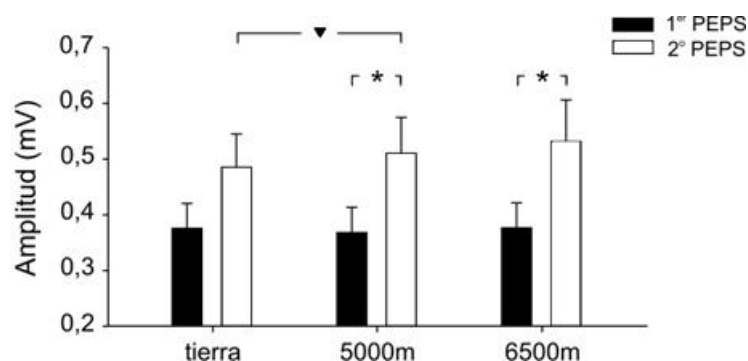


Figura 4.11. Amplitud de los potenciales excitatorios postsinápticos (PEPS) provocados a diferentes alturas simuladas. Representación gráfica en la que: *Tierra* representa los valores obtenidos durante presión normal (≈ 760 mmHg), *5000m* representa los valores de altitud simulada equivalente a 394 mmHg, y *6500m* los valores de altitud simulada correspondiente a 332 mmHg de presión. Se detallan los PEPS provocados por la estimulación. Se promediaron 20 PEPS provocados en cada animal. Los valores representan el promedio de amplitud de los PEPS \pm el error estándar de la media ($n \geq 32$). Diferencias significativas entre amplitudes a diferentes niveles de presión: \blacktriangledown , $P < 0.05$. Diferencias significativas entre la amplitud del primer y el segundo PEPS: *, $P < 0.05$. Test de Student *pareado*.

Los valores de amplitud de los PEPS provocados por el primer pulso se mantuvieron estables en los distintos niveles de presión, algo inferiores a 0,4 mV (0.38 ± 0.04 , 0.37 ± 0.04 y 0.38 ± 0.04 mV, a 760, 394 y 332 mmHg, respectivamente). Por otro lado, se produjo un incremento en la amplitud de los PEPS provocados por el segundo pulso a medida que disminuyeron los niveles de presión. Los valores obtenidos se situaron en 0.49 ± 0.06 , 0.51 ± 0.06 y 0.53 ± 0.07 mV (media \pm E.E.M., $n = 32$), a un nivel de presión normal (Tierra), a 5000 y a 6500 metros de altura simulada, respectivamente. Al aplicar el Test de Student, se determinaron diferencias significativas entre la amplitud de los PEPS provocados por el segundo pulso a presión normal y a 394 mmHg ($P < 0,05$).

Aunque la amplitud de los PEPS provocados por el segundo pulso siempre fue superior a la del los provocados por el primero, solo fue significativamente diferente cuando se disminuyó el nivel de presión (o, lo que es lo mismo, se aumentó en altura simulada), tanto a 394 mmHg ($P < 0,05$) como a 332 mmHg ($P < 0,05$). Se produjo, así, un incremento de la facilitación al segundo pulso en los potenciales registrados en el área medial de la corteza prefrontal, tanto a 5000 m como a 6500 m de altitud simulada (*fig. 4.11.*).

4.2.2. Pendiente de los potenciales excitatorios postsinápticos

Simultáneamente, se analizó la pendiente de los PEPS provocados tras la estimulación en el núcleo mediodorsal del tálamo. La pendiente se calculó a partir de la fórmula expresada en apartados anteriores. Los resultados se muestran graficados en la figura 4.12.

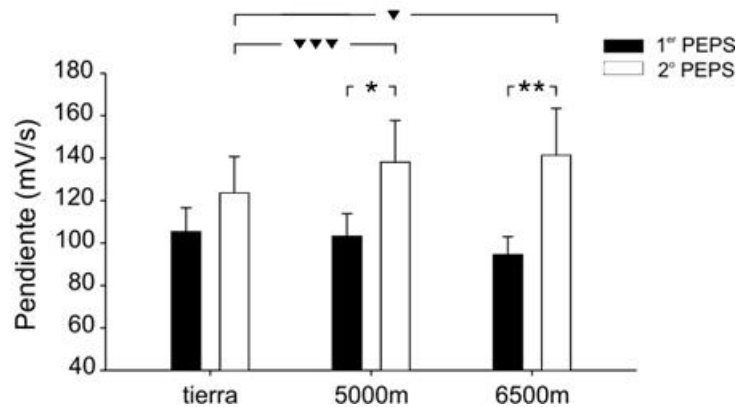


Figura 4.12. Pendiente de los potenciales excitatorios postsinápticos (PEPS) provocados a diferentes alturas simuladas. Representación gráfica en la que: *Tierra* representa los valores obtenidos durante presión normal (≈ 760 mmHg), *5000m* representa los valores de altitud simulada equivalente a 394 mmHg, y *6500m* los valores de altitud simulada correspondiente a 332 mmHg de presión. Se detallan los PEPS provocados por la estimulación. Se promediaron 20 PEPS provocados en cada animal. Los valores representan el promedio de amplitud de los PEPS \pm el error estándar de la media ($n \geq 32$). Diferencias significativas entre pendientes a diferentes niveles de presión: ▼, $P < 0.05$; ▼▼▼, $P < 0.001$. Diferencias significativas entre la pendiente del primer y el segundo PEPS: *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$. Test de Student *pareado*.

En contraste con lo ocurrido con los valores de amplitud, las pendientes de los PEPS provocados por el primer pulso mostraron un decrecimiento a medida que disminuyó la presión sometida dentro de la cámara hipobárica, aunque éste no fue significativo. En cambio, se produjo un incremento en la pendiente de los PEPS provocados por el segundo pulso. El Test de Student mostró diferencias significativas entre los distintos niveles de presión. Así, el valor basal de pendiente que mostraron los ratones se situó en 123.6 ± 17.1 mV/seg. En hipoxia hipobárica, los valores de la pendiente en los segundos PEPS fueron de 138.2 ± 19.5 y 141.4 ± 22.1 mV/seg, durante la permanencia a una presión de 394 y 332 mmHg, respectivamente. Las diferencias

Resultados

significativas se produjeron entre los valores obtenidos a presión normal y aquellos obtenidos en hipoxia: tanto a 394 mmHg ($P < 0.001$), como a 332 mmHg ($P < 0.05$).

Los datos obtenidos por la pendiente también indicaron un fenómeno de facilitación en la corteza infralímbica, que fue significativo cuando los animales fueron sometidos a niveles de presión de 394 y 332 mmHg. A una altura equivalente a 394 mmHg de presión, el aumento de pendiente pasó de 103.3 ± 10.5 mV/seg en el PEPS provocado por el primer pulso, a 138.2 ± 19.5 mV/seg en el PEPS del segundo pulso ($P < 0.05$). Cuando las condiciones de presión fueron de 332 mmHg, se experimentó un incremento notable en el valor de la pendiente entre los primeros y segundos PEPS provocados (94.6 ± 8.4 y 141.4 ± 22.1 mV/seg, respectivamente; media \pm E.E.M., $n = 32$), indicando el estadístico Test de Student mayores diferencias ($P < 0.01$).

Tanto los valores de amplitud como de pendiente mostraron muchos paralelismos entre sí, indicando un incremento de la facilitación al segundo pulso cuando los animales se sometieron a las citadas condiciones de hipoxia hipobárica, producto, probablemente, de la parcial inhibición del los PEPS provocados por los primeros.

4.3. ESTUDIO DEL SISTEMA COLINÉRGICO EN CONDICIONES DE HIPOXIA HIPOBÁRICA

4.3.1. Descripción general de la distribución de los anticuerpos α -ChAT y α -AChE

Tras la aplicación de las técnicas de inmunofluorescencia utilizadas en este trabajo, se detectaron distintos patrones de expresión tanto para la enzima ChAT (α -ChAT) como para la enzima AChE (α -AChE). Esta inmunoreactividad estuvo presente en todas las áreas cerebrales estudiadas: septum, área CA1 del hipocampo, corteza piriforme y corteza visual secundaria, y para cada uno de los anticuerpos empleados. Aún así, el patrón de distribución en ambas enzimas fue diferente para cada una de las tres regiones estudiadas.

En cuanto a la distribución de ambas enzimas en el área septal, se establecieron dos zonas claramente diferenciadas en cuanto a la mayor expresión de una u otra. Así, mientras los anticuerpos para la enzima sintetizadora de acetilcolina (ChAT) reconocieron células en toda la zona lateral del septum (*fig. 4.13., C*), los anticuerpos para la enzima degradadora de este neurotransmisor (AChE) marcaron mayoritariamente en el septum medial (*fig. 4.13., B*). De esta manera, se observaron dos poblaciones distintas de células en el área septal, diferenciándose en función de que expresaran una u otra enzima.

En los somas de las células piramidales en el área CA1 de hipocampo se observó una distribución uniforme de ambas enzimas (*fig. 4.13., N, O*). En las interneuronas que rodeaban a éstas, además, las enzimas ChAT y AChE se presentaron en las áreas de los somas, indicativo de un fenómeno de colocalización (*fig. 4.13., P*).

El marcaje de los distintos anticuerpos a lo largo de la corteza piriforme se mostró también bastante homogéneo (*fig. 4.13., F, G*). Ambas enzimas se expresaron ampliamente, e incluso colocalizaron en algunas zonas.

En la corteza visual secundaria, las dos enzimas se expresaron por todo el área de estudio, presentando a veces el fenómeno de la colocalización (*fig. 4.13., L*). En las capas más superficiales, especialmente, aparecieron células bipolares que expresaban la enzima ChAT (*fig. 4.13., K*).

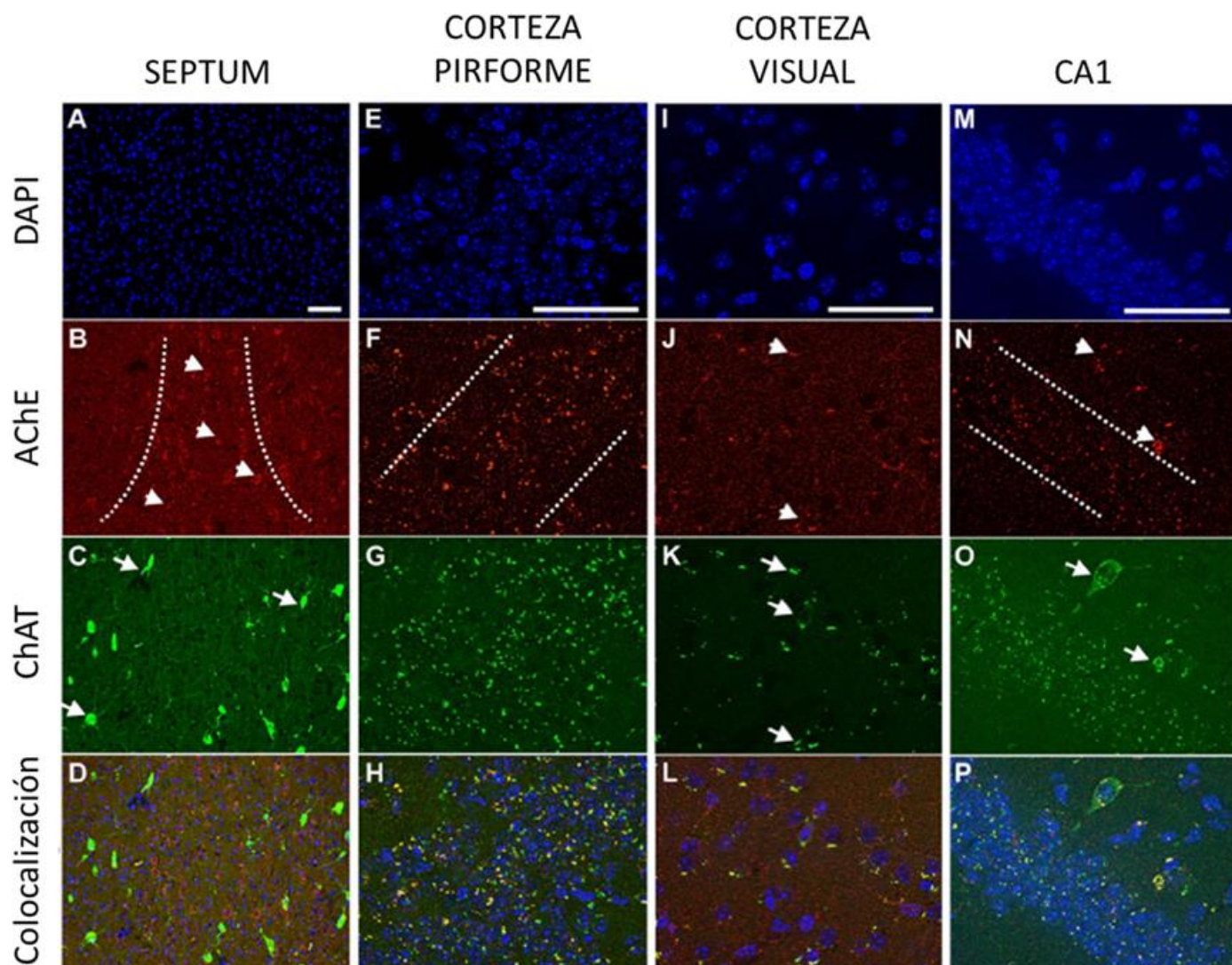


Figura 4.13. Patrón de distribución de las enzimas ChAT y AChE, detectadas mediante técnicas de inmunofluorescencia. Se muestran imágenes de su distribución en el área septal (A-D), en la corteza piriforme (E-H), en la corteza visual secundaria mediomedial (I-L) y en el área CA1 de hipocampo (M-P). En septum, separados por líneas discontinuas (B), se aprecian dos poblaciones de células según expresaran una enzima u otra. En corteza piriforme (F) y el área CA1 de hipocampo (N), también se muestran acotadas mediante líneas discontinuas las franjas de somas de neuronas piramidales. Las flechas indican neuronas sintetizadoras de ChAT; las puntas de flecha, neuronas sintetizadoras de AChE. La colocalización enzimática se muestra en amarillo (D, H, L, P). La barra de escala representa 50 μm .

4.3.2. Cuantificación de las reacciones α -ChAT y α -AChE

Para la cuantificación de las reacciones α -ChAT y α -AChE, se realizó un análisis por grupos, utilizando el software Image J (National Institute for Health, EEUU). Los distintos grupos de animales han sido descritos con anterioridad en la metodología referente al estudio inmunohistoquímico.

4.3.2.1. Área septal

En todo septum, y en zonas próximas, pertenecientes a la rama vertical y la rama horizontal de la banda de Broca (VDB y HDB, respectivamente), las enzimas ChAT y AChE se marcaron de forma muy similar y proporcional, en cuanto a los niveles de marcaje en una enzima y otra, en cada uno de los grupos de animales a estudio. Fue en ambos grupos de aclimatados donde el área inmunoteñida para estas enzimas se mostró más intensamente marcada, muy superior a los valores medidos en el grupo control (alrededor de una vez y media superior al área inmunoreactiva de los valores basales). Los valores más bajos, inferiores siempre a los encontrados para el grupo control, se describieron en el grupo de hipobáricos H 0h (0.62 ± 0.15 para ChAT y 0.78 ± 0.31 para AChE) (media \pm E.E.M., $n > 22$). Por otra parte, se mostraron diferencias significativas (Test de Student, $P < 0.05$) entre el área inmureactiva para ChAT y el área inmunoreactiva para AChE en el grupo de hipobáricos H 24h. El área marcada para el segundo (1.50 ± 0.38) fue mucho mayor que para el primero (0.71 ± 0.12) (fig. 4.14.).

La acetilcolinesterasa mostró un ligero aumento en su expresión en los grupos de aclimatados, aunque no se hallaron diferencias significativas entre éstos y el resto de grupos [$F_{(4,69)} = 1.3$; $P = 0.2$], aplicando el estadístico ANOVA de *una vía*. En cambio, la enzima ChAT mostró mayor variabilidad en cuanto al área inmunoreactiva marcada en los diferentes grupos experimentales, estableciéndose diferencias significativas entre los grupos [$F_{(4,130)} = 6.05$; $P < 0.001$]. De esta forma, el grupo de aclimatados A 0h alcanzó un máximo de 1.38 ± 0.15 , muy superior a los grupos de hipobáricos H 0h ($P < 0.05$) y H 24h ($P < 0.01$). Significativas fueron también las diferencias alcanzadas también con el grupo control ($P < 0.001$).

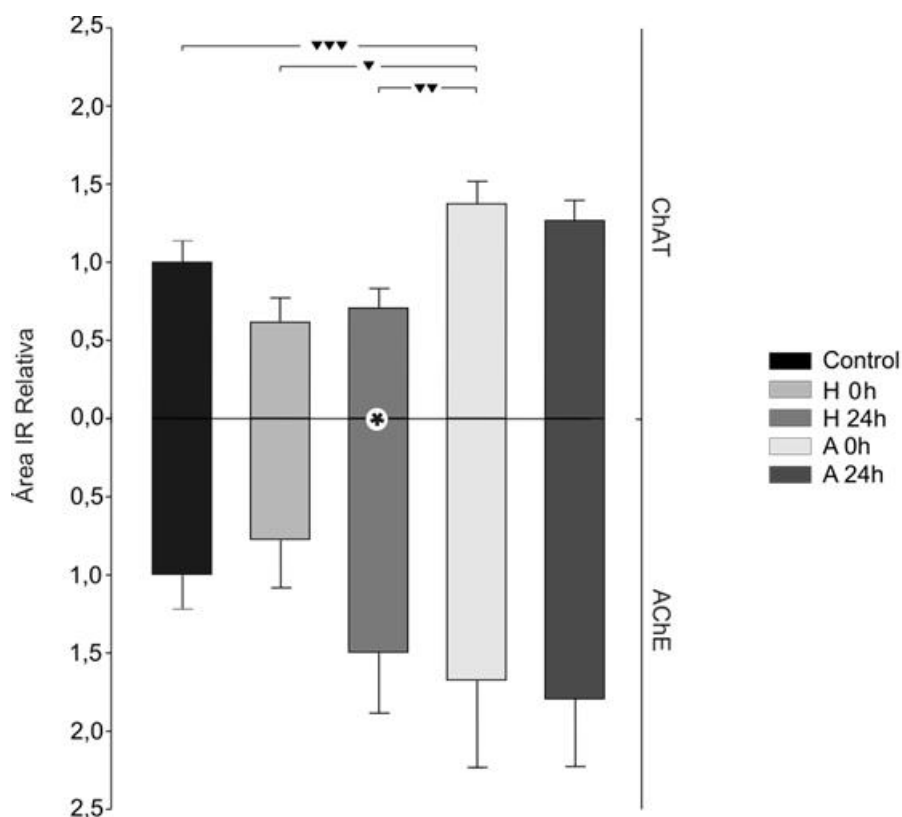


Figura 4.14. Análisis de inmunoreactividad para α -ChAT y α -AChE en el área septal. El área IR Relativa indica el área inmunoreactiva por los anticuerpos específicos para ChAT y AChE, en relación con el área total estudiada, normalizada en función de los valores obtenidos por el grupo control. El marcaje de los anticuerpos fue revelado mediante DAB. Se presentan 5 grupos experimentales: grupo control, grupo hipobárico agudo perfundido tras exposición a hipoxia hipobárica (H 0h), hipobárico agudo perfundido 24 horas después de la exposición (H 24h), aclimatado a hipoxia hipobárica y perfundido tras la exposición (A 0h) y aclimatado a hipoxia hipobárica y perfundido 24 horas después de la exposición (A 24h). Los valores representan el área inmunoreactiva \pm el error estándar de la media ($n \geq 14$). Diferencias significativas entre grupos: ▼, $P < 0.05$; ▼▼, $P < 0.01$; ▼▼▼, $P < 0.001$ (ANOVA de una vía; prueba *post hoc*: Test de Bonferroni). Diferencias significativas entre los anticuerpos α -ChAT y α -AChE: *, $P < 0.05$ (Test de Student *pareado*).

En la figura 4.14., se puede apreciar también una mayor área inmunoreactiva de la acetilcolinesterasa respecto a la colinacetyltransferasa en los dos grupos de ratones hipobáricos, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

4.3.2.2. Área CA1 de hipocampo

Los datos referentes al área inmunoreactiva en el área CA1 de hipocampo se muestran en la figura 4.15.

Hubo proporcionalidad en la expresión en las enzimas ChAT y AChE; esto es, los aumentos en el área inmunoreactiva para α -ChAT (respecto al valor originado en el grupo control), fueron paralelos a un aumento similar en el área inmunoreactiva para α -AChE. Solo el aumento experimentado por el grupo A 24h para α -AChE fue sustancialmente menor al aumento experimentado para α -ChAT, según el estadístico Test de Student. En el hemisferio izquierdo, mientras el valor obtenido por el área de marcaje de α -AChE fue de 0.84 ± 0.25 (0.84 ± 0.19 en el hemisferio derecho), el área de marcaje de α -ChAT representó 1.38 ± 0.13 (1.40 ± 0.10 en el hemisferio derecho) (media \pm E.E.M., $n > 15$). De esta forma, en el citado grupo de aclimatados se produjeron diferencias significativas ($P < 0.05$) para los valores de α -ChAT y de α -AChE en ambos hemisferios.

En un análisis entre grupos, el Test ANOVA de una vía indicó diferencias en los datos para α -ChAT tanto en el hemisferio izquierdo [$F_{(4,70)} = 7.9$; $P < 0.001$], como en el hemisferio derecho [$F_{(4,73)} = 9.5$; $P < 0.001$]. En este contexto, se obtuvieron diferencias en el grupo de aclimatados A 0h (1.91 ± 0.14 en el hemisferio izquierdo, y 2.06 ± 0.15 en el hemisferio derecho) con el resto de grupos ($P < 0.01$), salvo con el grupo A 24h. En este último grupo se evidenciaron diferencias ($P < 0.05$) con el grupo de hipobáricos H 0h, cuyo valor fue sustancialmente menor (0.41 ± 0.12 en el hemisferio izquierdo, y 0.43 ± 0.13 en el hemisferio derecho) al resto de grupos.

Respecto a los datos relativos al área inmunoreactiva para α -AChE, el análisis ANOVA de una vía indicó diferencias entre grupos en el hemisferio izquierdo [$F_{(4,75)} = 2.73$; $P < 0.05$] y en el hemisferio derecho [$F_{(4,75)} = 4.9$; $P < 0.01$]. Tanto en un hemisferio como en otro, las diferencias se establecieron entre el grupo de aclimatados A 0h y el grupo de hipobáricos H 0h ($P < 0.05$). Las diferencias fueron algo más acentuadas en el hemisferio derecho, donde el grupo de aclimatados (1.86 ± 0.28) superó ampliamente los valores obtenidos por el grupo de hipobáricos (0.35 ± 0.07). Además, también se encontraron diferencias significativas entre el grupo A 0h y el otro grupo de aclimatados A 24h, con un valor este último de 0.84 ± 0.19 ($P < 0.05$).

Resultados

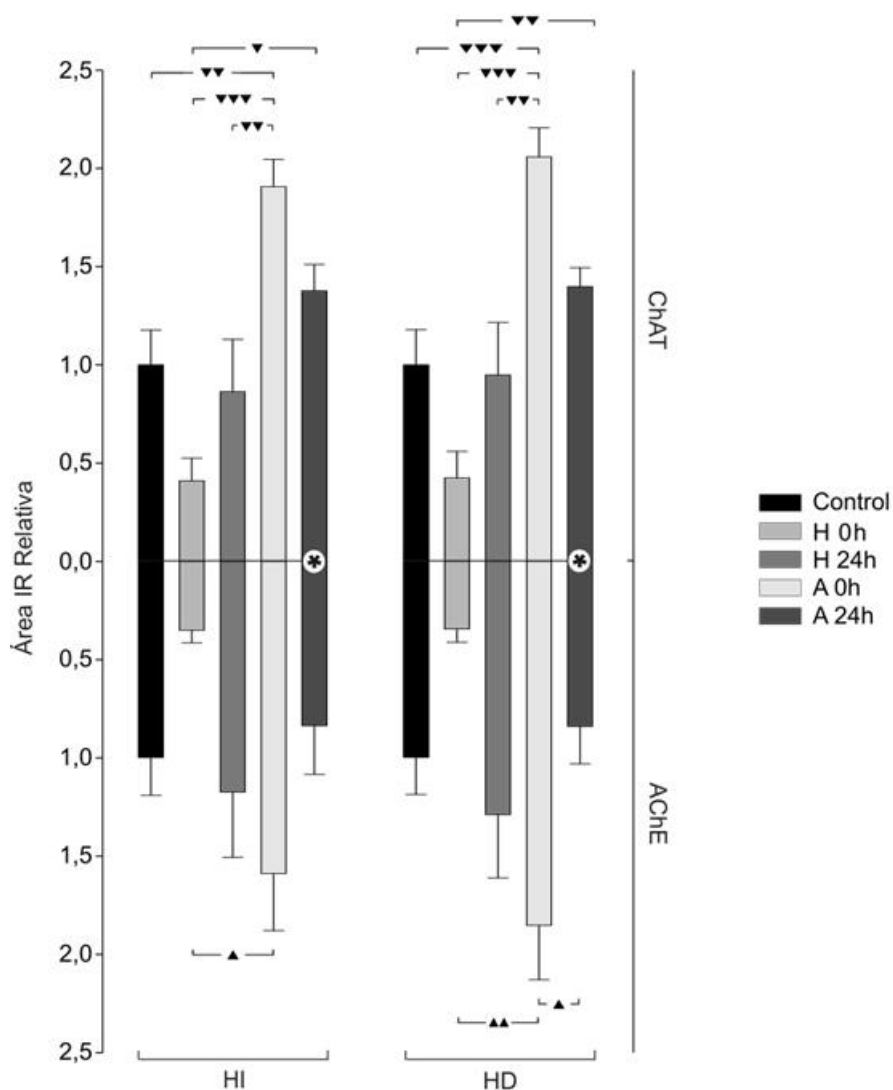


Figura 4.15. Análisis de inmunoreactividad para α -ChAT y α -AChE en el área CA1 de hipocampo. El área IR Relativa indica el área inmunoteñida por los anticuerpos específicos para ChAT y AChE, en relación con el área total estudiada, normalizada en función de los valores obtenidos por el grupo control. El marcaje de los anticuerpos fue revelado mediante DAB. Se presentan 5 grupos experimentales: grupo control, grupo hipobárico agudo perfundido tras exposición a hipoxia hipobárica (H 0h), hipobárico agudo perfundido 24 horas después de la exposición (H 24h), aclimatado a hipoxia hipobárica y perfundido tras la exposición (A 0h) y aclimatado a hipoxia hipobárica y perfundido 24 horas después de la exposición (A 24h). HI, Hemisferio izquierdo. HD, Hemisferio derecho. Los valores representan el área inmunoreactiva \pm el error estándar de la media ($n \geq 22$). Diferencias significativas entre grupos: \blacktriangledown , $P < 0.05$; $\blacktriangledown\blacktriangledown$, $P < 0.01$; $\blacktriangledown\blacktriangledown\blacktriangledown$, $P < 0.001$ (ANOVA de una vía; prueba *post hoc*: Test de Bonferroni). Diferencias significativas entre los anticuerpos α -ChAT y α -AChE: *, $P < 0.05$ (Test de Student *pareado*).

El análisis del área inmunoreactiva para α -ChAT y α -AChE mostró unos valores muy parecidos entre el hemisferio izquierdo y el derecho. No se produjeron, por tanto, diferencias significativas entre hemisferios, ni para uno ni para el otro anticuerpo.

4.3.2.3. Corteza piriforme

Respecto a la corteza piriforme, los datos se mostraron mucho más asimétricos en la expresión de ChAT/AChE. Destacaron las diferencias en el grupo A 24h, en el cual se describió una mayor área inmunoreactiva para la colina acetiltransferasa, tanto para el hemisferio izquierdo (14.06 ± 2.70) como para el derecho (7.86 ± 1.25) (media \pm E.E.M., $n > 28$). La expresión para AChE, en este mismo grupo, se mantuvo en unos valores cercanos a los establecidos en el grupo control (1.37 ± 0.36 en hemisferio izquierdo y 0.98 ± 0.23 en hemisferio derecho); de esta forma, el estadístico Test de Student estableció diferencias significativas ($P < 0.05$) entre enzimas, en ambos hemisferios. Para el resto de grupos, y en ambos hemisferios, las diferencias en la expresión entre enzimas ChAT y AChE fueron menores y no se presentaron diferencias significativas (*fig. 4.16.*).

En cuanto a las diferencias observadas entre grupos, destacó la mayor inmunorreactividad del anticuerpo α -ChAT en el grupo de aclimatados A 24h. Al aplicar ANOVA de *una vía*, este grupo obtuvo diferencias significativas ($P < 0.001$) sobre el resto de grupos, tanto en el hemisferio izquierdo [$F_{(4,261)} = 17.8$; $P < 0.001$], como en el derecho [$F_{(4,304)} = 15.9$; $P < 0.001$]. El mismo Test, aplicado para la inmunorreactividad de α -AChE, mostró diferencias significativas entre grupos en el hemisferio derecho [$F_{(4,275)} = 9.54$; $P < 0.001$]; no así en el hemisferio izquierdo, aunque mostró unos valores similares al primero [$F_{(4,278)} = 2.08$; $P = 0.083$]. Destacó el caso del grupo de aclimatados A 0h, que con un valor de 2.81 ± 0.40 alcanzó diferencias significativas sobre el grupo control ($P < 0.001$) y sobre el grupo de hipobáricos H 0h ($P < 0.01$) en el hemisferio derecho. En la misma dirección, A 0h también estableció diferencias ($P < 0.001$) con el otro grupo de aclimatados A 24h, ya que este último redujo su área inmunoreactiva para α -AChE hasta un valor de 0.98 ± 0.23 . El grupo de hipobáricos H 24h, además, presentó unos valores para esta misma enzima y este mismo hemisferio de 2.40 ± 0.44 , muy superior a los valores hallados para el grupo control y el hipobárico H 0h, estableciéndose diferencias significativas en ellos ($P < 0.05$).

Resultados

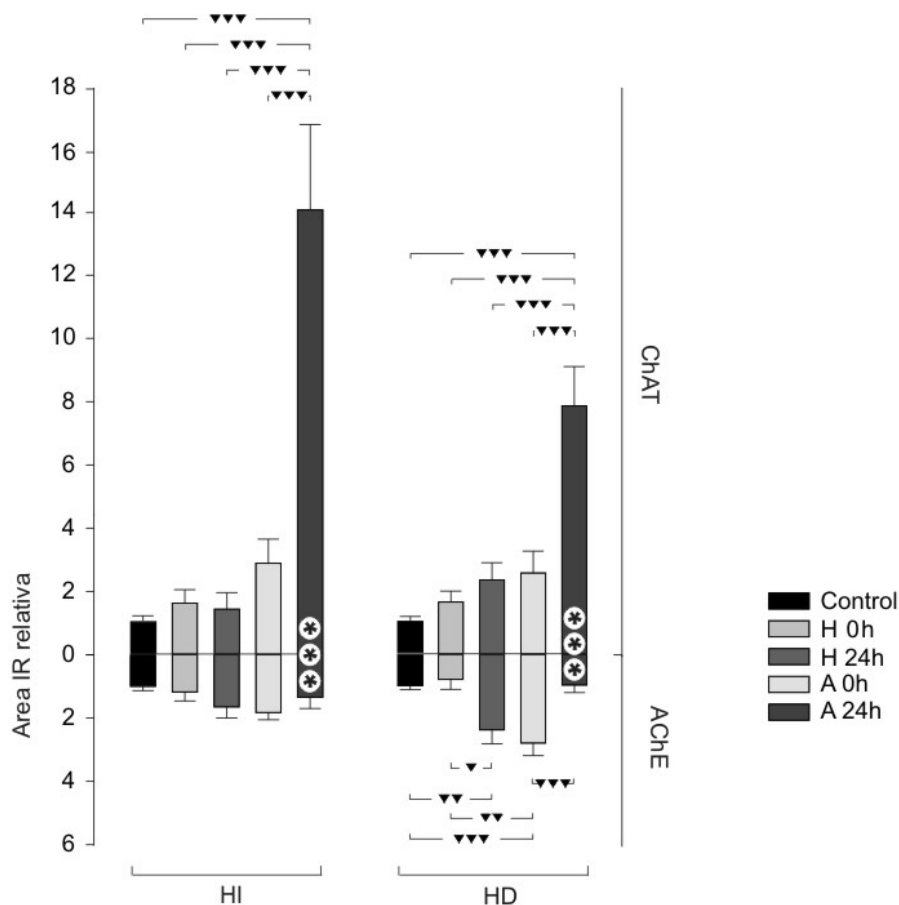


Figura 4.16. Análisis de inmunoreactividad para α -ChAT y α -AChE en la corteza piriforme. El área IR Relativa indica el área marcada por los anticuerpos específicos para ChAT y AChE, en relación con el área total estudiada, normalizada en función de los valores obtenidos por el grupo control. El marcaje de los anticuerpos fue revelado mediante DAB. Se presentan 5 grupos experimentales: grupo control, grupo hipobárico agudo perfundido tras la exposición a hipoxia hipobárica (H 0h), hipobárico agudo perfundido 24 horas después de la exposición (H 24h), aclimatado a hipoxia hipobárica y perfundido tras la exposición (A 0h) y aclimatado a hipoxia hipobárica y perfundido 24 horas después de la exposición (A 24h). HI, Hemisferio izquierdo. HD, Hemisferio derecho. Los valores representan el área inmunoreactiva \pm el error estándar de la media ($n \geq 50$). Diferencias significativas entre grupos: \blacktriangledown , $P < 0.05$; $\blacktriangledown\blacktriangledown$, $P < 0.01$; $\blacktriangledown\blacktriangledown\blacktriangledown$, $P < 0.001$ (ANOVA de *una vía*; prueba *post hoc*: Test de Bonferroni). Diferencias significativas entre los anticuerpos α -ChAT y α -AChE: $***$, $P < 0.001$ (Test de Student *pareado*).

La proporcionalidad entre la inmunoreactividad de ambas enzimas con respecto a la observada en el grupo control se mantuvo en todos los grupos, salvo en el grupo A 24h, para el que sí se produjeron diferencias inter-hemisferios ($P < 0.05$) al aplicar el estadístico Test de Student (*fig. 4.16.*).

4.3.2.4. Corteza visual secundaria

Los valores obtenidos tras el análisis del área inmunoreactiva para los anticuerpos contra ChAT y AChE se muestran en la figura 4.17.

Como ocurrió con otras áreas analizadas en este trabajo, se observaron semejanzas comparando grupo a grupo la expresión de ambas enzimas. En todos los casos, los valores obtenidos por los distintos grupos de animales se aproximaron a sus respectivos controles, hecho que se repitió en ambos hemisferios. Fue destacable la expresión de la enzima acetil colinesterasa en el grupo A 24h. En éste, el área inmunoreactiva para α -AChE fue muy superior (1.63 ± 0.11 en el hemisferio izquierdo y 1.38 ± 0.09 en el hemisferio derecho) (media \pm E.E.M., $n > 15$) al resto de grupos, y en comparación con los valores obtenidos por la enzima colina acetiltransferasa (1.03 ± 0.04 y 1.07 ± 0.03 , en los hemisferio izquierdo y derecho, respectivamente), alcanzó diferencias significativas ($P < 0.05$), mayores en el hemisferio izquierdo, tras aplicar el Test de Student. También fue destacable la poca inmunorreactividad de α -ChAT en el grupo de animales hipobáricos H 0h (0.80 ± 0.04 y 0.94 ± 0.04 , en los hemisferio izquierdo y derecho, respectivamente); al ser comparado respecto a la expresión de AChE, aparecieron diferencias significativas ($P < 0.01$) en ambos hemisferios, al aplicar el Test de Student.

El Test estadístico ANOVA de *una vía*, aplicado a los valores de los diferentes grupos de animales para la enzima ChAT, mostró diferencias significativas intergrupales; tanto en el hemisferio izquierdo [$F_{(4,127)} = 4.9$; $P < 0.005$], como en el derecho [$F_{(4,129)} = 3.05$; $P < 0.05$]. La menor expresión de ChAT en el grupo de animales hipobáricos H 0h originó diferencias significativas con el otro grupo de hipobáricos (1.06 ± 0.03 ; $P < 0.01$), con el grupo control (1.00 ± 0.04 ; $P < 0.05$), y con el grupo de animales aclimatados A 24h (1.03 ± 0.04 ; $P < 0.01$). Estas diferencias únicamente se encontraron cuando se aplicó la prueba post hoc de Bonferroni en el hemisferio izquierdo.

En cuanto a la expresión, en los distintos grupos de animales, de la enzima AChE, el Test ANOVA de *una vía* reveló diferencias significativas intergrupales; tanto en el hemisferio izquierdo [$F_{(4,155)} = 18.04$; $P < 0.001$], como en el derecho [$F_{(4,165)} = 7.2$; $P < 0$

Resultados

.001]. La moderada expresión de AChE en la corteza visual de los animales aclimatados A 24h, proporcionó diferencias significativas con los otros grupos estudiados.

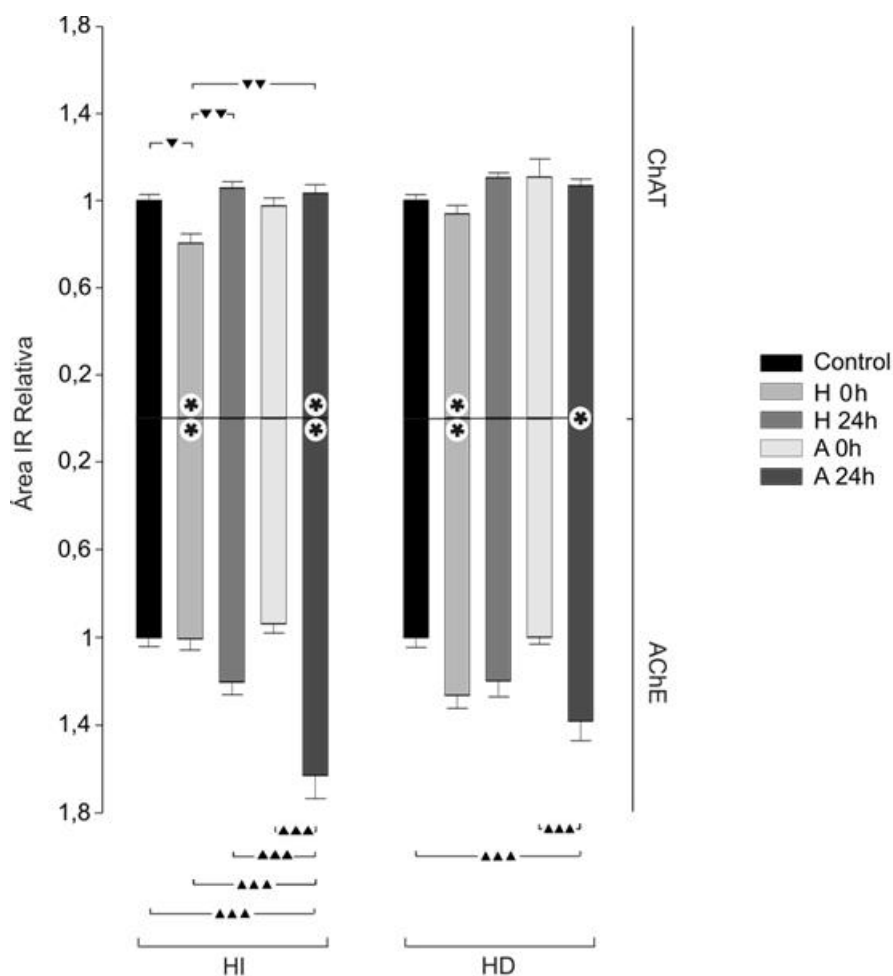


Figura 4.17. Análisis de inmunoreactividad para α -ChAT y α -AChE en la corteza visual secundaria mediomedial. El área IR Relativa indica el área inmunoteñida por los anticuerpos específicos para ChAT y AChE, en relación con el área total estudiada, normalizada en función de los valores obtenidos por el grupo control. El marcaje de los anticuerpos fue revelado mediante DAB. Se presentan 5 grupos experimentales: grupo control, grupo hipobárico agudo perfundido tras la exposición a hipoxia hipobárica (H 0h), hipobárico agudo perfundido 24 horas después de la exposición (H 24h), aclimatado a hipoxia hipobárica y perfundido tras la exposición (A 0h) y aclimatado a hipoxia hipobárica y perfundido 24 horas después de la exposición (A 24h). HI, Hemisferio izquierdo. HD, Hemisferio derecho. Los valores representan el área inmunoreactiva \pm el error estándar de la media ($n \geq 14$). Diferencias significativas entre grupos: ▼, $P < 0.05$; ▼▼, $P < 0.01$; ▼▼▼, $P < 0.001$ (ANOVA de una vía; prueba post hoc: Test de Bonferroni). Diferencias significativas entre los anticuerpos α -ChAT y α -AChE: *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ (Test de Student *pareado*).

De esta manera, los valores de estos animales tuvieron diferencias significativas con los valores del otro grupo de aclimatados (0.94 ± 0.04 y 1.00 ± 0.03 , en los hemisferio izquierdo y derecho, respectivamente) y con el grupo control (1.00 ± 0.04 y 1.00 ± 0.05 , en los hemisferio izquierdo y derecho, respectivamente), en todos los casos

($P < 0.001$). En el hemisferio izquierdo, además, se apreciaron diferencias significativas entre el grupo A 24h, y ambos grupos de animales hipobáricos, tanto H 0h (1.01 ± 0.05), como H 24h (1.20 ± 0.06), ($P < 0.001$).

El análisis del área inmunoreactiva para α -ChAT y α -AChE indicó valores muy parecidos para el hemisferio izquierdo y el derecho. No se produjeron, por tanto, diferencias significativas entre hemisferios, ni para uno ni para el otro anticuerpo.

La justificación en el presente trabajo del uso de tareas que promueven rendimientos submáximos en los animales se basa en un intento de optimizar la metodología para completar los resultados obtenidos en anteriores estudios realizados con una metodología más convencional. La hipótesis de este trabajo, ahora corroborada, es que la aplicación de paradigmas que, por su complejidad hacen esperar rendimientos submáximos, haría aflorar diferencias antes no halladas, y que corresponderían a rendimientos que se encontrarían en la franja comprendida entre el submáximo y el máximo.

5.1. IMPLICACIÓN DE LA EXPOSICIÓN A HIPOXIA HIPOBÁRICA SOBRE LA MEMORIA IMPLÍCITA

5.1.1. Consideraciones generales

En estudios previos de condicionamiento clásico de tipo traza (López-Ramos y cols., 2007), en los que se utilizaron los mismos grupos experimentales que en el trabajo actual para las pruebas de condicionamiento (grupos C, H, AT, AH, más el grupo de pseudocondicionados), el grupo control y los grupos de aclimatados obtuvieron los mismos resultados (o resultados sin diferencias significativas entre estos tres grupos).

La metodología empleada en cuanto a la naturaleza de los estímulos CS y US, en aquel caso, fue distinta: como estímulo condicionado se aplicaba un tono de 2,400 Hz y 95 dB de intensidad, y como estímulo incondicionado un estímulo eléctrico de 500 μ s, tres veces mayor en intensidad que la necesaria para provocar en el animal el cierre del párpado. En cambio, las características del CS y el US en el presente trabajo poseen menor capacidad estimuladora. Se ha seleccionado una intensidad para el sonido en el rango de los 70 dB, inferior a la normalmente empleada en esta materia (López-Ramos y cols., 2007; Kim y cols., 2010). La frecuencia del tono es más aguda (6000 Hz), que se corresponde con un sonido de menor impacto para el roedor, lo que repercute en su menor respuesta de sobresalto (Ison y Allen, 2003). La duración y la intensidad del US también son menores a las utilizadas frecuentemente para estas pruebas. Así, en este trabajo los pulsos tienen una duración de 50 μ s, frente a los 500 μ s mencionados

anteriormente (López-Ramos y cols., 2007). La intensidad aplicada, además, es del doble, y no del triple, de la necesaria para provocar el cierre del párpado en el animal.

Tras este cambio en la metodología, con el objetivo de encontrar rendimientos o respuestas submáximas en los animales, se manifiestan diferencias entre grupos.

Es preciso mencionar también en este apartado que el tipo de respuestas que se obtienen durante la habituación no se consideran verdaderas respuestas condicionadas, ya que no las genera un estímulo condicionado, sino que son originadas por el estímulo neutro, que por definición no provoca al animal la respuesta aprendida de cierre del párpado, puesto que no está asociado aún con el estímulo incondicionado. No obstante, el animal puede mover el párpado e incluso cerrarlo por completo tras la presentación del estímulo neutro durante la habituación por diversos motivos: parpadeos espontáneos que tienen lugar en ese momento, actividad general debido a la respuesta de sobresalto ante el sonido proveniente de tal estímulo, o la respuesta amigdalina que suele provocarse al principio el estímulo (Boele y cols., 2010). De esta manera, el pequeño porcentaje de respuestas registradas durante las sesiones de habituación se deben a estas causas, y sirven para tener un referente del número de respuestas palpebrales que puede manifestar el animal a lo largo de las sesiones y que no pueden vincularse directamente con la respuesta condicionada realmente aprendida.

Las sesiones están organizadas de acuerdo a un protocolo simplificado diseñado en el laboratorio (López-Ramos y cols., 2007) que reduce el número de días empleados para la prueba. Acorde con esto, existen otros protocolos en la literatura de duración aún más reducida (Emi y cols., 2012).

5.1.2. Exposición aguda

El porcentaje de respuestas condicionadas en el grupo de ratones sometidos a hipoxia aguda (5000 m de altura simulada) (H) es el más bajo de todos los grupos, exceptuando al de pseudocondicionados. Es destacable que en el paradigma de traza no se alcanza el 20% de respuestas: estos animales apenas muestran aprendizaje, ya que los valores durante las sesiones de habituación también se sitúan en ese rango.

En cambio, en el paradigma de demora se aprecia un aumento destacado del porcentaje de respuestas condicionadas en este grupo sometido a hipoxia aguda. Aun así, el valor más alto en el porcentaje de respuestas durante el condicionamiento no alcanza al valor máximo de respuestas durante la habituación. En el condicionamiento de demora, el estímulo neutro posee una mayor duración en el tiempo que en el condicionamiento de traza. Este factor otorga mayor capacidad estimuladora al tono, ya que, como se ha comprobado (Gruart et al., 1995; 2000c), este tipo de estímulos puede afectar al porcentaje de respuestas registrado en los organismos. De esta manera, la mayor duración del estímulo puede provocar una mayor respuesta de sobresalto que, a medida que suceden las sesiones, disminuye ostensiblemente por efecto de la habituación al estímulo (Carew y Kandel, 1973). En las sesiones de condicionamiento, la tendencia se invierte; el porcentaje de respuestas aumenta progresivamente, lo que sólo puede ser debido al propio proceso de aprendizaje.

El hecho de que existiera aprendizaje en el condicionamiento de tipo demora, y apenas en el condicionamiento de tipo traza, en los animales del grupo H, podría ser explicado por la afección del lóbulo temporal medial en episodios de hipoxia aguda (Reed y cols., 1999). El lóbulo temporal abarca una región fundamental para la memoria, como es el hipocampo. La sinapsis CA3-CA1, además, es fundamental para la adquisición de respuestas en el paradigma de traza (Gruart y cols., 2006; Madroñal y cols., 2007), mientras que no es fundamental en el de demora (Thompson, 1988; Moyer y cols., 1990; Clark y Squire, 1998). Pacientes con amnesia bilateral del lóbulo temporal no realizan satisfactoriamente la tarea de condicionamiento palpebral de tipo traza, mientras que el desarrollo de la tarea con el paradigma de demora no se ve afectado en ellos (McGlinchey-Berroth y cols., 1997). Estas evidencias apoyan el hecho de que la exposición a hipoxia aguda elimina la adquisición de respuestas condicionadas durante el paradigma de traza en el grupo de ratones H. No obstante, otras investigaciones (Múnera y cols., 2001) contradicen la teoría del origen diferenciado en la generación de la respuesta condicionada en cada paradigma. Las neuronas piramidales del hipocampo responden al mismo tiempo y del mismo modo en ambos paradigmas durante el intervalo de tiempo que transcurre desde la presentación del CS y el US. Así pues, el hipocampo parece estar relacionado con la relevancia o valor del estímulo condicionado

(Rescorla, 1988), más que con la determinación del espacio de tiempo comprendido entre los estímulos CS y US, que diferencia a ambos paradigmas.

No obstante, los porcentajes de respuesta del grupo de ratones H durante ambos condicionamientos son menores respecto al resto, debido a la afección general en el aprendizaje que provoca la hipoxia aguda. Numerosos estudios constatan tal afección en episodios agudos de hipoxia hipobárica observados en otras tareas cognitivas (Banderet y cols., 1991; Shukitt-Hale y cols., 1996). Los inhibidores de la acetil colinesterasa pueden contrarrestar de forma parcial los efectos de una exposición aguda a hipoxia hipobárica. En concreto, la administración de fisostigmina y galantamina, ambos inhibidores de la enzima, hacen disminuir sus valores, aumentar la enzima ChAT y mantener la morfología de las células intacta (Muthuraju y cols., 2009, 2010, 2011). La utilización de estos inhibidores de la acetil colinesterasa podría, por tanto, mitigar los efectos que se aprecian en el grupo de hipobaría aguda H.

5.1.3. Aclimatación

La exposición a un periodo continuado de hipoxia hipobárica provoca en los organismos una respuesta de aclimatación (Meerson y Radzievskii, 1976; Zhang y cols., 2005; Latshang y cols., 2011). Durante un periodo superior a 2 semanas, los ratones del grupo AH son aclimatados a estas condiciones. Estos ratones, al contrario que los del grupo H, durante el desarrollo de las pruebas de condicionamiento en hipoxia hipobárica no muestran afección en la adquisición de las respuestas condicionadas, si se considera como criterio establecido el porcentaje de respuestas registrado en los ratones del grupo control. Esta máxima se cumple tanto en la tarea de condicionamiento de traza, como en la de demora.

El porcentaje de respuestas palpebrales durante la habituación en estos ratones del grupo AH durante la prueba de condicionamiento de tipo demora es mayor al producido durante el de traza, fenómeno que se repite en el resto de grupos estudiados. Como se ha comentado con anterioridad, las características de este estímulo pueden posibilitar así la generación de un mayor número de respuestas. Además, este tipo de

condicionamiento posee una serie de peculiaridades y un origen neurofisiológico que lo hacen distinto al condicionamiento en traza, y que aún no están del todo esclarecidos en la abundante literatura (Thompson y Krupa, 1994; Gruart y cols., 2000a).

En general, los porcentajes de respuestas condicionadas en el paradigma de traza para estos animales aclimatados se asemejan bastante a los valores obtenidos por los animales del grupo control, y en ningún momento se muestran diferencias apreciables entre ellos. Los porcentajes de respuestas condicionadas en el paradigma de demora son similares a los registrados durante el paradigma de traza, excepto en la última sesión de condicionamiento, en la que los animales registran un porcentaje de respuestas condicionadas elevado, superior al del grupo de animales control.

Se puede determinar, de esta manera, que el proceso de aclimatación a altura simulada previene del déficit asociado a hipoxia aguda en la adquisición de respuestas condicionadas en ambos paradigmas. Son numerosos los estudios que tratan sobre la minimización o eliminación de los efectos que una exposición a hipoxia aguda provoca sobre el aprendizaje y la memoria en general, cuando los organismos se aclimatan a tales condiciones (Vacher y Miller, 1968; Samoilov y cols., 2001; Vataeva y cols., 2004; Rybnikova y cols., 2004), pero son pocas las publicaciones que detallan estos efectos sobre el condicionamiento clásico (López-Ramos y cols., 2007). Los estudios de condicionamiento clásico de respuesta ventilatoria, que emplean la hipoxia como estímulo incondicionado (Nsegbe y cols, 1997), nada tienen que ver con los efectos que provoca una exposición a altura.

5.1.4. Aclimatación, y prueba en condiciones normales de presión

El porcentaje de respuestas condicionadas en los animales aclimatados a altura y condicionados en condiciones normales (AT) es superior al porcentaje registrado en los animales del grupo control, aunque sin diferencias significativas. Por ende, el porcentaje también es mayor respecto al resto de grupos. Esto se cumple en ambos paradigmas. Las características propias del estímulo neutro en el paradigma de demora, citadas en

apartados anteriores, también inducen mayor porcentaje de respuesta en este grupo de animales.

En general, el porcentaje de respuestas condicionadas (en traza y demora) en el grupo AT es menor que en estudios previos de la misma temática (López-Ramos y cols., 2007) dada la mayor dificultad de la tarea planteada aquí. Con ello se consigue, sin embargo, apreciar diferencias entre este grupo de aclimatados y el resto. El hecho de que los animales del grupo AT establezcan diferencias significativas con el resto de grupos, los hacen distinguir de los animales del grupo control, ya que éstos últimos, a su vez, apenas las establecen con ninguno.

Los efectos que provoca la aclimatación a altura, a nivel molecular y celular, son muy variados, y condicionan los efectos que sobre las funciones cognitivas pueden provocar en exposiciones posteriores a condiciones normales de oxígeno y presión. La aclimatación implica un aumento en los niveles de cGMP que está relacionado con la mejora en la capacidad cognitiva (Boess y cols., 2004). Este segundo mensajero regula además la síntesis de Fos (Pilz y Broderick, 2005), que está involucrada en procesos de condicionamiento (Carrive y cols., 1997; Gruart y cols., 2000b). Se puede establecer, pues, un vínculo entre los mecanismos de respuesta a hipoxia y el proceso de aprendizaje, que en esta ruta convergen.

Con estas características, sumando además las evidencias del aumento de EPO y del hematocrito en sangre (Chapman y cols., 1998; Heinicke y cols., 2003; Gassmann y cols., 2009), la modificación del sistema colinérgico (Gibson y Duffy, 1981), el cambio en el transporte iónico en las células (Benveniste y cols., 1988; Paschen, 1996; López-Barneo y cols., 2001; Neubauer, 2001), la expresión de factores de transcripción (Rybnikova y cols., 2004, 2008; López-Ramos y cols., 2007) y contra la apoptosis (Samoilov y cols., 2005), y otros efectos destacados que se producen durante el proceso de aclimatación, cabe pensar en la repercusión potencial que pueden tener estos hechos sobre las funciones cognitivas en los individuos aclimatados. Las condiciones propias a las que se somete a este grupo de aclimatados durante el condicionamiento, como son las condiciones normales de oxígeno (760 mmHg y 21% de O₂), pueden hacer que todos los mecanismos de aclimatación llevados a cabo en estos organismos aparezcan

sobredimensionados ante tal restablecimiento de las condiciones normales de disponibilidad del oxígeno.

Es fácil entender los efectos que provoca esto en el rendimiento físico; la bibliografía aquí es numerosa (Levine y Stray-Gundersen, 1997; Katayama y cols., 1998; Hendriksen y Meeuwssen, 2003; Hamlin y Hellemans, 2007), pero los efectos provocados en funciones como el aprendizaje y la memoria están poco investigados bajo una aclimatación y posterior restablecimiento a las condiciones normales de presión. Son pocos los estudios que describen estos fenómenos, y se centran en su mayoría en la mejora de la memoria espacial (Zhang y cols., 2005; Maiti y cols., 2008). Algunos estudios documentan incluso que una exposición breve a hipoxia hipobárica aumenta la orientación espacial de ratas (Wittner y Riha, 2003). Otros trabajos, publicados en humanos, no apoyan esta hipótesis, ya que observan tiempos de reacción de tipo visual y auditivo mayores tras exposiciones a hipoxia hipobárica (Li y cols., 2012). Sin embargo, este estudio compara estos tiempos de reacción con los obtenidos anteriormente a la exposición, en individuos previamente entrenados. En el presente trabajo, entrenamientos previos no han sido llevados a cabo, por lo que hacer una comparativa exacta no es adecuado. Además, en el trabajo citado no se evalúa aprendizaje, sino el desarrollo de habilidades innatas que, aunque necesarias para el desarrollo de ciertos aprendizajes, no forman parte del aprendizaje en sí.

5.2. IMPLICACIÓN DE LA EXPOSICIÓN A HIPOXIA HIPOBÁRICA SOBRE LA MEMORIA EXPLÍCITA

5.2.1. Condicionamiento operante en caja de Skinner

En el paradigma de *razón fija 1* se observan dos tendencias distintas. Por un lado, el grupo de animales sometidos a hipoxia aguda (H) no muestra aprendizaje en la tarea de condicionamiento, ya que sus valores promedios apenas alcanzan un máximo de 3 palancas pulsadas en el último día de sesión. Es en este grupo donde se manifiesta un déficit patente de aprendizaje, ya que no consigue aproximarse a los valores obtenidos por el grupo control. No existen apenas reseñas bibliográficas referentes a experimentos

que reproduzcan tal efecto en el condicionamiento operante; tan sólo en caja de Skinner se encuentran unos resultados comparables, aunque la hipoxia no es de naturaleza hipobárica (Giurgea y cols., 1971). En este caso, se produce una pérdida de memoria en ratas por exposiciones a hipoxia tras cada entrenamiento recibido.

Por otro lado, en el grupo control y en los dos grupos de aclimatados, se observan unas respuestas muy similares en cuanto al número de palancas pulsadas, no estableciéndose entre sí diferencias significativas. Si se establece como criterio general el ritmo de aprendizaje mantenido por el grupo control a lo largo de las sesiones, se puede decir que los animales aclimatados muestran un ritmo normal de aprendizaje. Cabe destacar los valores obtenidos en el grupo AH; si bien las condiciones en las que realizan la prueba son similares a las del grupo H, los primeros registran un aprendizaje similar a los animales del grupo control, mientras que en los segundos el aprendizaje es nulo. Los animales del grupo AH se condicionan en las mismas condiciones de presión a las que son aclimatados. La aclimatación, en este caso, previene la afección del aprendizaje del condicionamiento operante.

En la fase de la prueba más compleja, se muestran diferencias entre los grupos no observadas en el paradigma convencional de *razón fija 1*. Así, los animales aclimatados a altura y condicionados a presión normal registran valores significativamente más altos que el resto de grupos durante las últimas sesiones. Es difícil intentar buscar paralelismos con otros trabajos, puesto que no se encuentran reseñas similares en cuanto al efecto de la aclimatación a altura en este tipo de aprendizaje operante. Un estudio con un planteamiento metodológico muy similar ha sido probado mediante dos paradigmas consecutivos similares al presente trabajo; no obstante, la evaluación del efecto de la aclimatación sobre el aprendizaje no fue llevada a cabo (Jänicke y Schulze, 1987).

5.2.2. Reconocimiento de objetos

En la prueba de reconocimiento de objetos cabe destacar la implicación relevante que pueden tener dos estructuras cerebrales como son la corteza piriforme y

la corteza visual. La primera de ellas está relacionada con el sistema olfativo; los roedores se sirven de este sentido para la discriminación de objetos. No obstante, durante las pruebas realizadas, los objetos fueron lavados con alcohol para eliminar restos olorosos que pudieran ayudar al animal a reconocer cualquier pieza con la que hubieran estado en contacto previamente, por lo que este factor pierde su relevancia. La segunda estructura está estrechamente relacionada con la memoria de reconocimiento, y por ello se discute su función en este y próximos apartados.

La prueba de reconocimiento de objetos implica el uso de la memoria explícita de tipo visual. En un trabajo similar (López-Ramos y cols, 2007), no se hallaron diferencias entre los animales aclimatados y los del grupo control. No obstante, en tal prueba los objetos a reconocer presentados a los ratones fueron muy diferentes entre ellos. Al aumentar la complejidad de la tarea en este trabajo, se dificulta su óptimo desarrollo. Con el objetivo de forzar rendimientos submáximos en los animales, se recurre a complicar la detección de las diferencias entre los objetos familiares y los objetos novedosos, como se detalla en la metodología.

Además, la memoria de reconocimiento (en esta prueba) se basa en la capacidad de discriminar objetos de progresiva complejidad, y no en objetos de distinta naturaleza. Con ello se consigue desarrollar esta metodología orientada al rendimiento submáximo, y además, se elimina la posibilidad por parte de los ratones de mostrar preferencia por alguna característica propia de alguno de los objetos. Así, en este trabajo se opta por la elección de objetos idénticos, a los que se les iba acoplando sesión tras sesión pequeñas piezas que aportaban las diferencias.

El tiempo empleado en explorar el objeto novedoso no es muy superior respecto al tiempo de exploración al objeto familiar, al contrario de lo que se describe en otros trabajos con metodología más convencional (Sik y cols., 2003), al menos en lo que se refiere al grupo control. Además, se requiere mayor capacidad por parte de los animales a la hora de discriminar entre unos objetos y otros.

Como se aprecia en los resultados, el grupo de aclimatados AH no sigue la tendencia general de los demás grupos. En la sesión correspondiente a las 12 horas, este grupo de aclimatados disminuye su preferencia por el objeto novedoso respecto a sus

valores iniciales, y lo hace hasta invertir la preferencia, esto es, hasta dedicar más tiempo explorando el correspondiente objeto familiar. Si bien estos ratones se encontraban bajo condiciones de hipoxia hipobárica, su previa aclimatación durante semanas a esta altura simulada no hace posible adjudicar el resultado a esta causa. Además, durante el resto de sesiones muestran un comportamiento similar al del resto de grupos. La peculiaridad, por tanto, puede ser atribuible a causas externas al planteamiento experimental. Por otra parte, el grupo de animales expuestos durante la prueba a hipoxia aguda (H), apenas muestra alteración en la memoria de reconocimiento. En otros trabajos, en cambio, la memoria visual sí se muestra afectada; una exposición durante 30 días en el rango de los 5488-8488 m de altura simulada afectó moderadamente la memoria de reconocimiento en humanos (Hornbein y cols., 1989).

El grupo de animales aclimatados que realiza la prueba a niveles normales de presión (AT), muestra un incremento en la preferencia por el objeto nuevo conforme transcurren las sesiones, respecto a los índices obtenidos durante el entrenamiento, hasta alcanzar diferencias significativas. Éste es un hecho diferenciador con el resto de grupos, en los que no se produce mejora durante las sucesivas sesiones. De esta manera se extrae que la mejora cognitiva en los animales se produce transcurrido el periodo de aclimatación. El aumento de esta preferencia es proporcional a la mejora de la memoria de reconocimiento, y se puede constatar con el nuevo diseño metodológico empleado.

En este punto resulta necesario incidir en las características en las que se realiza la primera sesión de la prueba; ésta se lleva a cabo por todos los animales a presión y niveles de O₂ normales (760 mm de Hg y 21% de O₂). Las sesiones posteriores se llevan a cabo bajo las condiciones definidas para cada grupo de experimentación. En estas sesiones, algunos grupos, y significativamente el grupo AT, aumentan el tiempo de exploración al objeto novedoso, como anteriormente se menciona. Aunque algunos trabajos, como el anteriormente mencionado (Li y cols., 2012) describen resultados contradictorios, muy probablemente se deba a la aplicación de distintas metodologías, como también anteriormente se detalla.

5.2.3. Laberinto de ocho brazos

En numerosos estudios existe una gran controversia respecto a la alteración de la memoria espacial bajo condiciones de hipoxia hipobárica. Algunas investigaciones reportan mejoras en los índices evaluados para memoria espacial tras un episodio de hipoxia (Wittner y Riha, 2003; Zhang y cols., 2005). Otros autores revelan datos totalmente opuestos, con empeoramientos en todos los parámetros evaluados en este tipo de memoria, como la latencia o la velocidad (Hurder, 1951; Van Liere y Stickney, 1963; Shukitt-Hale y cols., 1994). En otros estudios se describe que la mejora o el deterioro en la memoria espacial se manifiesta en función del tiempo transcurrido desde la exposición a hipoxia aguda hasta la realización de la prueba (Maiti y cols., 2008).

La metodología está también basada en la búsqueda de rendimientos submáximos en la prueba del laberinto de 8 brazos, para poder identificar diferencias en la memoria espacial entre los distintos grupos de estudio. La complejidad de esta prueba se basa en la incorporación en algunos de los brazos de señuelos, poco vistosos, para la orientación de los animales dentro del laberinto. Como se aprecia en los resultados, la memoria espacial se ve afectada en mayor o menor grado en función de una exposición aguda, y a la existencia o no de un proceso de aclimatación.

Se aprecia un empeoramiento notable en el tiempo de exploración empleado durante la ejecución de la prueba, en todos los grupos, en la sesión realizada 1 hora después del entrenamiento. Este aparente deterioro de la memoria espacial es más llamativo en los animales control y en los del grupo AT, que obtienen diferencias significativas frente a sus mismos valores registrados durante el entrenamiento. Este hecho puede ser explicado si se entiende el proceso normal de aprendizaje que siguen los animales en esta prueba. Al principio, los animales deben descubrir en qué brazos se encuentra la comida, por lo que la tarea es más compleja y azarosa. En la sesión realizada a las 24 horas, estos animales conocen ya la existencia de las referencias que les aportan pistas de la posición de la comida.

En trabajos relacionados, también se reproduce un fenómeno de empeoramiento de los parámetros estudiados en memoria espacial, tras un entrenamiento previo: al exponer a ratas al laberinto de Morris, tras varios

entrenamientos, la velocidad en la búsqueda de la meta (en este caso, una plataforma sumergida) disminuye, incluso en condiciones de presión normal (Shukitt-Hale y cols., 1994). En la presente prueba, este empeoramiento desaparece en la sesión 24 horas; esto es, el tiempo empleado disminuye en los animales debido al mayor conocimiento de los brazos que contienen comida. En los ratones del grupo H, en cambio, al producirse en ellos un deterioro en el proceso de formación de la memoria bajo hipoxia aguda, no se produce mejora. Este hecho se repite en numerosos estudios previos durante una exposición a hipoxia aguda (Vacher y Miller, 1968), o posterior a ella (Hurder, 1951; Van Liere y Stickney, 1963; Shukitt-Hale y cols., 1994). A este respecto, los inhibidores de la acetil colinesterasa podrían revertir los efectos de la exposición aguda sobre el aprendizaje y memoria espacial (Muthuraju y cols., 2009, 2010, 2011).

La aclimatación a altura también impide la alteración de la memoria espacial cuando los animales se exponen a un episodio agudo de hipoxia hipobárica; los datos obtenidos en el grupo AH, que realiza la prueba en hipoxia, son muy parecidos a los del grupo control. Esta protección de la aclimatación frente a los efectos adversos de un episodio agudo de hipoxia también se pone de manifiesto en otros estudios con animales aclimatados a altura (Vacher y Miller, 1968).

Son pocos los casos en la literatura que describen un aumento en la memoria espacial tras un proceso de aclimatación, respecto a una situación control. En uno de ellos, la tasa de error en un paradigma de laberinto de 8 brazos fue la menor de todas en los animales aclimatados a altura testados en condiciones de presión normal (Zhang y cols., 2005). En consonancia, en el presente trabajo los animales aclimatados a altura y experimentados a presión normal, adquieren los valores de aprendizaje más altos, y lo hacen 24 horas después tras el inicio de la prueba, de forma similar a como ocurre en la prueba de reconocimiento de objetos.

Los mecanismos fisiológicos que subyacen a estos cambios en la memoria espacial pueden hallarse en la corteza prefrontal medial (Becker y cols., 1980), y en menor grado, en la región retrosplenial de la corteza cingulada (Vann y cols., 2003). La sinapsis talámico-cortical entre el núcleo mediodorsal del tálamo y la corteza prefrontal medial, estudiada en este trabajo, presenta además una disminución en la amplitud de

los PEPS generados en las neuronas de la mPFC bajo condiciones de hipoxia. Sin embargo, estos resultados no implican una relación con la alteración del aprendizaje y la memoria que tienen lugar durante la prueba del laberinto de 8 brazos.

Los efectos de la hipoxia hipobárica son muy generalizados en todo el sistema nervioso (Bogolepov, 1983; Dickinson 1983; Rybnikova y cols., 2005, 2006; Row y cols., 2007; Maiti y cols., 2008), y los localizados en el hipocampo y el resto de la corteza, deben causar por sí solos cambios considerables en la cognición del animal que restarían importancia al efecto de un área en concreto del cerebro, por muy fundamental que sea ésta para la tarea.

5.3. ALTERACIÓN DE LA SINAPSI NÚCLEO MEDIODORSAL DEL TÁLAMO - CORTEZA PREFRONTAL MEDIAL POR EXPOSICIÓN A HIPOXIA HIPOBÁRICA

Los resultados del análisis de los PEPS estudiados en la sinapsis entre el núcleo mediodorsal del tálamo y la corteza prefrontal medial presentan varias características destacadas. Tanto la amplitud como la pendiente disminuyen en los potenciales provocados por el primer pulso, al exponer a los animales a unas condiciones de hipoxia hipobárica, y el efecto se intensifica a medida que aumenta el nivel de hipoxia (5000 y 6500 m de altura simulada). Como se detalla en algunas investigaciones, un descenso en el nivel de oxígeno en el ambiente puede producir cambios electrofisiológicos inmediatos en el animal. Estos cambios suelen manifestarse como una ralentización y una disminución en la amplitud de las ondas registradas en el EEG (Querol, 1965; Foster y cols., 1975).

En el presente trabajo los valores de amplitud de los potenciales provocados por el segundo pulso aumentan en esta vía talámico-cortical. La disminución en la amplitud de los potenciales provocados por el primer pulso, y el aumento en los provocados por el segundo, sugieren un fenómeno de incremento de la facilitación a este segundo pulso, fruto de la inhibición del primero debido a las condiciones de hipoxia. Este fenómeno se explica por el incremento en la liberación de neurotransmisor desde las terminales

presinápticas procedentes del tálamo, tras la aplicación de los segundos pulsos, que repercute directamente en el aumento del potencial de membrana del terminal postsináptico. Al mismo tiempo, el aumento en la liberación de neurotransmisor sería debido al incremento en la concentración de calcio intracelular que ocurre tras la aplicación del primer pulso. Todo ello hace presumir que esta alteración se da a nivel presináptico (Zucker y Regehr, 2002), aunque también existen otras interpretaciones (Moult y cols, 2006).

El fenómeno de la facilitación se pone de manifiesto en las neuronas registradas en el área medial de la corteza prefrontal, tanto a 5000 m como a 6500 m de altitud simulada, siendo más pronunciado este fenómeno conforme aumenta la altura. Del análisis de la pendiente de los PEPS se extrae el mismo hecho.

Según algunos autores, los sujetos que mejor toleran los efectos de la hipoxia hipobárica son los que suelen mostrar menores cambios en el EEG durante estas condiciones (Zhongyuan y cols., 1983). De forma paralela, en este estudio los mayores cambios en las propiedades electrofisiológicas se producen ante la exposición más intensa a hipoxia que se ha utilizado para este experimento (6500 m de altura simulada). La bibliografía relacionada describe mayor afección en las funciones cognitivas ante exposiciones a hipoxia más severas (Van Liere y Stickney, 1963; Shukitt-Hale y cols., 1994; Vataeva y cols., 2004), frente al menor impacto que se produce cuando la hipoxia es menos acusada (Shukitt-Hale y cols., 1998), por lo que los resultados de este estudio suman evidencias a lo descrito por Zhongyuan y cols., en 1983. Algunos autores van más allá, y relacionan de manera directa el grado de deterioro cognitivo que puede manifestarse durante la hipoxia hipobárica, y el EEG (Regard y cols., 1989).

Según algunos autores, la hipoxia hipobárica modifica también la amplitud de los PEPS visuales (Foster y cols., 1975). El mal agudo de montaña, por su parte, suele caracterizarse por la aparición de ilusiones ópticas, pérdidas de memoria visual y otros déficits (Hornbein y cols., 1989; Grossrubatscher, 2007), de modo que la alteración de los potenciales excitatorios postsinápticos de la corteza visual durante la hipoxia hipobárica podría estar relacionada con estos síntomas.

La participación del tálamo en procesos que han sido tradicionalmente asociados al hipocampo, como la memoria (Reed y cols., 1999), hacen pensar en un papel relevante de las proyecciones talámico-hipocampales en la pérdida repentina de memoria bajo hipoxia. Los cambios en amplitud y pendiente experimentados en los PEPS de la mPFC que recibe aferencias del núcleo mediodorsal del tálamo pueden tener relación con la posible afección del tálamo en condiciones de hipoxia hipobárica.

5.4. EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN A HIPOXIA HIPOBÁRICA SOBRE EL SISTEMA COLINÉRGICO

5.4.1. Consideraciones generales

Los marcadores generales para evaluar el sistema colinérgico no se restringen únicamente a la acetil colinesterasa y la colina acetiltransferasa. También contemplan al transportador vesicular para acetilcolina (VACHT), otros transportadores para el neurotransmisor, y receptores propios para éste (nicotínicos y muscarínicos). Además, se puede detectar directamente la actividad de ACh mediante otras técnicas. Sin embargo, las técnicas para hallar la presencia directa de la ACh pueden obviar información de las consecuencias que provoca la hipoxia hipobárica, como, por ejemplo, son la síntesis o la degradación de este neurotransmisor. La hipoxia hipobárica altera de forma relevante, y provoca numerosas repercusiones, en todo el sistema nervioso. Por tanto, cuantos más marcadores se utilicen para evaluar en un organismo el sistema colinérgico, más información se puede extraer de éste.

Los anticuerpos contra ChAT son uno de los marcadores más fiables que existen para evaluar el sistema colinérgico, ya que el marcaje de estos anticuerpos se restringe únicamente a las neuronas colinérgicas. Los anticuerpos contra AChE, en cambio, no son marcadores tan exclusivos (Van der Zee y Keijsers, 2011), debido a que AChE presenta de forma natural en el sistema nervioso varios subtipos.

Estos subtipos difieren en su expresión génica y en el proceso de ensamblaje de sus aminoácidos (Meshorer y Soreq, 2006). El subtipo *R*, que se expresa en condiciones

de estrés en el animal (Massoulié, 2002), no es funcional, por lo que no se puede obviar que incrementos en la enzima AChE hallados en el presente trabajo puedan estar relacionados con el incremento de este subtipo. Por tanto, la inespecificidad del anticuerpo contra los diferentes subtipos de AChE (α -AChE) podría alterar parcialmente el resultado del análisis. En cualquier caso, la situación más estresante fue la sufrida por el grupo hipóxico agudo perfundido a las 0 h (H 0h), y sin embargo este grupo no presentó incremento en los niveles de AChE.

Independientemente de estos factores, que pueden distorsionar en parte la medición real de la síntesis y la degradación de la acetilcolina, los resultados mostrados en el presente trabajo reflejan la tendencia general de los grupos de animales aclimatados, o expuestos de forma aguda, a hipoxia hipobárica.

También se comparan estos resultados con los obtenidos en las pruebas comportamentales. De este modo, se podrían equiparar de forma similar las características entre los animales de los grupos control procedentes de las pruebas inmunohistoquímicas y de las comportamentales. Por sus características, también serían equiparables los grupos H 0h y H 24h, con los animales del grupo H procedentes de las pruebas comportamentales. De igual manera, existirían características semejantes entre los animales de los grupos A 0h y A 24h, con los animales de los grupos AH y AT, respectivamente. Sin embargo, no es intención de la presente discusión establecer una causalidad directa entre el desbalance colinérgico presentado en los distintos grupos y los cambios reportados en las pruebas de comportamiento.

Al hacer una comparativa entre estudios previos y los resultados del presente trabajo se extrae la conclusión general de que la aclimatación a altura provocaría los mismos efectos en el aumento del neurotransmisor ACh que los que provocan las sustancias inhibitoras de AChE, o las potenciadoras de ChAT (Bohnen y cols, 2005; Kakinuma y cols, 2010; Muthuraju y cols, 2009, 2010, 2011). El porqué de este aumento de ACh es desconocido, aunque podría estar influenciado por los niveles de EPO cerebral, molécula que se produce no sólo en el riñón, y a la que se la ha atribuído un papel en la respuesta hematológica y ventilatoria a hipoxia (Gassmann y cols, 2009).

5.4.2. Septum medial y núcleos de la banda de Broca

El marcaje del anticuerpo contra AChE en el septum medial y los núcleos vertical y horizontal de la banda diagonal de Broca muestra variaciones en cada grupo experimental; sin embargo, estadísticamente no son significantes. Se aprecia un ligero descenso en aquellos animales expuestos a hipoxia aguda y perfundidos inmediatamente tras esta exposición. El resto de grupos incrementa la expresión de la enzima, siendo algo más destacada en los grupos de animales aclimatados.

Los niveles para la enzima ChAT muestran mayor área inmunoteñida en los grupos de aclimatados. Los animales perfundidos inmediatamente tras el proceso de aclimatación (A 0h), muestran diferencias importantes respecto a los grupos de animales expuestos de forma aguda a hipoxia hipobárica. Los valores de estos últimos animales son inferiores a los determinados en el grupo control. Sin embargo, en un estudio en el que se expuso a ratas a hipoxia intermitente durante 14 días, lo cual puede llevar a un proceso de aclimatación, se observó como los niveles de ChAT encontrados disminuían considerablemente (Row y cols., 2007). No obstante, la hipoxia de tipo no hipobárica (normobárica, con niveles de presión normales) y la intermitencia de la exposición (exposición a hipoxia durante unas horas al día), pueden hacer que ambos resultados no sean comparables.

El balance colinérgico, entendido aquí como el nivel de AChE frente al de ChAT, en el grupo expuesto a hipoxia aguda y perfundido tras el episodio (H 0h), muestra abundante presencia relativa de la enzima degradadora de la acetilcolina, y escasa presencia de la enzima encargada de la síntesis de este neurotransmisor, respecto a los niveles observados en el grupo control. La consecuencia más obvia de este hecho podría ser un descenso general en la presencia de la ACh en estas condiciones. Sin embargo, la cierta inespecificidad del anticuerpo, que puede alterar en parte el resultado propio del análisis, y la propia dinamicidad en el proceso de síntesis, transporte y degradación del neurotransmisor, hacen que no sea posible atribuir directamente a los resultados un descenso global en el neurotransmisor.

Con todo esto, se extrae del estudio que los animales expuestos a hipoxia aguda poseen un balance que se inclina a favor de la degradación de la acetilcolina, y los aclimatados a estas condiciones un balance favorable a la síntesis del neurotransmisor.

Las amplias proyecciones que se dirigen desde el complejo del septum medial y la banda diagonal de Broca hacia la corteza (Risold, 2004) e hipocampo (Gaykema y cols., 1991), pueden afectar al balance colinérgico de estas zonas de forma similar a como ocurre en las estructuras septales. En un estudio en el que se lesiona químicamente el septum, se comprueba cómo tal lesión afecta de forma sustancial a la presencia de acetilcolina en el hipocampo, reduciéndose hasta un 75% frente a una situación control (Van der Staay y cols., 2006). El análisis de la presencia de AChE y ChAT en las siguientes estructuras analizadas, corteza piriforme y área CA1 de hipocampo, puede confirmar este hecho.

5.4.3. Área CA1 de hipocampo

En el presente trabajo, la presencia de AChE en el área CA1 de hipocampo disminuye hasta un 70% en el caso de los ratones expuestos a hipoxia aguda que se perfunden inmediatamente (H 0h), respecto a los valores del grupo control. 24 horas después de la exposición aguda (grupo H 24h), los valores vuelven a establecerse a los niveles del grupo control (no expuestos a hipoxia hipobárica).

En algunos trabajos similares se experimentó una bajada significativa en la expresión de la enzima AChE en el hipocampo tras una exposición a hipoxia aguda. Es el caso de ratones expuestos a 7500 m de altura (Udayabanu y cols., 2012) en hipocampo. En otro estudio, se expuso a ratones a 7000 m de altura, y no se encontraron diferencias en la actividad de la AChE en hipocampo en el periodo denominado de reoxigenación tras su exposición aguda (Udayabanu y cols., 2008). Este periodo puede ser equivalente a las condiciones particulares del grupo H 24h, analizado en el presente estudio, y con similar resultado.

En el grupo de ratones aclimatados a hipoxia hipobárica, el porcentaje de AChE en hipocampo es significativamente mayor en el caso de los ratones perfundidos

inmediatamente tras su exposición a hipoxia (A 0h). No hay cambios significativos 24 horas después del proceso de aclimatación respecto a los niveles de los animales del grupo control. En estudio similar se constató, de igual forma, que tras 7 días de exposición a una altura simulada de 6100 m, periodo suficiente para cierto proceso de aclimatación, los niveles de AChE obtenidos fueron más de dos veces superiores a los registrados en ratas control (Muthuraju y cols., 2010).

En el presente trabajo, destacan dos hechos significativos en cuanto a la presencia de ChAT en el área CA1 de hipocampo: el aumento notable en la presencia de la enzima en el grupo de aclimatados a altura A 0h, respecto a los valores basales (o del grupo control); y el descenso en los niveles de esta enzima en los ratones expuestos a una hipoxia aguda.

Este último hecho ha sido respaldado por varios estudios. Se ha observado una importante bajada en la expresión de ChAT en el hipocampo tras una exposición a hipoxia hipobárica aguda (Udayabanu y cols., 2012), contrarrestada por la administración del quelante para zinc Ca_2EDTA . Un estudio en el que se midió el nivel de acetilcolina en el hipocampo de ratas (no se evaluó el nivel de ChAT directamente), indicó como la ACh disminuyó bruscamente por una exposición a 5500 m de altura simulada (Shukitt-Hale y cols., 1993). Indirectamente, estos niveles pueden reflejar un descenso de la enzima encargada de sintetizar este neurotransmisor. Por otro lado, los niveles de ACh tras una exposición de 7 días y 6100 m de altura simulada, mostraron un tercio del nivel previo de este neurotransmisor en esta estructura (Muthuraju y cols., 2010).

Respecto a los resultados obtenidos en las pruebas de memoria explícita, debe considerarse el estado del hipocampo durante la hipoxia (Shukitt-Hale y cols., 1996; Udayabanu y cols., 2008; Gilbert y Brushfield, 2009; Sharma y cols., 2010). Si bien las tendencias actuales apoyan la hipótesis de que un tipo de memoria o función cognitiva no queda relegada a un lugar específico del cerebro, sino que son varias las estructuras esenciales implicadas (Lopez-Aranda y cols., 2009), bien es cierto que la mayoría de las publicaciones sitúan al hipocampo como estructura necesaria para llevar a cabo funciones fundamentales como la memoria (Muthuraju y cols., 2010; Udayabanu y cols.,

2012). También es bien sabido que una exposición a hipoxia modifica por completo el sistema colinérgico (Gibson y Duffy, 1981; Chleide e Ishikawa, 1990), y que el sistema colinérgico está implicado en procesos cognitivos en hipocampo (Becker y cols., 1981; Kim y Levin, 1996; Acquas y cols., 1996). Con estas premisas, se puede relacionar el desbalance colinérgico descrito en el área CA1 de hipocampo con los resultados obtenidos en las pruebas comportamentales del presente trabajo.

Teniendo en cuenta que la mayor parte de la acetilcolina presente en el hipocampo proviene de las proyecciones septales, y apenas de neuronas colinérgicas propias de esta estructura (Mufson y Cunningham, 1988), el comportamiento que muestran los niveles de AChE y ChAT ante las distintas condiciones de hipobaría en hipocampo puede tener su origen en los niveles enzimáticos que se presentan en septum, tal y como se comprueba en éste y en el anterior apartado.

5.4.4. Corteza piriforme

Los resultados correspondientes al área relativa inmuneñida por los anticuerpos contra AChE y ChAT en corteza piriforme, se encuentran, a grandes rasgos, en consonancia con los hallados en el análisis para el área CA1 de hipocampo, y el septum medial y núcleos adyacentes. Estas últimas estructuras proyectan abundantemente hacia la corteza piriforme (Risold, 2004). Una vez más, las consecuencias de la hipoxia sobre el sistema colinérgico en las estructuras septales se derivan hacia las zonas donde éstas proyectan.

En el presente trabajo, la presencia de AChE en la corteza piriforme depende sustancialmente del modo en el que la exposición a hipoxia hipobárica se lleva a cabo en los distintos grupos de animales. Una exposición a hipoxia aguda no parece tener grandes consecuencias en los niveles enzimáticos durante la exposición, pero en el periodo de reoxigenación (grupo H 24h), los niveles de AChE parecen aumentar ligeramente, al menos en el hemisferio derecho. En un estudio, en cambio, una reducida actividad de la enzima AChE en corteza cerebral de ratones fue evidenciada en el proceso de reoxigenación, tras un periodo de hipoxia (Udayabanu y cols., 2008).

Durante la aclimatación a hipoxia, los niveles de la enzima se acrecientan, pero 24 horas después (A 24h), disminuyen, y lo hacen de forma acusada en el hemisferio derecho. Los pacientes que desarrollan la enfermedad de Parkinson o Alzheimer se caracterizan por un bajo nivel de AChE en corteza cerebral. Estos bajos niveles se relacionan con un empeoramiento en la memoria de trabajo (Bohnen y cols., 2005, 2006). En otros trabajos, se experimentó un aumento del doble en la actividad de la AChE en corteza tras una exposición a 6100m de altura simulada durante 7 días, respecto a ratas no expuestas (Muthuraju y cols., 2010). Esta exposición puede calificarse de tipo aclimatativo, aunque el estudio no aporta datos sobre el momento en el que estos animales se sacrificaron y se midió el nivel de actividad enzimática. El presente trabajo, en cambio, muestra la importancia del momento en el que se analizan las enzimas tras un episodio de hipoxia; los resultados obtenidos difieren en función de que el estudio se realice inmediatamente tras la exposición, o 24 horas después. Los resultados de estudios similares son difícilmente equiparables si no se conocen este tipo de datos, que en el presente trabajo se evidencian muy relevantes.

5.4.5. Corteza visual secundaria

Los resultados del área inmunoteñida para el anticuerpo contra AChE en corteza visual muestran un destacable aumento de esta enzima tras el periodo de aclimatación a hipoxia hipobárica (grupo A 24h). Este aumento es aproximadamente un 50% mayor respecto a los animales del grupo control. En consonancia con ello, hay constancia de que tras la aclimatación a una altura simulada similar, los niveles de AChE son el doble de los obtenidos en ratas control (Muthuraju y cols., 2010).

En cuanto a los valores de ChAT, se produce una disminución en su expresión inmediatamente tras el episodio de hipoxia aguda (grupo H 0h). De forma indirecta, se puede relacionar con el brusco descenso en los niveles de ACh descrito en corteza de rata después de una exposición a hipoxia hipobárica (Muthuraju y cols., 2010). Al mismo tiempo, en el presente trabajo, se aprecia un leve aumento en los niveles de la enzima ChAT 24 horas después de la exposición a hipoxia aguda. Sin embargo, en un estudio se observó un descenso en la actividad de ChAT cortical en el periodo de reoxigenación

comprendido tras una hipoxia moderada en fetos de ratón (Sher, 1990). La inespecificidad del área cortical evaluada, debido al estado de desarrollo de los fetos, imposibilita la adecuada comparación entre resultados.

Durante la prueba de reconocimiento de objetos el animal requiere de la memoria de reconocimiento para llevar a cabo dicha tarea. Recientemente se ha comprobado que la corteza visual V2 tiene un papel fundamental en este tipo de memoria (López-Aranda y cols., 2009). El sistema colinérgico podría estar involucrado en este proceso. Se hace necesario, por ello, extrapolar los resultados de los análisis para AChE y ChAT a los obtenidos de la prueba de reconocimiento. En estados de hipoxia, existe en los animales un incremento de la enzima acetil colinesterasa, sobre todo inmediatamente después de una exposición aguda a hipoxia hipobárica (H 0h), y horas después de una exposición a hipoxia que conduce a la aclimatación del individuo (A 24h). En ambas situaciones, el desbalance colinérgico se inclina hacia un posible menor nivel de acetilcolina en corteza visual.

No obstante, los efectos contrapuestos facilitadores o inhibidores de la ACh que se manifiestan en corteza visual (Sillito y Kemp, 1983), impiden interpretar correctamente en el plano cognitivo los cambios de este neurotransmisor en condiciones de hipoxia hipobárica. De esta manera, resulta difícil extrapolar los resultados de las enzimas AChE y ChAT a los obtenidos en la prueba de reconocimiento de objetos. De tal modo, el descenso neto del neurotransmisor que se observa en los grupos de animales H 0h y A 24h, no explica, al mismo tiempo, los contrapuestos resultados obtenidos en la prueba de reconocimiento en los animales H y AT, respectivamente.

Por otro lado, se ha comprobado cómo el descenso en los niveles de ACh en áreas corticales puede asociarse con alucinaciones visuales (Perry y cols., 1990). La hipoxia hipobárica, con idénticas consecuencias sobre el balance colinérgico, provoca además afección en la memoria visual en humanos (Hornbein y cols., 1989), con lo que, en ambos casos, cabría esperarse que, de alguna u otra manera, el balance (o desbalance) de este neurotransmisor, al menos, modificara el funcionamiento normal de estas estructuras, y por ello, las funciones cognitivas que éstas generan.

6.1. Conclusiones

1) La metodología basada en la búsqueda de rendimientos submáximos es óptima para evaluar las capacidades cognitivas en ratones.

2) La aclimatación a altura, no solo contrarresta la alteración de la memoria implícita que se da en esas condiciones, sino que la mejora, cuando se analiza en condiciones normales de presión.

3) La aclimatación a altura, no solo contrarresta la alteración de la memoria explícita que se da en esas condiciones, sino que mejora la de largo plazo, cuando se analiza en condiciones normales de presión.

4) La exposición a altura simulada altera la actividad sináptica de las aferencias tálamicas a la corteza prefrontal medial, mediante un mecanismo que se presume de tipo presináptico y dependiente del incremento de altura simulada.

5) La exposición a altura simulada altera el balance colinérgico en el septum medial y los núcleos de la banda de Broca, así como en las principales áreas hacia donde proyectan (hipocampo y otros tipos de corteza). En un episodio agudo, este desbalance ChAT/AChE es debido a un incremento de la segunda enzima, mientras que en la aclimatación ocurre el efecto contrario. Estos fenómenos no son extensibles a la corteza visual secundaria.

6) Existen paralelismos entre los efectos de la exposición y de la aclimatación a altura sobre las capacidades cognitivas y el desbalance colinérgico que se produce en esas condiciones, los cuales pueden estar relacionados con la alteración de la actividad sináptica que la exposición a altura produce.

7.1 Referencias

Acquas E, Wilson C, Fibiger H. Conditioned and unconditioned stimuli increase frontal cortical and hippocampal acetylcholine release: effects of novelty, habituation, and fear. *J Neurosci* 16:3089–3096. 1996.

Alvarado J, Steinacker A, Bach-y-Rita P. The ultrastructure of the retractor bulbi muscle of the cat. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 6: 548. 1967.

Amaral DG, Dolorfo C, y Alvarez-Royo P. Organization of CA1 projections to the subiculum: a PHA-L analysis in the rat. *Hippocampus*, 1(4), 415-435. 1991.

Anagnostaras S, Murphy G, Hamilton S, Mitchell S, Rahnama N, Nathanson N, Silva A. Selective cognitive dysfunction in acetylcholine M1 muscarinic receptor mutant mice. *Nat Neurosci* 6(1):51–58. 2003.

Andronico MP y Forgays DG. Sensory stimulation and secondary reinforcement. *Journal of Psychology*, 1962, 54, 209-219. 1962.

Aou S, Woody C y Birt D. Changes in the activity of units of the cat motor cortex with rapid conditioning and extinction of a compound eye blink movement. *The Journal of Neuroscience*, 12(2): 549-559. 1992.

Asaad W, Rainer G, Miller E. Task-specific neural activity in the primate prefrontal cortex. *J Neurophysiol* 84: 451–459, 2000.

Aznavour N, Mechawar N, Descarries L. **Comparative analysis of** cholinergic innervation in the dorsal hippocampus of adult mouse and rat: A quantitative immunocytochemical study. *Hippocampus* 12: 406–417, 2002.

Bach y Rita P. Neurophysiology of eye movements. En P. Bach-y-Rita y CL Collins (Eds.). *The control of eye movements.* New York: Academic Press. 1971.

Balsalobre-Fernández C, Tejero-González C, del Campo-Vecino J, Alonso-Curiel D. Hypoxic exposure as a means of increasing sporting performance: fact or fiction? *Rev Int Med Cienc Act Fis Deport*, in press. ISSN: 1577-0354, 2013.

Banderet LE y Burse RL. Effects of high terrestrial altitude on military performance. In R. Gal and D. Mangeisdorff (Eds), *Handbook of Military Psychology*, Wiley, New York, 233-254. 1991.

Bannerman DM, Deacon RM, Offen S, Friswell, J, Grubb, M, Rawlins, J. Double dissociation of function within the hippocampus: Spatial memory and hyponeophagia. *Behavioral Neuroscience* 116 (5): 884–901. 2002.

Bano D y Nicotera P. Ca²⁺ signals and neuronal death in brain ischemia. *Stroke*, 38, No. 2, 674–676. 2007.

Barkai E, Bergman R, Horwitz G, Hasselmo M. Modulation of associative memory function in a biophysical simulation of rat piriform cortex. *J Neurophysiol* 72:659-677. 1994.

Barnett P y Rosenberry TL. Catalysis by acetylcholinesterase. Acceleration of the hydrolysis of neutral acetic acid esters by certain aromatic cations, *J.Biol.Chem.* 252 (20): 7200-7206. 1977.

Barone F, White R, Spera P, Ellison J. Ischemic preconditioning and brain tolerance: temporal histological and functional outcomes, protein synthesis requirement, and interleukin-1 receptor antagonist and early gene expression. *Stroke*;29(9):1937–51. 1998.

Barrett-O'Keefe Z, Helgerud J, Wagner P, Richardson S. Maximal strength training and increased work efficiency: Contribution from the trained muscle bed. *J Appl Physiol*, in press, 2012.

Baxter M, Bucci D, Sobel T, Williams M, Gorman L, Gallagher M. Intact spatial learning following lesions of basal forebrain cholinergic neurons. *NeuroReport* 7:1417–1420. 1996.

Baxter M, Gallagher M. Intact spatial learning in both young and aged rats following selective removal of hippocampal cholinergic input. *Behav Neurosci* 110:460–467. 1996.

Becker J, Olton D, Anderson CA, Breitinger E. Cognitive mapping in rats: the role of the hippocampal and frontal system in

retention and reversal. *Behav Brain Res* 3:1–22. 1981.

Becker W y Fuchs A. Lid-eye coordination during vertical gaze changes in man and monkey. *J Neurophysiol*; 60:1227–52. 1988.

Becker JT, Walker JA, Olton, DS. Neuroanatomical bases of spatial memory. *Brain Research* 200 (2): 307–320. 1980.

Behar K, Den Hollander J, Stromski M, y cols. High-resolution 1H nuclear magnetic resonance study of cerebral hypoxia in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*; 80:4945-8. 1983.

Benveniste H, Jørgensen M, Diemer N, Hansen A. Calcium accumulation by glutamate receptor activation is involved in hippocampal cell damage after ischemia. *Acta Neurol Scand* 78(6):529–536. 1988.

Berger-Sweeney J. The cholinergic basal forebrain system during development and its influence on cognitive processes: important questions and potential answers. *Neurosci Behav Rev*; 27:401–11. 2003.

Berquin P, Bodineau L, Gros F, y Larnicol N. Brainstem and hypothalamic areas involved in respiratory chemoreflexes: A Fos study in adult rats. *Brain Res* 857:30-40, 2000.

Bickler P, Donohoe P y Buck L. Molecular adaptations for survival during anoxia: lessons from lower vertebrates. *Neuroscience* 8: 234–242, 2002.

Bigl V, Arendt T, Biesold D. The nucleus basalis of Meynert during aging and in dementing neuropsychiatric disorders. In: Steriade M, Biesold D, editors. *Brain cholinergic systems*. Oxford: Oxford University Press; p. 364–86. 1990.

Bissonnette J. Mechanisms regulating hypoxic respiratory depression during fetal and postnatal life. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 278: R1391–R1400, 2000.

Blitzer R, Gil O, Landau E. Cholinergic stimulation enhances long-term potentiation in the CA1 region of rat hippocampus. *Neurosci Lett* 119:207-210. 1990.

Bodis-Wollner I, Bucher S, Seelos K. Cortical activation patterns during voluntary blinks and voluntary saccades. *Neurology*. 53:1800–1805. 1999.

Boele H, Koekkoek S, De Zeeuw C. Cerebellar and extracerebellar involvement in mouse eyeblink conditioning: the ACDC model. *Front Cell Neurosci*.; 3:19. 2010.

Boess F, Hendrix M, Van Der Staay F, Erb C, Schreiber R, Van Staveren W, De Vente J, Prickaerts J, Blokland A, y Koenig G. Inhibition of phosphodiesterase 2 increases neuronal cGMP, synaptic plasticity and memory performance. *Neuropharmacology* 47:1081-1092. 2004.

Bogolepov N. Ultrastructure of the Brain in Hypoxia. Mir Publishers: Moscú, 1985.

Bohnen N, Kaufer D, Hendrickson R, Ivanco L, Lopresti B, Davis J, Constantine G, Mathis C, Moore R, DeKosky S. Cognitive correlates of alterations in acetylcholinesterase in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 380(1–2):127–132. 2005.

Bohnen N, Kaufer D, Hendrickson R, Ivanco L, Lopresti B, Koeppe R, Meltzer C, Constantine G, Davis J, Mathis C, Dekosky S, Moore R. Degree of inhibition of cortical acetylcholinesterase activity and cognitive effects by donepezil treatment in Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 76: 315–319, 2005.

Bohnen N, Kaufer D, Hendrickson R, Ivanco L, Lopresti B, Mathis G, Constantine C, Davis J, Moore R, Dekosky S. Cognitive correlates of cortical cholinergic denervation in Parkinson's disease and parkinsonian dementia. *J Neurol* 253(2): 242–247. 2006.

Bonfante-Cabarcas R, Bravo I, Nello C, Gutiérrez-Reyes E, Loureiro Dos Santos NE, Moreno-Yanes JA. Pharmacological doses of Zn²⁺ induce a muscarinic cholinergic supersensitivity. *J Biomed Sci* 9(6 Pt 2):639–644. 2002.

Bristow D, Frith CD, y Rees G. Two distinct neural effects of blinking on human visual processing. *NeuroImage*, 27, 136–145. 2005.

Brun VH, Otnaess MK, Molden S, Steffenach H, Witter MP, Moser M, Moser EI. Place cells and place recognition maintained by direct entorhinal-hippocampal circuitry. *Science* 296 (5576): 2243–2246. 2002.

Bruner AC. Conducta de comer: variables comunes a través del condicionamiento

Bibliografía

y la motivación. *Revista Mexicana de Análisis de la Conducta*, 36(2), 9-20. 2010.

Bunch ME. The effects of pre- and postnatal anoxia upon learning and memory ability at maturity. *Science*, 116, 517. 1952.

Bussey TJ y Saksida LM. Memory, perception, and the ventral visual-perirhinal-hippocampal stream: thinking outside of the boxes. *Hippocampus* 17(9):898-908. 2007.

Carew, TJ., y Kandel, ER. Acquisition and retention of long-term habituation in *Aplysia*: correlation of behavioral and cellular processes. *Science* 182, 1158-1160. 1973.

Carmeliet, P. Angiogenesis in health and disease. *Nat. Med.* 9, 653-660. 2003.

Carrive P, Kehoe EJ, Macrae M, y Paxinos G. Fos-like immunoreactivity in locus coeruleus after classical conditioning of the rabbit's nictitating membrane response. *Neurosci. Lett.* 223: 33-36. 1997.

Cassel JC, Duconseille E, Jeltsch H, Will B. The fimbria-fornix/cingular bundle pathways: A review of neurochemical and behavioural approaches using lesions and transplantation techniques. *Prog Neurobiol* 51:663-716. 1997.

Cavaletti G, Garavaglia P, Arragoni G, Tredici G., Persistent memory impairment after high altitude climbing. *Int. J. Sports Med.* 11, 176-178. 1990.

Chapman P, Steinmetz J, Sears L, y Thompson R. Effects of lidocaine injection in the interpositus nucleus and red nucleus on conditioned behavioral and neuronal responses. *Brain Research*, 537(1-2): 149-156. 1990.

Chapman R, Stray-Gundersen J, Levine B. Individual variation in response to altitude training. *J Appl Physiol* 85: 1448-1456, 1998.

Chapman PF, Steinmetz JE, Sears LL, Thompson RF. Effects of lidocaine injection in the interpositus nucleus and red nucleus on conditioned behavioral and neural responses. *Brain Res.* 537: 149-156. 1990.

Chleide E, Ishikawa K. Hypoxia-induced decrease of brain acetylcholine release detected by microdialysis. *Neuroreport* 1: 197-199. 1990.

Choi D, Lobner D y Dugan L, "Glutamate receptor-mediated neuronal death in the ischemic brain," in: *Ischemic Stroke: From Basic Mechanisms to New Drug Development. Monographs in Clinical Neuroscience*, 16, 2-13. 1998.

Choi DW. Ischaemia induced neuronal apoptosis. *Curr. Opin. Neurobiol.* 6, 667-672. 1996.

Clark RE y Squire LR. Classical conditioning and brain systems: the role of awareness. *Science*, 280:77-81, 1998.

Colby CL. y Goldberg ME. Space and attention in parietal cortex. *Annual Review of Neuroscience* 22: 319-349. 1999.

Cole MR, y Chappell-Stephenson. Exploring the limits of spatial memory using very large mazes. *Learning & Behavior*, 31, 349-368. 2003.

Colt HG, Haas H, Rich GB. Hypoxemia vs. sleep fragmentation as cause of excessive daytime sleepiness in obstructive sleep apnea. *Chest*;100:1542-8. 1991.

Commins S, Aggleton JP., y O'Mara SM. Physiological evidence for a possible projection from dorsal subiculum to hippocampal area CA1. *Exp Brain Res*, 146(2), 155-160. 2002.

Corbit LH, y Balleine BW. The role of the hippocampus in instrumental conditioning. *J Neurosci*, 20(11), 4233-4239. 2000.

Crusio WE y Schwegler. "Learning spatial orientation tasks in the radial-maze and structural variation in the hippocampus in inbred mice". *Behavioral and Brain Functions* 1 (1): 3. 2005.

Davis H, Kamimori G, Kulesh D, y cols. Visual performance with the aviator night vision imaging system (ANVIS) at a simulated altitude of 4300 meters. *Aviat Space Environ Med*; 66:430-4. 1995.

Davis JN y Carlsson. Effect of hypoxia on tyrosine and tryptophan hydroxylation in unanaesthetized rat brain. *Journal of Neurochemistry*, 20: 913-915. 1973.

Davis S, Butcher S, Morris RG. The NMDA receptor antagonist D-2-amino-5-phosphonopentanoate (D-AP5) impairs spatial learning and LTP in vivo at intracerebral

concentrations comparable to those that block LTP in vitro. *J. Neurosci.* 12 (1): 21–34. 1992.

Delgado-García JM y Gruart A. The role of interpositus nucleus in eyelid conditioned responses. *The Cerebellum*, 1: 289-308. 2002.

Delgado-García JM, Evinger JM, Escudero C, Baker R. Behavior of accessory abducens and abducens motoneurons during eye retraction and rotation in the alert cat. *J Neurophysiol.* 64: 413-422. 1990.

Delgado-García JM, Ferrús A, Mora F, Rubia FJ. Manual de Neurociencia. Editorial Síntesis, Madrid, España, pp. 841. 1998.

Delgado-García JM, Gruart A, Domingo JA, Trigo JA. Quantal neural mechanism underlying movement execution and motor learning. En: *Biological and artificial computation: from Neuroscience to technology.* Mira, J., Moreno Díaz, R., Cabestany, J. (Eds.). Springer-Verlag, Berlín, Alemania, pp. 124-132. 1997.

Desimone, R. Neural mechanisms for visual memory and their role in attention. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 93, 13494–13499. 1996.

Dickinson J. High altitude cerebral edema: cerebral acute mountain sickness. *Semin Respir Med*; 5:151-8. 1983.

Domínguez del Toro E, Rodríguez Moreno A, Porrás García E, Sánchez Campusano R, Blanchard V, Laville M, Bohme GA, Benavides J, y Delgado García JM. An in vitro and in vivo study of early deficits in associative learning in transgenic mice that over-express a mutant form of human APP associated with Alzheimer's disease. *Eur J Neurosci* 20: 1945-1952, 2004.

Domínguez-del-Toro E, Rodríguez-Moreno A, Porrás-García E, Sánchez-Campusano R, Blanchard V, Laville M, Bohme GA, Benavides J y Delgado-García JM. An in vitro and in vivo study of early deficits in associative learning in transgenic mice that over-express a mutant form of human APP associated with Alzheimer's disease. *The European Journal of Neuroscience*, 20(7): 1945-1952. 2004.

Eckenstein F, Baughman R, Quinn J. An anatomical study of cholinergic innervation in rat cerebral cortex. *Neurosci* 25: 457-474, 1988.

Eckenstein F y Thoenen H. Cholinergic neurons in the rat cerebral cortex demonstrated by immunohistochemical localization of choline acetyltransferase. *Neurosci. Lett.*, 36. 211-215. 1983.

Emi K, Kohda K, Kakegawa W, Narumi S, Yuzaki M. *Neurochem Res.* A new rapid protocol for eyeblink conditioning to assess cerebellar motor learning. 36(7):1314-22. 2011.

Erickson J. y Millhorn D. Fos-like protein is induced in neurons of the medulla oblongata after stimulation of the carotid sinus nerve in awake and anesthetized rats. *Brain Res* 567: 11–24, 1991.

Evinger C. A brain stem reflex in the blink of an eye. *NIPS* 10: 147-153. 1995.

Evinger C, Manning KA, Sibony PA. Eyelid movements. Mechanisms and normal data. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 32: 387-400. 1991.

Evinger C, Shaw MD, Peck CK, Manning KA, Baker R. Blinking and associated eye movements in human, guinea pigs and rabbits. *J Neurophysiol.* 52: 323-339. 1984.

Feig S y Lipton P. Pairing the cholinergic agonist carbachol with patterned schaffer collateral stimulation initiates protein synthesis in hippocampal CA1 pyramidal cell dendrites via a muscarinic, NMDAdependent mechanism *J Neurosci* 13:1010-1021. 1993.

Fonnum F. The 'Compartmentation' of Choline Acetyltransferase within the Synaptosome. *Biochem. J.* 100, 479. 1966.

Förander P, Söderström S, Humpel C, Strömberg I. Chronic infusion of nerve growth factor into rat striatum increases cholinergic markers and inhibits striatal neuronal discharge rate., 8, pp. 1822–1832. 1996.

Foster H, Soto R, Dempsey J, Hosko M. Effect of sojourn at 4300 m altitude on electroencephalogram and visual evoked response. *J Appl Physiol*; 39:109-13. 1975.

Freeman GB, Nielsen P y Gibson GE. Monoamine neurotransmitter metabolism and locomotor activity during chemical hypoxia, *J. Neurochem.*, 46 733-738. 1986.

Frotscher M. Cholinergic neurons in the rat hippocampus do not compensate for the

Bibliografía

loss of septohippocampal cholinergic fibers. *Neurosci Lett* 87:18–22. 1987.

Fuchs A, Becjer W, Ling L, Langer T, y Kaneko C. Discharge patterns of levator palpebrae superioris motoneurons during vertical lid and eye movements in the monkey. *Journal of Neurophysiology*, 68: 233-243. 1992.

Fujii S, Jia Y, Yang A, Sumikawa K. Nicotine reverses GABAergic inhibition of long-term potentiation induction in the hippocampal CA1 region. *Brain Res* 863:259–265. 2000.

Fuster JM. Executive frontal functions. *Exp. Brain Res.* 133, 66–70. 2000.

Fyhn M, Hafting T, Witter MP, Moser EI, Moser MB. Grid cells in mice. *Hippocampus* 18 (12): 1230–1238. 2008.

Fyhn M, Molden S, Witter M, Moser E, Moser M. Spatial representation in the entorhinal cortex. *Science* 305 (5688): 1258–1264. 2004.

Gage FH, Björklund A, Stenevi U. Reinnervation of the partially deafferented hippocampus by compensatory collateral sprouting from spared cholinergic and noradrenergic afferents. *Brain Res* 268:27–37. 1983.

Gallagher SA, y Hackett PH. High-altitude illness. *Emerg. Med. Clin. North Am.* 22:329–355. 2004.

Gassmann M, Tissot van Patot M, Soliz J. The neuronal control of hypoxic ventilation: erythropoietin and sexual dimorphism. *Ann N Y Acad Sci* 1177: 151–161, 2009.

Gattas R, Sousa A, Mishkin M, Ungerleider L. Cortical projections of area V2 in the macaque. *Cereb Cortex.*;7:110–129. 1997.

Gaykema R, Van der Kuil J, Hersh LB, y Luiten PGM. Patterns of direct projections from the hippocampus to the medial septum-diagonal band complex: Anterograde tracing with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin combined with immunohistochemistry of choline acetyltransferase. *Neuroscience* 43, 349–369. 1991.

Gibson GE. Cerebral energy metabolism and metabolic encephalopathy. En:

McCandless DW 8ed. *Hypoxia*. Plenum Press: New York. 1985.

Gibson GE y Biass JP. Impaired synthesis of acetylcholine in brain accompanying mild hypoxic and hypoglycemia, *J. Neurochem.*, 27 37-42. 1976.

Gibson GE y Duffy TE. Impaired synthesis of acetylcholine by mild hypoxic hypoxia or nitrous oxide, *J. Neurochem.*, 36 28-33. 1981.

Gibson GE, Pulsinelli W, Blass JP y Duffy TE. Brain dysfunction in mild to moderate hypoxia, *Am. J. Med.*, 70 1247-1254. 1981.

Gilbert PE. y Brushfield AM. The role of the CA3 hippocampal subregion in spatial memory: a process oriented behavioral assessment. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 33(5): 774–781. 2009.

Giurgea C, Lefevre D, Lescrenier C, David-Remade M. Pharmacological protection against hypoxia induced amnesia in rats. *Psychopharmacologia (BEE.)* 20, 160--168 1971.

Glicksman MA. Localization of the motoneurons controlling the extraocular muscles of the rats. *Brain research*, 188: 53-62. 1980.

Goodrich-Hunsaker N, Hunsaker M, Kesner P. The interactions and dissociations of the dorsal hippocampus subregions: how the dentate gyrus, CA3, and CA1 process spatial information. *Behav Neurosci.* 122 (1): 16–26. 2008.

Gormezano I, Schneiderman N, Deaux E y Fuentes I. Nictitating membrane: classical conditioning and extinction in the albino rabbit. *Science*, 138: 33-34. 1962.

Gormezano I. Investigations of defense and reward conditioning in the rabbit. En *Black AH y Prokasy WF (Eds.). Classical conditioning II: Current research and theory.* Appleton-Century-Crofts. 1972.

Gormezano I, Kehoe RJ, Marshall-Goodell BS. Twenty years of classical conditioning research with the rabbit. En: *Progress in Physiological Psychology.* Sprague, J.M., Epstein, A.N. (Eds.). Academic Press, Nueva York, USA, pp. 197-275. 1983.

Gozal D y Gozal E. Episodic hypoxia enhances late hypoxic ventilation in developing

rat: putative role of neuronal NO synthase. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*. 276:R17–R22. 1999.

Grant D. y Schneider D. Intensity of the conditioned stimulus and strength of conditioning: I. The conditioned eyelid response to light. *Journal of Experimental Psychology*, 38: 690-696. 1948.

Grant K, Guégan M, Horcholle Bossavit G. The anatomical relationship of the retractor bulbi and posterior digastric motoneurons to the abducens and facial nucleus in the cat. *Arch Ital Biol*. 119: 195-207. 1981.

Groenewegen H. Organization of the afferent connections of the mediodorsal thalamic nucleus in the rat related to the mediodorsal-prefrontal topography. *Neuroscience* 24:379-431; 1988.

Grossrubatscher M. Pilots Reference Guide Hardcover. Publisher, Selbstverl, p. 280. 2007.

Gruart A. Fisiología del condicionamiento clásico del reflejo corneal. *Actas de Fisiología*, 6: 7-37. 2000.

Gruart A, Guillazo-Blanch G, Fernández-Mas R, Jiménez-Díaz L y Delgado-García JM. Cerebellar posterior interpositus nucleus as an enhancer of classically conditioned eyelid responses in alert cats. *Journal of Neurophysiology*, 84(5): 2680- 2690. 2000a.

Gruart A, Morcuende S, Martínez S, Delgado-García JM. Involvement of cerebral cortical structures in the classical conditioning of eyelid responses in rabbits. *Neuroscience* 100:719 –730. 2000b.

Gruart A, Schreurs BG, Domínguez del Toro E, Delgado-García, JM. Kinetic and frequency-domain properties of reflex and conditioned eyelid responses in rabbit. *JNeurophysiol*. 83: 836-852. 2000c.

Gruart A, Blázquez P, Delgado-García JM. Kinematics of spontaneous, reflex and conditioned eyelid movements in the alert cat. *J Neurophysiol*. 74: 226-248. 1995.

Gruart A, Pastor AM, Armengol JA, Delgado-García JM. Involvement of cerebellar cortex and nuclei in the genesis and control of unconditioned and conditioned eyelid motor responses. *Prog Brain Res*. 114: 511-528. 1997.

Gruart A, Muñoz MD, Delgado-García JM. Involvement of the CA3-CA1 synapse in the acquisition of associative learning in behaving mice. *J Neurosci*. 26(4):1077-87. 2006.

Gureviciene I, Ikonen S, Gurevicius K, Sarkaki A, van Groen T, Pussinen R, Ylinen A, Tanila H, Normal induction but accelerated decay of LTP in APP+PS1 transgenic mice. *Neurobiol. Dis*. 15, 188–195. 2004.

Hackett P y Roach C. High-altitude illness. *N Engl J Med*;345(2):107-14. 2001.

Hafting T, Fyhn M, Molden S, Moser M, Moser E. Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex. *Nature* 436 (7052): 801–806. 2005.

Halperin M, MacFarland R, Niven J, Roughton F. The time course of the effects of carbon monoxide on visual thresholds. *J Physiol*;146:583. 1959.

Hamlin M. y Hellemans J. Effect of intermittent normobaric hypoxic exposure at rest on haematological, physiological, and performance parameters in multi-sport athletes. *Journal of Sports Science*, 25(4), 431-441. 2007.

Hari R., Salmellin R, Tissari S, Kajola M, Virsu V. Visual stability during eyeblinks. *Nature* 367, 121–122. 1994.

Hasselmo M y Bower J. Acetylcholine and memory. *Trends Neurosci* 16:218-222. 1993.

Hasselmo M. Acetylcholine and learning in a cortical associative memory. *Neural Comp* 5:32-44. 1993.

Hasselmo M. Neuromodulation and cortical function: modeling the physiological basis of behavior. *Behav Brain Res* 67:1-27. 1995.

Hasselmo M, Anderson B, Bower J. Cholinergic modulation of cortical associative memory function. *J Neurophysiol* 67: 1230-1246. 1992.

Hasselmo M y Bower J. Cholinergic suppression specific to intrinsic not afferent fiber synapses in rat piriform (olfactory) cortex. *J Neurophysiol* 67: 1222-1229. 1992.

Hasselmo M y Schnell E. Laminar selectivity of the cholinergic suppression of synaptic transmission in rat hippocampal region

CA1: computational modeling and brain slice physiology. *J Neurosci* 14, 3898-3914. 1994.

Hasselmo ME y Barkai E. Cholinergic modulation of activity-dependent synaptic plasticity in rat piriform cortex. *J. Neurosci.* 15(10): 6592-6604. 1995.

Hasselmo M y Wyble B. Simulation of the effects of scopolamine on free recall and recognition in a network model of the hippocampus. *Behav. Brain Res.* 89: 1-34. 1997.

Hayes K. Anoxic and convulsive amnesia in rats. *J. comp. physiol. Psychol.* 46, 216—217. 1953.

Hebert A y Dash P. Nonredundant roles for hippocampal and entorhinal cortical plasticity in spatial memory storage". *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 79: 143–153. 2004.

Hegde J y Van Essen D. Selectivity for complex shapes in primate visual area V2. *J. Neurosci.* 20:RC61-66. 2000.

Heinicke K, Prommer N, Cajjal J, Viola T, Behn C, Schmidt W. Long-term exposure to intermittent hypoxia results in increased hemoglobin mass, reduced plasma volume, and elevated erythropoietin plasma levels in man. *Eur J Appl Physiol.* 88:535-543. 2003.

Hendriksen I y Meeuwssen T. The effect of intermittent training in hypobaric hypoxia on sea-level exercise: a cross-over study in humans. *European Journal of Applied Physiology*, 88(4/5), 396-403. 2003.

Hiraoka M, y Shimamura M. Neural mechanisms of the corneal blinking reflex in cats. *Brain Research*, 125, 265-275. 1977.

Hirotsu I, Hori N, Katsuda N, Ishihara T. Effect of an anticholinergic drug on long-term potentiation in rat hippocampal slices. *Brain Res* 482:194-197. 1989.

Holstege G, Tan J, Van Ham J, Graveland GA. Anatomical observations on the afferent projections to the retractor bulbi motoneuronal cell group and other pathways possibly related to the blink reflex in the cat. *Brain Res* 374:321–334. 1986a.

Holstege G, Van Ham J, Tan J. Afferent projections to the orbicularis oculi

motoneuronal cell group: an autoradiographical tracing study in the cat. *Brain Res* 374:360–320. 1986b.

Hoover WB y Vertes RP. Anatomical analysis of afferent projections to the medial prefrontal cortex in the rat. *Brain Struct Funct*, 212(2), 149-179. 2007.

Horn E y Waldrop T. Oxygen-sensing neurons in the caudal hypothalamus and their role in cardiorespiratory control. *Respir Physiol* 110: 219–228, 1997.

Hornbein TF, Townes BD, Schoene RB, Sutton JR, Houston CS. The cost to the central nervous system of climbing to extremely high altitude. *N. Engl. J. Med.* 321, 1714–1719. 1989.

Houser C, Crawford G, Barber R, Salvaterra P, Vaughn J. Organization and morphological characteristics of cholinergic neurons: an immunocytochemical study with a monoclonal antibody to choline acetyltransferase. *Brain Res* 266:97–119. 1983.

Hsu S y Raine L. Protein A avidin and biotin in immunocytochemistry. *J Histochem Cytochem* 29: 1349-1353, 1981.

Huerta P y Lisman J. Heightened synaptic plasticity of hippocampal CA1 neurons during a cholinergically induced rhythmic state. *Nature* 364:723-725. 1994.

Hurder WP. Changes in maze performance in rats following exposure to anoxia. *British Journal of Comparative Physiology*, 44, 473-478. 1951.

Ison J y Allen P. Low-frequency tone pips elicit exaggerated startle reflexes in C57BL/6J mice with hearing loss. *J Assoc Res Otolaryngol* 4:495-504. 2003.

Iwasaki K, Kitamura Y, Ohgami Y, Mishima K, Fujiwara M. The disruption of spatial cognition and changes in brain amino acid, monoamine and acetylcholine in rats with transient cerebral ischemia. *Brain Res* 709:163–172. 1996.

Jänicke B y Schulze G. Influence of normobaric hypoxia on learning capacity in different aged rats. *Neurobiol. Aging* 9:495-500; 1987.

- Jarrard LE.** The hippocampus and motivation. *Psychol Bull*; 79:1–12. 1973.
- Jarrard L. E.** What does the hippocampus really do? *Behav Brain Res*, 71(1-2), 1-10. 1995.
- Jiménez-Díaz L, Sancho-Bielsa F, Gruart A, López-García, C, Delgado-García JM.** Evolution of cerebral cortex involvement in the acquisition of associative learning. *Behav Neurosci* 120: 1043-1056, 2006.
- Johnson D, Zambon N, Gibbs R.** Selective lesion of cholinergic neurons in the medial septum by 192 IgG-saporin impairs learning in a delayed matching to position T-maze paradigm. *Brain Res* 943:132–141. 2002.
- Kakinuma Y, Ando M, Kuwabara M, Katare R, Okudela K, Kobayashi M, Sato T.** Acetylcholine from vagal stimulation protects cardiomyocytes against ischemia and hypoxia involving additive non-hypoxic induction of HIF-1alpha. *579*: 2111–8. 2005.
- Kakinuma Y, Furihata M, Akiyama T, Arikawa M, Handa T, Katare R, Sato T.** Donepezil, an acetylcholinesterase inhibitor against Alzheimer's dementia, promotes angiogenesis in an ischemic hind limb model. *J Mol Cell Cardiol* 48: 680-693, 2010.
- Kalen P y Wiklund L.** Projections from the medial septum and diagonal band of Broca to the dorsal and central superior raphe nuclei: a non-cholinergic pathway, *Exp Brain Res* 75(2):401–416, 1989.
- Kaminer J, Powers A, Horn K, Hui C, Evinger C.** Characterizing the Spontaneous Blink Generator: An Animal Model. *The Journal of Neuroscience*, 31(31):11256–11267. 2011.
- Kandel E, Kupfermann I y Iversen.** Learning and memory. En: Kandel ER, Schwartz JH y Jessell TM (Eds). *Principios de Neurociencia*. 4ª edición. Editorial McGraw-Hill. 2000.
- Katayama K, Sato Y, Ishida K, Mori S y Miyamura M.** The effects of intermittent exposure to hypoxia during endurance exercise training on the ventilatory responses to hypoxia and hypercapnia in humans. *European Journal of Applied Physiology & Occupational Physiology*, 78(3), 189-194. 1998.
- Kesner R y Holbrook T.** Dissociation of item and order spatial memory in rats following medial prefrontal cortex lesions. *Neuropsychologia* 25 (4): 653–664. 1987.
- Kim J, Clark R y Thompson R.** Hippampectomy impairs the memory of recently but not remotely, acquired trace eyeblink conditioned responses. *Behavioral Neuroscience*, 109(2): 195-203. 1995.
- Kim J y Levin E.** Nicotinic, muscarinic and dopaminergic actions in the ventral hippocampus and the nucleus accumbens: effects on spatial working memory in rats. *Brain Res* 725:231–240. 1996.
- Kobayashi S, Nomoto K, Watanabe M, Hikosaka O, Schultz W, Sakagami M.** Influences of rewarding and aversive outcomes on activity in macaque lateral prefrontal cortex. *Neuron* 51: 861–870, 2006.
- Kobayashi S, Schultz W, Sakagami M.** Operant conditioning of primate prefrontal neurons. *J Neurophysiol*. 103(4):1843-55. 2010.
- Koch M. y Schnitzler H.-U.** The acoustic startle response in rats-circuits mediating evocation, inhibition and potentiation. *Behav. Brain Res*. 89, 35-49. 1997.
- Kugelberg E.** Facial reflexes. *Brain*; 75: 385–96. 1952.
- Kuhl DE, Koeppe RA, Minoshima S, y cols.** In vivo mapping of cerebral acetylcholinesterase activity in aging and Alzheimer's disease. *Neurology*; 52:691–9. 1999.
- Kumura E, Yoshimine T, Iwatsuki KI, Yamanaka K, Tanaka S, Hayakawa T, Shiga T, Kosaka H.** Generation of nitric oxide and superoxide during reperfusion after focal cerebral ischemia in rats. *Am. J. Physiol*. 270, C748–C752. 1996.
- Larnicol N, Wallois F, Berquin P, Gros F, y Rose D.** C-fos-like immunoreactivity in the cat's neuraxis following moderate hypoxia or hypercapnia. *J Physiol*. 88: 81–88. 1994.
- Latshang T, Turk A, Hess T, Schoch O, Bosh M, Barthelmes D, Mertz T, Hefti U, Hefti J, Maggiorini M, Bloch K.** Acclimatization improves submaximal exercise economy at 5533 m. *Scand J Med Sci Sports* 3/11: 1-10, 2011.

- Lau B y Glimcher P.** Value representation in the primate striatum during matching behavior. *Neuron* 58: 451–463, 2008.
- Lee I y Kesner R.** Time-dependent relationship between the dorsal hippocampus and the prefrontal cortex in spatial memory. *The Journal of Neuroscience* 23 (4): 1517–1523. 2003.
- Lee I y Kesner R.** Differential contribution of NMDA receptors in hippocampal subregions to spatial working memory. *Nature Neuroscience* 5 (2): 162–168. 2002.
- Lee T y Kim JJ.** Differential effects of cerebellar, amygdalar, and hippocampal lesions on classical eyeblink conditioning. *J. Neurosci.* 24, 3242–3250. 2004.
- Leifflen D, Poquin D, Savourey G, Barraud P, Raphel C, Bittel J.** Cognitive performance during short acclimation to severe hypoxia. *Aviat Space Environ Med* 68: 993-997, 1997.
- Leung L. y Vanderwolf C.** Behavior-dependent evoked potentials in the hippocampal CA1 region of the rat. II. Effect of eserine, atropine, ether and pentobarbital. *Brain Res*, 198(1), 119-133. 1980.
- Levey A, Wainer B, Rye D, Mufson E. y Mesulam M.** Choline acetyltransferase immunoreactive neurons intrinsic for rodent cortex and distribution from acetylcholinesterase-positive neurons, *Neuroscience*, 13 341-353. 1984.
- Levine BD y Stray-Gundersen J.** Living high-training low: effect of moderate-altitude acclimatization with low-altitude training on performance. *Journal of Applied Physiology*, 83(1), 102-112. 1997.
- Lewis P. y Shute C.** The cholinergic limbic system: Projections to hippocampal formation, medial cortex nuclei of the ascending cholinergic reticular system and the subfornical organ and supra-optic crest. *Brain* 90, 521–537. 1967.
- Lhermitte F.** Human autonomy and the frontal lobes. Part II: Patient behavior in complex and social situations: the “environmental dependency syndrome.” *Ann Neurol* 19: 335–343, 1986.
- Li P, Zhang G, You H, Zheng R, Gao Y.** Training-dependent cognitive advantage is suppressed at high altitude. *Physiol Behav* 106: 439–445, 2012.
- Liang K, Hon W, Tyan Y, Liao W.** "Involvement of hippocampal NMDA and AMPA receptors in acquisition, formation and retrieval of spatial memory in the Morris water maze". *Chin J Physiol* 37 (4): 201–12. 1994.
- Liu Y, Christou H, Morita T, Laughner E, Semenza GL, and Kourembanas S.** Carbon monoxide and nitric oxide suppress the hypoxic induction of vascular endothelial growth factor gene via the 5' enhancer. *J Biol Chem* 273:15257 15262, 1998.
- Liu P y Bilkey DK.** "Perirhinal cortex contributions to performance in the Morris water maze". *Behavioral Neuroscience* 112 (2): 304–315. 1998.
- Liu P y Bilkey DK.** "The effect of excitotoxic lesions centered on the hippocampus or perirhinal cortex in object recognition and spatial memory tasks". *Behavioral Neuroscience* 115 (1): 94–111. 2001.
- Llinás R y Welsh J.** On the cerebellum and motor learning. *Current Opinion in Neurobiology*, 3(6): 958-965. 1993.
- Lopez-Aranda M, Lopez-Tellez J, Navarro-Lobato I, Masmudi-Martín M, Gutierrez A, Khan Z.** Role of layer 6 of V2 visual cortex in object-recognition memory. *Science* 325(5936):87-89. 2009.
- López-Barneo J, López-López JR, Urena J, y González C.** Chemotransduction in the carotid body: K₊ current modulated by PO₂ in type I chemoreceptor cells. *Science* 241: 580–582, 1988.
- López-Barneo J, Pardal R, y Ortega-Sáenz P.** Cellular mechanism of oxygen sensing. *Annu Rev Physiol* 63: 259–287, 2001.
- López-Ramos JC, Yi PJ, Eleore L, Madroñal N, Rueda A, Delgado-García JM.** Classical eyeblink conditioning during acute hypobaric hypoxia is improved in acclimatized mice and involves Fos expression in selected brain areas. *J Appl Physiol* 103: 1479–1487, 2007.
- López-Ramos JC, Jurado-Parras MT, Sanfeliu C, Acuña-Castroviejo D, Delgado-**

- García JM.** Learning capabilities and CA1-prefrontal synaptic plasticity in a mice model of accelerated senescence. *Neurobiol Aging*. Mar;33(3): 627.e13-26. 2012.
- MacFarland R.** Psycho-physiological implications of life at altitude and including the role of oxygen in the process of aging. En: Yousef MK, Horvath SM, Bullard RW (eds). Academic Press: New York, 1972.
- Madroñal N, Delgado-García JM y Gruart A.** Differential Effects of Long-Term Potentiation Evoked at the CA3–CA1 Synapse before, during, and after the Acquisition of Classical Eyeblink Conditioning in Behaving Mice. *The Journal of Neuroscience*, 27(45): 12139-12146. 2007.
- Maeda T, Kaneko S, Satoh M.** Roles of endogenous cholinergic neurons in the induction of long-term potentiation at hippocampal mossy fiber synapses. *Neurosci Res* 20:71–78. 1994.
- Magalhaes J, Ascensao A, Marques F, Soares JM, Neuparth MJ, Ferreira R, Duarte, JA.** Skeletal muscle ultra structural and plasma biochemical signs of endothelial dysfunction induced by a high altitude expedition (Pumori 7161 m). *Basic Appl. Myol.* 15, 29–35. 2005.
- Maguire EA.** The retrosplenial contribution to human navigation: A review of lesion and neuroimaging findings. *Scandinavian Journal of Psychology* 42 (3): 225–238. 2001.
- Maguire E, Frackowiak R y Frith C.** Recalling routes around London: Activation of the right hippocampus in taxi drivers. *The Journal of Neuroscience* 17 (18): 7103–7110. 1997.
- Maiti P, Singh S, Mallick B, Muthuraju S, Ilavazhagan G.** High altitude memory impairment is due to neuronal apoptosis in hippocampus, cortex and striatum. *J Chem Neuroanat* 36: 227-238, 2008.
- Manning K, Riggs L, Komenda J.** Reflex eyeblinks and visual suppression. *Percept. Psychophys.* 34, 250–256. 1983.
- Marsden P y Ballermann B.** Tumor necrosis factor α activates soluble guanylate cyclase in bovine mesangial cells via an Image-arginine-dependent mechanism. *J Exp Med* 172: 1843-1852, 1990.
- Martin-Body R y Johnston B.** Central origin of the hypoxic depression of breathing in the newborn. *Respir Physiol* 71: 25–32, 1988.
- Massoulié J.** The Origin of the Molecular Diversity and Functional Anchoring of Cholinesterases. *Neurosignals* 11: 130–143, 2002.
- Matsumoto K, Suzuki W, Tanaka K.** Neuronal correlates of goal-based motor selection in the prefrontal cortex. *Science* 301: 229–232, 2003.
- McFarland N y Harber S.** Convergent Inputs from Thalamic Motor Nuclei and Frontal Cortical Areas to the Dorsal Striatum in the Primate. *The Journal of Neuroscience*, May 15, 20(10): 3798–3813. 2000.
- McGlinchey-Berroth R, Carrillo M, Gabrieli J, Brawn C, Disterhoft J.** Impaired trace eyeblink conditioning in bilateral, medialtemporal lobe amnesia. *Behav Neurosci* 111:873–882. 1997.
- McKinney M, Coyle J, Hedreen JC.** Topographic analysis of the innervation of the rat neocortex and hippocampus by the basal forebrain cholinergic system. *J Comp Neurol* 217:103–121. 1983.
- McMahan R, Sobel T, Baxter M.** Selective immunolesions of hippocampal cholinergic input fail to impair spatial working memory. *Hippocampus* 7:130–136. 1997.
- Meerson F, Isabaeva A, Ivanshina A.** Acceleration of the rate of elaboration and degree of retention of conditioned reflexes in animals adapted to altitude hypoxia. *Dokl Akad Nauk SSSR* 202: 982-984, 1972.
- Meerson F y Radzievskii S.** Effect of adaptation to altitude hypoxia in early ontogeny on the indices of higher nervous activity. *Biull Eksp Biol Med* 82: 902-903, 1976.
- Meerson F, Solomatina E, Yu I, Vikhlyayev, y cols.** *Vyssh. Nervn. Deyat*, No. 4, 751. 1973.
- Meerson F, Maizelis MYa, Malkin V y cols.** *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, 73, 227 (1969).
- Meerson FZ, Krants D, y Sadyraliev T, Tsitologiya.** No. 3, 324 (1973).
- Meeuwsen T, Hendriksen I y Holewijn M.** Training-induced increases in sea-

level performance are enhanced by acute intermittent hypobaric hypoxia. *European Journal of Applied Physiology*, 84(4). 2001.

Meshorer E, y Soreq H. Virtues and woes of AChE alternative splicing in stress-related neuropathologies. *Trends Neurosci.* 29 (4): pp. 216-24. 2006.

Mesulam M. Structure and function of cholinergic pathways in the cerebral cortex, limbic system, basal ganglia, and thalamus of the human brain, in Bloom FE, Kupfer DJ (eds): *Psychofarmacology: The fourth generation of progress.* Raven Press. pp 135-146. 1994.

Mesulam M, Mufson E, Wainer B. y Levey A. Central cholinergic pathways in the rat: an overview based on an alternative nomenclature (Ch1-Ch6), *Neuroscience* 4 1185 1201. 1983.

Milbrandt J. A nerve growth factor-induced gene encodes a possible transcriptional regulatory factor. *Science*; 238(4828): 797-9. 1987.

Miller E y Cohen J. An integrative theory of prefrontal cortex function. *Annu Rev Neurosci* 24: 167-202, 2001.

Miller O, Semenov D, y Samoilov M. Effects of in vivo hypoxic preconditioning of rats on the dynamics of intracellular calcium contents induced by prolonged anoxia in brain slices. *Byull. Eksperim. Biol. Med.*, 138, No. 10, 382-385. 2004.

Mohapel P, Leanza G, Kokaia M, Lindvall O. Forebrain acetylcholine regulates adult hippocampal neurogenesis and learning. *Neurobiol Aging* 26:939-946. 2005.

Moller P, Loft S, Lundby C, Olsen NV. Acute hypoxia and hypoxic exercise induce DNA strand breaks and oxidative DNA damage in humans. *FASEB J.* 15, 1181-1186. 2001.

Montoro R, Ureña J, Fernández-Chacón R, Álvarez de Toledo G, y López-Barneo J. Oxygen sensing by ion channels and chemotransduction in single glomus cells. *J Gen Physiol* 107: 133-143, 1996.

Morris R. Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learning and Motivation* (2): 239-260. 1981.

Moser M, Moser E. Distributed encoding and retrieval of spatial memory in the hippocampus. *The Journal of Neuroscience* 18 (18): 7535-7542. 1998.

Moult PR, Gladding CM, Sanderson TM, Fitzjohn SM, Bashir ZI, Molnar E, y Collingridge GL. Tyrosine phosphatases regulate AMPA receptor trafficking during metabotropic glutamate receptor-mediated long-term depression. *J. Neurosci.* 26, 2544-2554. 2006

Moyer J, Deyo R, Disterhoft J. Hippocampectomy disrupts trace eye-blink conditioning in rabbits. *Behav Neurosci* 104:243-252. 1990.

Mufson E, Cunningham MG. Observations on choline acetyltransferase containing structures in the CD-1 mouse brain. *Neurosci Lett* 84: 7-12, 1988.

Munera A, Gruart A, Muñoz MD, Fernandez-Mas R, Delgado-García JM. Hippocampal pyramidal cell activity encodes conditioned stimulus predictive value during classical conditioning in alert cats. *J Neurophysiol*, 86:2571-2582, 2001.

Muthuraju S, Maiti P, Pati S, Solanki P, Sharma A, Amitabh, Singh SB, Prasad D, Ilavazhagan G. Acetylcholinesterase inhibitors enhance cognitive functions in rats following hypobaric hypoxia. *Behav Brain Res* 203: 1-14, 2009.

Muthuraju S, Maiti P, Pati S, Solanki P, Sharma A, Singh S, Prasad D, Ilavazhagan G . Role of cholinergic markers on memory function of rats exposed to hypobaric hypoxia. *Eur J Pharmacol* 672: 96-105, 2011.

Muthuraju S, Maiti P, Solanki P, Sharma A, Singh S, Prasad D, Ilavazhagan G. Cholinesterase inhibitors ameliorate spatial learning deficits in rats following hypobaric hypoxia. *Exp Brain Res* 203: 583-592, 2010.

Muza S, Beidleman A, Fulco C. Altitude preexposure recommendations for inducing acclimatization. *High Alt Med Biol* 11: 87-92, 2010.

Nachmansohn D y Machado A. The formation of acetylcholine. A new enzyme: Choline acetylase. *J. Neurophysiol.* 6: 397-403. 1943.

- Nsegbe E, Vardon G, Perruchet P, Gallego J.** Classic conditioning of the ventilatory responses in rats. *J. Appl. Physiol.* 83:1174–1183. 1997.
- Neubauer J y Sunderram J.** Oxygen-sensing neurons in the central nervous system. *J Appl Physiol* 96: 367–374. 2004.
- Neubauer JA, Melton JE, y Edelman N.** Modulation of respiration during brain hypoxia. *J Appl Physiol* 68: 441–451, 1990.
- Neubauer JA.** Invited Review: Physiological and pathophysiological responses to intermittent hypoxia. *J Appl Physiol* 90: 1593–1599, 2001.
- Nieuwenhuys R, Voogd J, y Van Huizen.** *The Human Central Nervous System.* Springer-Verlag, pp. 352-353. 1998.
- Nonner D, Barrett E y Barrett J.** Neurotrophin effects on survival and expression of cholinergic properties in cultured rat septal neurons under normal and stress conditions. *J. Neurosci.* 16, 6665-6675. 1996.
- Oda Y.** Choline acetyltransferase: The structure, distribution and pathologic changes in the central nervous system. *Pathol Int* 49: 921-937, 1999.
- Olton DS, Collison C, y Werz MA.** Spatial memory and radial arm maze performance of rats. *Learning & Motivation*, 8, 289-314. 1977.
- Olton DS, y Samuelson RJ.** Remembrance of places passed: Spatial memory in rats. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, 2, 97-116. 1976.
- Otake K Reis y Ruggiero.** Afferents to the midline thalamus issue collaterals to the nucleus tractus solitarii: An anatomical basis for thalamic and visceral reflex integration. *J. Neurosci.* 14,5694-5707. 1994.
- Overend W.** Preliminary note on a new cranial reflex. *Lancet* 1: 619. 1896.
- Pacheco-Calderon R, Carretero-Guillen A, Delgado-García JM y Gruart A.** 2012. Red Nucleus Neurons Actively Contribute to the Acquisition of Classically Conditioned Eyelid Responses in Rabbits. *The Journal of Neuroscience*, 32(35): 12129-12143
- Palmer B.** 2010. Physiology and pathophysiology with ascent to altitude. *The American Journal of the Medical Sciences* 340: 69-77.
- Pandya D, Van Hoesen G, Mesulam M.** Efferent Connections of the Cingulate Gyrus in the Rhesus Monkey. *Experimental Brain Research* (1981) 42:319-330. 1981.
- Parnavelas JG., Kelly W, Franke E, Eckenstein F.** Cholinergic neurons and fibres in the rat visual cortex. *Journal of neurocytology*, 15(3), 329-336. 1986.
- Parron C, Poucet B, Save E.** Entorhinal cortex lesions impair the use of distal but not proximal landmarks during place navigation in the rat. *Behavioural Brain Research* 154 (2): 345–352. 2004.
- Parron C y Save E.** Comparison of the effects of entorhinal and retrosplenial cortical lesions on habituation, reaction to spatial and non-spatial changes during object exploration in the rat. *Neurobiology of Memory and Learning* 82: 1–11. 2004.
- Paschen W.** Glutamate excitotoxicity in transient global cerebral ischemia. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 56(1): 313–322. 1996.
- Paxinos G y Franklin K.** *The mouse brain in stereotaxic coordinates*, 2nd ed. Academic Press, London, 2001.
- Paxinos G.** *The Rat Nervous System.* San Diego, California (EE.UU.): Academic Press. 2004.
- Paxinos G.** *The mouse nervous system.* San Diego, California (EE.UU.): Academic Press. 2012.
- Paxinos G, y Franklin K.** *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates.* San Diego, California (EE.UU.): Academic Press. 2001.
- Perez-Velazquez J, Frantseva M, Carlen P.** In vitro ischemia promotes glutamate-mediated free radical generation and intracellular calcium accumulation in hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci* 17(23):9085–9094. 1997.
- Pérez-Pinzón MA, Born JG, y Centeno JM.** Calcium and increase excitability promote tolerance against anoxia in hippocampal slices. *Brain Res.*, 833, No. 1, 20–26. 1999.

- Perry EK, Kerwin J, Perry R H, Blessed G, y Fairbairn AF.** Visual hallucinations and the cholinergic system in dementia. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 53(1), 88. 1990.
- Peters A y Harriman K.** Enigmatic bipolar cell of rat visual cortex. *J Comp Neurol* 267: 409-432. 1988.
- Peterson G.** Differential projections to the hippocampus by neurons of the medial septum and the vertical limb of the diagonal band. *Brain Res* 646:129-134. 1994.
- Pilz R y Broderick K.** Role of cyclic GMP in gene regulation. *Front Bios* 10:1239-1268, 2005.
- Porter J, Burns L, y May P.** Morphological substrate for eyelid movements: innervation and structure of primate levator palpebrae superioris and orbicularis oculi muscles. *The Journal of Comparative Neurology*, 287: 64-81. 1989.
- Postovit L y Sullivan R.** Adams MA, and Graham CH. Nitric oxide signalling and cellular adaptations to changes in oxygenation. *Toxicology* 208:235-248, 2005.
- Pratt WE y Mizumori SJY.** Neurons in rat medial prefrontal cortex show anticipatory rate changes to predictable differential rewards in a spatial memory task. *Behavioural Brain Research* 123 (2): 165-183. 2001.
- Prokasy W y Whaley F.** The intertrial interval in classical conditioning. *Journal of Experimental Psychology*, 62: 560-564. 1961.
- Pugh C y Ratcliffe P.** Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat. Med.*, 9: 677-684, 2003.
- Qiu FT y von der Heydt R.** Figure and ground in the visual cortex: V2 combines stereoscopic cues with gestalt rules. *Neuron* 47: 155-166. 2005.
- Querol M.** The electroencephalogram in a group of native highlanders at 4540 meters altitude and at sea level. *Electroenceph Clin Neurophysiol*; 18: 401-8. 1965.
- Rainer G, Asaad W, Miller E.** Selective representation of relevant information by neurons in the primate prefrontal cortex. *Nature* 393:577-579, 1998.
- Ramos JM.** Long-term spatial memory in rats with hippocampal lesions. *European Journal of Neuroscience* 12 (9): 3375-3384. 2000.
- Ratcliffe P.** From erythropoietin to oxygen: hypoxia-inducible factor hydroxylases and the hypoxia signal pathway. *Blood Purif.* 20 (5): pp. 445-50. 2003.
- Reale M, Iarlori C, Gambi F, Lucci I, Salvatore M. y Gambi D.** Acetylcholinesterase inhibitors effects on oncostatin-M, interleukin-1 β and interleukin-6 release from lymphocytes of Alzheimer's disease patients. *Exp. Gerontol.* 40, 165-171. 2005.
- Reed L, Marsden P, Lasserson D, Sheldon N, Lewis P, Stanhope N, Guinan E, Kopelman M.** FDG-PET analysis and findings in amnesia resulting from hypoxia. *Memory*; 7:599-612. 1999.
- Regard M, Oelz O, Brugger P, Landis T.** Persistent cognitive impairment in climbers after repeated exposure to extreme altitude. *Neurology*; 39:210-3. 1989.
- Rescorla RA.** Behavioral studies of pavlovian conditioning. *Annu Rev Neurosci*, 11:329-352, 1988.
- Risold P.** The septal region. In: Paxinos G, (ed). *The Rat Nervous System*. Elsevier Academic Press: San Diego, pp 605-632. 2004.
- Roberts WA.** Spatial memory in the rat on a hierarchical maze. *Learning & Motivation*, 10, 117-140. 1979.
- Rodrigo J, Springall D, Uttenthal LO, Bentura ML, Abadia Molina F, Riveros Moreno V, Martinez Murillo R, Polak J, Moncada S.** Localization of nitric oxide synthase in the adult rat brain. *Philos Trans R Soc Lond B* 345: 175-221, 1994.
- Rodríguez F, Truijens M, Townsend N, Stray-Gundersen J, Gore C y Levine B.** Performance of runners and swimmers after four weeks of intermittent hypobaric hypoxic exposure plus sea level training. *Journal of Applied Physiology*, 103(5), 1523-1535. 2007.
- Rosenberry T.** Acetylcholinesterase, *Adv. Enzymol. Relat. Areas. Mol. Biol.* 43: 103-218. 1975.

- Rosenberry T, Barnett P y Mays C.** Acetylcholinesterase, Methods. Enzymol. 82 Pt A: 325-339. 1982.
- Row B, Kheirandish L, Cheng Y, Rowell P, Gozal D.** Impaired spatial working memory and altered choline acetyltransferase (CHAT) immunoreactivity and nicotinic receptor binding in rats exposed to intermittent hypoxia during sleep. Behav Brain Res 177(2):308-314. 2007.
- Rybnikova E, Tulkova E, Pelto-Huikko M, Samoilov M.** Mild preconditioning hypoxia modifies nerve growth factor-induced gene A messenger RNA expression in the rat brain induced by severe hypoxia. Neurosci Lett.329:49-52. 2002.
- Rybnikova E, Glushchenko T, Tyulkova E, Churilova A, Jaroshevich O, Baranova K. y Samoilov M.** Preconditioning induces prolonged expression of transcription factors pCREB and NF-kappa B in the neocortex of rat before and following severe hypobaric hypoxia. J. Neurochem., 106, No. 3, 1450-1458. 2008.
- Rybnikova E, Sitnik N, Glushchenko T, Tyul'kova E, y Samoilov M.** The preconditioning modified neuronal expression of apoptosis-related proteins of Bcl-2 superfamily following severe hypobaric hypoxia in rats. Brain Res., 1089, 195-202. 2006.
- Rybnikova EA, Khozhai LI, Tyulkova EI, Glushchenko TS, Sitnik N. A, Pelto-Huikko M, Otellin VA, y Samoilov MO.** Expression of early gene proteins and structural changes in brain neurons in hypobaric hypoxia and the correcting effect of preconditioning, Morfologiya, 125, No. 2, 10-15. 2005.
- Rye D, Wainer B, Mesulam M, Mufson E, Saper C.** Cortical projections arising from the basal forebrain: a study of cholinergic and noncholinergic components employing combined retrograde tracing and immunohistochemical localization of choline acetyltransferase. Neuroscience 13:627-643. 1984.
- Ryn Z.** Psychopathology in mountaineering: mental disturbances under high-altitude stress. Int J Sports Med; 9:163-9. 1988.
- Samejima K, Ueda Y, Doya K, Kimura M.** Representation of action-specific reward values in the striatum. Science 310: 1337-1340, 2005.
- Samoilov M, Rybnikova E., Tyulkova E, Vataeva L, Otellin V, Khozhai L, y Pelto-Huikko M.** Effects of hypobaric hypoxia on behavioral reactions and the expression of early genes in the rat brain: the correcting effects of preconditioning. Dokl. Ros. Akad. Nauk, 381, No. 1, 1-3. 2001.
- Samoilov MO, Rybnikova E, Sitnik N, Glushchenko T, Tyulkova EI y Grinkevich L.** Preconditioning modulates the activity of the mitogen-activated protein kinases and transcription factor c-Jun in the rat hippocampus after severe hypobaric hypoxia. Neurokhimiya, 1, No. 3, 219-226. 2007.
- Samoilov M, Sitnik N, Rybnikova E, Glushchenko T, y Tyulkova E.** Characteristics of the expression of the pro- and antiapoptotic proteins Bax and Bcl-2 in rat brain neurons in response to severe hypobaric hypoxia: the correcting effect of hypoxic preconditioning, Dokl. Ros. Akad. Nauk, 403, No. 4, 1-5. 2005.
- Sanfilippo-Cohn B, Lai S, Zhan G, y cols.** Sex differences in susceptibility to oxidative injury and sleepiness from intermittent hypoxia. Sleep; 29:152-9. 2006.
- Satoh K. y Fibiger H.** Cholinergic neurons of the laterodorsal tegmental nucleus: efferent and afferent connections. J. Comp. Neurol. 253:277-302; 1986.
- Sawaguchi T y Goldman-Rakic P.** D1 dopamine receptors in prefrontal cortex: involvement in working memory. Science 251:947-950. 1991.
- Scalia F.** The termination of retinal axons in the pretectal region of mammals. J Comp Neurol 145:223-258. 1972.
- Schliebs R y Arendt T.** The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. Behav Brain Res; 221: 555-563. 2011.
- Schliebs R y Arendt T.** The significance of the cholinergic system in the brain during aging and in Alzheimer's disease. J Neural Transm; 113:1625-44. 2006.
- Scott J, McBride R, y Schneider S.** The organization of projections from the olfactory bulb to the piriform cortex and

Bibliografía

olfactory tubercle in the rat. *J. Comp. Neurol.* 194, 519-534. 1980.

Semenov D, Samoïlov M, y Lazarewicz J. Preconditioning reduces hypoxia-evoked alterations in glutamatergic Ca²⁺ signaling in rat cortex. *Acta Neurobiol. Exp.*, 68, 169-179. 2008.

Sharma A, Kulkarni S. Evaluation of learning and memory mechanisms employing elevated plus-maze in rats and mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 16(1):117-125. 1992.

Sharma S, Rakoczy S, Brown-Borg H. Assessment of spatial memory in mice. *Life Sci* 87(17-18):521-536. 2010.

Shaw MD y Baker R. Morphology of motoneurons in a mixed motor pool of the cat facial nucleus that innervate orbicularis oculis and quadratus labii superioris, stained intracellularly with horseradish peroxidase. *Neuroscience* 14: 627-643. 1985.

Sher PK. Chronic hypoxia in neuronal cell culture metabolic consequences. *Brain and Development*, 12(3), 293-300. 1990.

Shu S, Ju G, Fan L. The glucose oxidase-DAB-nickel method in peroxidase histochemistry of the nervous system. *Neurosci Lett* 85: 169-171, 1988.

Shukitt-Hale B, Banderet LE, y Lieberman HR. Elevation-dependent symptom, mood, and performance changes produced by exposure to hypobaric hypoxia. *Int J Aviat Psychol* 8: 319-334, 1998.

Shukitt-Hale B, Kadar T, Marlowe BE, Stillman MJ, Galli RL, Levy A, y cols. Morphological alterations in the hippocampus following hypobaric hypoxia. *Hum Exp Toxicol*;15(4):312-9. 1996.

Shukitt-Hale B, Stillman MJ, Levy A, Devine JA, Lieberman HR. Nimodipine prevents the in vivo decrease in hippocampal extracellular acetylcholine produced by hypobaric hypoxia. *Brain Res* 621:291-295, 1993

Shukitt-Hale B, Stillman M, Welch D, Levy A, Devine J, y Lieberman H. Hypobaric hypoxia impairs spatial memory in an elevation-dependent fashion. *Behav Neural Biol* 62: 244-252, 1994.

Shute C y Lewis P. The ascending cholinergic reticular system: Neocortical, olfactory and subcortical projections. *Brain* 90, 497-522. 1967.

Sik A, Van Nieuwehuyzen P, Prickaerts J y Blokland A. Performance of different mouse strains in an object recognition task. *Behavioural Brain Research*, 147, 49-54. 2003.

Sillito Adam M y John A. Cholinergic modulation of the functional organization of the cat visual cortex. *Brain research* 289.1 143-155. 1983.

Skinner B. The behavior of organisms: An experimental analysis. New York: Appleton. 1938.

Slotnick S y Moo L. Prefrontal cortex hemispheric specialization for categorical and coordinate visual spatial memory. *Neuropsychologia* 44 (9): 1560-1568. 2006.

Smith M. CS-US interval and US intensity in classical conditioning of the rabbit's nictitating membrane response. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 66(3): 679-687. 1968.

Smith Z, Krizay E, Guo J, Shin D, Scadeng M, Dubowitz D. Sustained high-altitude hypoxia increases cerebral oxygen metabolism. *J Appl Physiol*, in press, 2012.

Sofroniew M, Eckenstein F, Thoenen H. y Cuello, AC. Topography of choline acetyltransferase-containing neurons in the forebrain of the rat, *Neurosci. Lett.*, 33 7 12. 1982.

Solomon I, Edelman N, y Neubauer J. The pre-Bötzinger complex functions as a central hypoxia chemoreceptor for respiration in vivo. *J Neurophysiol* 83: 2854-2868, 2000.

Spence K. y Norris E. Eyelid conditioning as a function of the inter-trial interval. *Journal of Experimental Psychology*, 40(6): 716-20. 1950.

Squire L, Stark C y Clark R. The medial temporal lobe. *Annual Review of Neuroscience* 27: 279-306. 2004.

Squire L, Wixted J, Clark R. Recognition memory and the medial temporal

lobe: a new perspective. *Nat Rev Neurosci* 8:872–883. 2007.

Staay FG, Bourger P, Lehmann O, Lazarus C, Cosquer B, Koenig J, Stump V, Cassel J. Long-Term Effects of Immunotoxic Cholinergic Lesions in the Septum on Acquisition of the Cone-Field Task and Noncognitive Measures in Rats. *Hippocampus* 16: 1061–1079, 2006.

Stork C y Li Y. Intracellular zinc elevation measured with a “calcium-specific” indicator during ischemia and reperfusion in rat hippocampus: a question on calcium overload. *J Neurosci* 26(41):10430–10437. 2006.

Stroev SA. y Samoilov MO. Endogenous Antioxidants and Hypoxic Tolerance of the Brain [in Russian], INFRAN, St. Petersburg. 2006.

Sun M. y Reis D. Hypoxia selectively excites vasomotor neurons of rostral ventrolateral medulla in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 266: R245–R256, 1994.

Tanaka Y, Sakurai M, Hayashi S Effect of scopolamine and HP029, a cholinergic inhibitor, on long-term potentiation in hippocampal slices of the guinea pig. *Neurosci Lett* 98: 179-183. 1989.

Tarpy R. Principios básicos del aprendizaje. Editorial Debate. 1993.

Tateno K, Minamino T, Toko H, Akazawa H, Shimizu N, Takeda S, Kunieda T, Miyauchi H, Oyama T, Matsuura K y cols. Critical roles of muscle-secreted angiogenic factors in therapeutic neovascularization. *Circ. Res.* 98, 1194–1202. 2006.

Terrados N, Mizuno M y Andersen H. Efecto de altitudes moderadas (900, 1.200 y 1.500 m. sobre el nivel del mar) en el consumo máximo de oxígeno. *Apunts, Medicina de l'sport*, 86, 97-101. 1985.

Thomas R, Tamisier R, Boucher J, Kotlar Y, Vigneault K, Weiss J, Gilmartin G. Nocturnal hypoxia exposure with simulated altitude for 14 days does not significantly alter working memory or vigilance in humans. *Sleep* 30: 1195-203, 2007.

Thompson R. The neural basis of basic associative learning of discrete behavioral responses. *Trends Neurosci* 11:152–155. 1988.

Thompson R y Krupa D. Organization of memory traces in the mammalian brain. *Annual Review of Neuroscience*, 17: 519-549. 1994.

Thompson R. The comparative effects of ECS and anoxia on memory. *J. comp. physiol. Psychol.* 50, 397—400. 1957.

Thompson R. The neurobiology of learning and memory. *Science.* 233: 941-947. 1986.

Thompson R y Krupa D. Organization of memory traces in the mammalian brain. *Annu Rev Neurosci.* 17: 519-549. 1994.

Thorndike E. Animal intelligence: experimental studies. New York (EE.UU): Mcmillan ed. 1911.

Tischmeyer W, Grimm R. Activation of immediate early genes and memory formation. *Cell Mol Life Sci*;55(4):564–74. 1999.

Tracy AL, Jarrard LE, y Davidson T. The hippocampus and motivation revisited: appetite and activity. *Behav Brain Res*, 127(1-2), 13-23. 2001.

Trigo J, Gruart A y Delgado-García JM. Discharge profiles of abducens, accessory abducens, and orbicularis oculi motoneurons during reflex and conditioned blinks in alert cats. *Journal of Neurophysiology*, 81: 1666-1684. 1999.

Ts'o DY, Zarella M., Burkitt G. Whither the hypercolumn? *Journal of Physiology* 587 (12): 2791–2805. 2009.

Tzavara E, Bymaster F, Felder C, Wade M, Gomeza J, Wess J, McKinzie D, Nomikos G. Dysregulated hippocampal acetylcholine neurotransmission and impaired cognition in M2, M4 and M2/M4 muscarinic receptor knockout mice. *Mol Psychiatry* 8(7):673–679. 2003.

Udayabanu M, Kumaran D, Nair RU, Srinivas P, Bhagat N, Aneja R, Katyal A. Nitric oxide associated with iNOS expression inhibits acetylcholinesterase activity and induces memory impairment during acute hypobaric hypoxia. *Brain Res* 1230:138–149. 2008.

Udayabanu M, Kumaran D, Katyal A. Free chelatable zinc modulates the cholinergic function during hypobaric hypoxia-induced

neuronal damage: an in vivo study. *Neurosci* 202: 434-445, 2012.

Urzedo-Rodrigues LS, Ferreira HS, Almeida DO, Medeiros JP, Batista A, de Castro e Silva E y Fregoneze J. Blockade of 5-HT₃ receptors at septal area increase blood pressure in unanaesthetized rats. *Auton Neurosci* 159, 51-61. 2011.

Vacher JM, y Miller A. Altitude-acclimatization: Its effects on hypoxia-induced performance decrements. *Psychopharmacologia*, 12, 250-257. 1968.

Van der Zee EA y Keijsers JN. Localization of pre- and postsynaptic cholinergic markers in rodent forebrain: a brief history and comparison of rat and mouse. *Behav Brain Res*. 2011.

Van Liere EJ, y Stickney J. Hypoxia. Chicago: The Univ. of Chicago Press. 1963.

Van Liere EJ, y Stickney J. Hypoxia. Chicago: The Univ. of Chicago Press, Chicago. 1963.

VanderWerf F, Aramideh M, Ongerboer de Visser B, Atto A, Baljet B y Speelman J. A fluorescent tracing of the orbicularis oculi muscle in the monkey. *Society for Neuroscience*, 911: 471-473. 1996.

VanderWerf F, Aramideh M, Ongerboer de Visser B, Baljet B, Speelman J y Atto A. A retrograde double fluorescent tracing study of the elevator palpebrae superioris muscle in the cynomolgus monkey. *Experimental Brain Research*, 113:174-179. 1997.

VanderWerf F, Baljet B, Prins M y Atto A. Innervation of the superior tarsal (Müller's) muscle in the cynomolgous monkey; a retrograde tracing study. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 34: 2333-2340. 1993.

Vann SD, Wilton LA, Muir J, Aggleton JP. "Testing the importance of the caudal retrosplenial cortex for spatial memory in rats". *Behavioural Brain Research* 140 (1-2): 107-118. 2003.

Vataeva LA., Tyulkova EI, y Samoilov M. Effects of prior exposure to moderate hypoxia on impairments to the acquisition and reproduction of a conditioned passive avoidance reaction induced by severe

hypobaric hypoxia in rats. *Zh. Vyssh. Nerv. Deyat.*, 54, No. 6, 795-801. 2004.

Vertes R. Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synapse*, 51(1), 32-58. 2004.

Walton M, Connor B, Lawlor P, Young D, Sirimanne E, Gluckman P, Cole G y Dragunow M. Neuronal death and survival in two models of hypoxic-ischemic brain damage. *Brain Res. Rev.*, 29 137-168. 1999.

Ward M, Milledge J, West J. Central nervous system. En: Ward MP, Milledge JS, West JB (eds). *High Altitude Medicine and Physiology*. Chapman y Hall: Londres,; pp.325-43. 1989.

Ward JPT y Robertson TP. The role of the endothelium in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Experimental Physiology* 80, 793-801. 1995.

Wilber R, Stray-Gundersen J, Levine B. Effect of Hypoxic "Dose" on Physiological Responses and Sea-Level Performance. *Med Sci Sports Exerc* 39: 1590-1599, 2007.

Winocur G, Moscovitch M, Caruana D, Binns M. Retrograde amnesia in rats with lesions to the hippocampus on a test of spatial memory. *Neuropsychologia* 43 (11): 1580-1590. 2005.

Winters B. y Bussey T. Transient inactivation of perirhinal cortex disrupts encoding, retrieval, and consolidation of object recognition memory. *J. Neurosci.* 25, 52. 2005.

Wittner M, yRiha P. Transient hypobaric hypoxia improves spatial orientation in young rats. *Physiol Res* 54: 335-340, 2005.

Woody C. Understanding the cellular basis of memory and learning. *Annu Rev Psychol.* 37:433-493. 1986.

Wyllie AR, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. cytol.* 68, 251-306. 1980.

Xia SZ, Feng C y Guo A. Temporary amnesia induced by cold anesthesia and hypoxia in *Drosophila*. *Physiology & Behavior*, 65, 617-623. 1999.

Yamamoto M, Koshimura K, Kawaguchi M, Sohmiya M, Murakami Y, Kato Y. Stimulating effect of erythropoietin on

the release of dopamine and acetylcholine from the rat brain slice. *Neurosci Lett* 292: 131–133, 2000.

Yeo CH, Hardiman MJ, Glickstein M. Classical conditioning of the nictitating membrane response of the rabbit: II. Lesions of the cerebellar cortex. *Exp Brain Res.* 60:99-113. 1985.

Yun S, Cheong M, Mook-Jung I, Huh K, Lee C, Jung M. Cholinergic modulation of synaptic transmission and plasticity in entorhinal cortex and hippocampus of the rat. *Neuroscience* 97:671– 676. 2000.

Zhang J, Chen X, Du J, Chen Q, Zhu C. Neonatal exposure to intermittent hypoxia enhances mice performance in water maze and 8-arm radial maze tasks. *J Neurobiol* 65: 72–84, 2005.

Zhongyuan S, Deming Z, Changming L, Miaoshen Q. Changes of

electroencephalogram under acute hypoxia and relationship between tolerant ability to hypoxia and adaptation ability to high altitudes. *Sci Sin;* 26:58-69. 1983.

Zoccolan D, Oertelt N, DiCarlo JJ, y Cox D. A rodent model for the study of invariant visual object recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 8748–8753. 2009.

Zuchner T, Schliebe N, Schliebs R. Zinc uptake is mediated by M1 muscarinic acetylcholine receptors in differentiated SK-SHSY5Y cells. *Int J Dev Neurosci* 24(1):23–27. 2006.

Zucker RS y Regehr WG. Short-term synaptic plasticity. *Annu. Rev. Physiol.* 64, 355–405, 2002.

UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE
Facultad de Ciencias Experimentales
Departamento de Fisiología, Anatomía
y Biología Celular
División de Neurociencias

