

*Departamento de Psicobiología y Metodología de las Ciencias del Comportamiento.  
Facultad de Psicología. Universidad de Málaga*

# **IMPLICACIÓN DE LA REGIÓN SUPRAMAMILAR EN LA MEMORIA ESPACIAL Y EN LA RESPUESTA DE ANSIDAD EN RATAS**

M<sup>a</sup> Lourdes Aranda Garrido



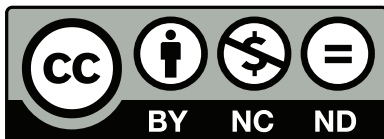
Málaga, 2010



**SPICUM**  
servicio de publicaciones

AUTOR: María Lourdes Aranda Garrido

EDITA: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Málaga



Esta obra está sujeta a una licencia Creative Commons:  
Reconocimiento - No comercial - SinObraDerivada (cc-by-nc-nd):

[Http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es](http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es)

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización  
pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar,  
transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de  
la Universidad de Málaga (RIUMA): [riuma.uma.es](http://riuma.uma.es)

Departamento de Psicobiología y Metodología de las Ciencias del  
Comportamiento.  
Facultad de Psicología. Universidad de Málaga

# **IMPLICACIÓN DE LA REGIÓN SUPRAMAMILAR EN LA MEMORIA ESPACIAL Y LA RESPUESTA DE ANSIEDAD EN RATAS.**

M<sup>a</sup> LOURDES ARANDA GARRIDO



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

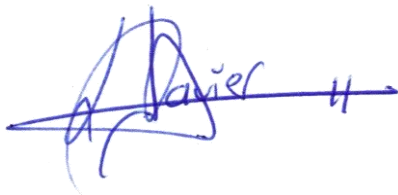
Málaga, 2010

D. LUIS JAVIER SANTÍN NÚÑEZ y Dña. AZUCENA BEGEGA LOSA, Drs. en  
Psicología

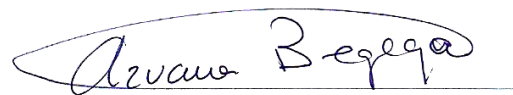
CERTIFICAN:

Que Dña. Lourdes Aranda Garrido ha realizado en el Laboratorio de Psicobiología de la Facultad de Psicología de la Universidad de Málaga y bajo nuestra dirección, el trabajo de investigación titulado: "**Implicación de la región supramamilar en la memoria espacial y en la respuesta de ansiedad en ratas**", que ha sido objeto de su Tesis Doctoral, reuniendo el mismo las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste, firmamos el presente certificado en Málaga a 3 de Marzo de 2010.



Fdo. Luis Javier Santín Núñez



Fdo. Azucena Begega Losa

*“Nuestra memoria no es más que una imagen de la realidad, por lo que nuestra realidad es sólo nuestra imaginación”.*

*MICHAEL ENDE.*

*A mis padres*

## Resumen

El objetivo del presente trabajo ha sido evaluar la implicación de la región supramamilar (SuMr) en tareas de memoria espacial y de ansiedad en ratas. Esta tesis doctoral se estructura en 9 capítulos, de los cuales el primero y el segundo se dedica íntegramente a mostrar los conocimientos actuales entorno a la memoria espacial, la región supramamilar (SuMr) del hipotálamo posterior, así como la relación entre ambas. El tercer capítulo se centra en mostrar los objetivos de los experimentos que se presentan a continuación. La parte experimental se desarrolla en 5 capítulos consecutivos en los que se estudiará la relación de la SuMr con la memoria espacial, la ansiedad, el área septal y la región CA<sub>3</sub> del hipocampo dorsal. En concreto, durante el capítulo cuarto se estudia experimentalmente la validez del laberinto empleado para estudiar la memoria espacial. Durante el capítulo quinto, se estudiaron los efectos de la lesión permanente y de la inactivación temporal de la SuMr en tareas de memoria de referencia espacial. En este trabajo se usaron lesiones electrolíticas para alterar de forma permanente esta región hipotalámica. Asimismo, se realizaron microinyecciones intracerebrales de tetradoxina (TTX) para la inactivación funcional de dicha zona. En ambas condiciones experimentales, se estudió el efecto de estos tratamientos sobre la memoria de referencia espacial empleando un laberinto de tierra diseñado para el estudio del aprendizaje espacial. En el capítulo sexto se estudiaron los efectos de la lesión permanente y la inactivación temporal de la SuMr en tareas de memoria de trabajo espacial. Los efectos de los tratamientos se estudiaron en el mismo laberinto de tierra, pero diseñando una tarea espacial basada en el aprendizaje de una regla de emparejamiento demorado con un lugar (DMTP). El capítulo séptimo, se diseñó para estudiar los efectos de la SuMr en tareas de ansiedad, empleándose el laberinto elevado en T. Este experimento se llevó a cabo mediante la aplicación de lesiones permanentes (electrolíticas) en la SuMr, evaluándose pre y postoperatoriamente las conductas de evitación pasiva y la respuesta de escape. El capítulo octavo fue diseñado para conocer el grado de actividad celular en el área septal, una de las dianas anatómicas de la SuMr, e implicada en la transmisión de la información desde la SuMr hacia la formación hipocampal. Además también se estudió la activación de las células de la región CA<sub>3</sub> del hipocampo dorsal. En este estudio se inactivó temporalmente con TTX la SuMr y se cuantificó mediante procedimientos estereológicos la inmunorreactividad de la

proteína c-Fos en el núcleo medial del septum y en la región CA<sub>3</sub> del hipocampo dorsal. Por último, en el capítulo noveno se expusieron las conclusiones de la tesis doctoral.

Los resultados obtenidos en nuestros experimentos, confirman la relación de la SuMr con la memoria espacial y con la conducta emocional de tipo ansiosa. Más específicamente, hemos observado un claro deterioro de memoria de trabajo espacial cuando se lesiona permanente o temporalmente esta región hipotalámica, así como un deterioro en la recuperación de la información previamente aprendida en tareas de memoria de referencia espacial después de la administración intracerebral de TTX en esta estructura diencefálica.

Por otro lado, los resultados muestran claramente un efecto ansiolítico en la conducta de evitación pasiva, cuando se lesiona de forma permanente la SuMr.

Con respecto a los resultados obtenidos en el experimento 7, cuando se inactivó temporalmente la SuMr, se observó un incremento de la inmunorreactividad de la proteína c-Fos en el septum medial, que podría indicar una transferencia de información anómala hacia el hipocampo, observándose un descenso de la misma en la región CA<sub>3</sub>. Este resultado, puede constituir la base anatómico-funcional de los déficits cognitivos y emocionales observados en los estudios comportamentales de esta tesis doctoral.



## Abreviaturas

<b>Ach:</b> acetilcolina	<b>Mmmn:</b> núcleo mamilar medial pars medialis
<b>AchT:</b> acetilcolintransferasa	<b>MMn:</b> núcleo mamilar medial
<b>ATV:</b> área tegmental ventral	<b>mp:</b> pedúnculo mamilar
<b>CA<sub>1</sub>:</b> región 1 del cuerno de Ammón	<b>MS:</b> septum medial
<b>CA<sub>2</sub>:</b> región 2 del cuerno de Ammón	<b>mt:</b> tracto mamilotalámico
<b>CA<sub>3</sub>:</b> región 3 del cuerno de Ammón	<b>MT:</b> memoria de trabajo
<b>CC:</b> “pars compacta “del núcleo central superior	<b>Mtg:</b> tracto mamilotegmental
<b>CCA:</b> corteza cingulada anterior	<b>Nv:</b> unidad de volumen
<b>CCMM:</b> cuerpos mamilares	<b>PBS:</b> tampón fosfato salino
<b>CPF:</b> corteza prefrontal	<b>PL:</b> corteza prelímbica
<b>CPFm:</b> corteza prefrontal medial	<b>PLP:</b> potenciación a largo plazo
<b>DAB:</b> diaminobenzidina	<b>pm:</b> pedúnculo mamilar
<b>DB:</b> banda diagonal de Broca	<b>PTD:</b> piritiamina
<b>DMTP:</b> emparejamiento demorado con un lugar	<b>R:</b> recuerdo
<b>DMTS:</b> emparejamiento demorado con la muestra	<b>Re:</b> receso del tercer ventrículo
<b>GD:</b> giro dentado	<b>RM:</b> región mamilar
<b>Glu:</b> glutamato	<b>SAL:</b> solución salina
<b>IEE:</b> intervalo entre ensayos	<b>SDHACU:</b> colina de alta afinidad dependiente de sodio
<b>IES:</b> intervalo entre sesiones	<b>SuM:</b> núcleo supramamilar
<b>IL:</b> corteza infralímbica	<b>SuMg:</b> porción grandicelular del núcleo supramamilar
<b>ISI:</b> intervalo entre sesiones	<b>SuMI:</b> núcleo supramamilar lateral
<b>ITI:</b> intervalo entre ensayos	<b>SuMm:</b> núcleo supramamilar medial
<b>LH:</b> área hipotalámica lateral	<b>SuMp:</b> porción parvicelular del núcleo supramamilar
<b>IMMn:</b> núcleo mamilar medial lateral	<b>SuMr:</b> región supramamilar
<b>LMn:</b> núcleo mamilar lateral	<b>SuMs:</b> porción externa del núcleo supramamilar
<b>M:</b> muestra	<b>SuMx:</b> decusación del núcleo supramamilar
<b>MCP:</b> memoria a corto plazo	<b>TM:</b> núcleo tuberomamilar
<b>MLP:</b> memoria a largo plazo	<b>TTX:</b> tetradoxina
<b>MMlc:</b> núcleo mamilar medial pars lateralis parte caudal	<b>TV:</b> núcleo tegmental ventral de Gudden
<b>MMlr:</b> núcleo mamilar medial pars lateralis parte rostral	

**ÍNDICE GENERAL**

**CAPITULO I: EL ESTUDIO PSICBIOLÓGICO DE LA MEMORIA.**

1. INTRODUCCIÓN AL ESTUDIO DE LA MEMORIA	2
2. TIPOLOGÍA DE LA MEMORIA	3
3. LA MEMORIA ESPACIAL COMO MEMORIA RELACIONAL: ESTUDIOS EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	11

**CAPITULO II: LA REGION MAMILAR Y LA MEMORIA: PARTICIPACIÓN DEL NÚCLEO SUPRAMAMILAR.**

1. NEUROANATOMÍA Y CONEXIONES DE LA REGIÓN MAMILAR	19
2. PAPEL DE LA REGIÓN MAMILAR EN LA MEMORIA	23
3. FUNCIONES DEL NÚCLEO SUPRAMAMILAR	28

**CAPITULO III: OBJETIVOS**

OBJETIVOS	33
-----------	----

**CAPITULO IV: EXPERIMENTO 1: APRENDIZAJE ESPACIAL CON DEMANDAS DE MEMORIA DE REFERENCIA Y DE TRABAJO.**

1. INTRODUCCIÓN	35
2. MATERIAL Y MÉTODOS	36
a. Animales	36
b. Aparatos	37
c. Pruebas conductuales	37
d. Diseño experimental y análisis de los datos	40
3. RESULTADOS	41
4. DISCUSIÓN	42

**CAPITULO V: EXPERIMENTOS 2 Y 3: MEMORIA DE REFERENCIA ESPACIAL Y REGIÓN SUPRAMAMILAR**

INTRODUCCIÓN	47
--------------	----

**EXPERIMENTO 2: EFECTOS DE LA LESIÓN ELECTROLÍTICA DE LA REGIÓN SUPRAMAMILAR EN UNA TAREA DE MEMORIA DE REFERENCIA ESPACIAL**

1. INTRODUCCIÓN	48
2. MATERIAL Y MÉTODOS	48
a. Animales	48
b. Procedimiento comportamental: memoria de referencia espacial	49
c. Cirugía estereotáxica: lesión electrolítica de la región supramamilar	51

d. Perfusión intracardíaca y procesamiento histológico del tejido cerebral	54
e. Diseño experimental y análisis de datos	59
3. RESULTADOS	59
a. Resultados histológicos	59
b. Resultados comportamentales	61

**EXPERIMENTO 3: EFECTOS DE LA MICROINYECCIÓN DE TETRADOTOXINA EN LA REGIÓN SUPRAMAMILAR EN UNA TAREA DE MEMORIA DE REFERENCIA ESPACIAL**

1. INTRODUCCIÓN	62
2. MATERIAL Y MÉTODOS	62
a. Animales	62
b. Aparatos	62
c. Procedimiento comportamental: memoria de referencia espacial	63
d. Cirugía estereotáxica: microinyección intracerebral de TTX en la SuMr	66
e. Perfusión intracardíaca y procesamiento histológico del tejido cerebral	69
f. Diseño experimental y análisis de datos	69
3. RESULTADOS	70
a. Resultados histológicos	70
b. Resultados comportamentales	71
4. DISCUSIÓN	73

**CAPITULO VI: EXPERIMENTOS 4 Y 5: MEMORIA DE TRABAJO ESPACIAL Y REGIÓN SUPRAMAMILAR**

INTRODUCCIÓN	77
--------------	----

**EXPERIMENTO 4: EFECTOS DE LA LESIÓN ELECTROLÍTICA DE LA REGIÓN SUPRAMAMILAR EN UNA TAREA DE MEMORIA DE TRABAJO ESPACIAL**

1. INTRODUCCIÓN	78
2. MATERIAL Y MÉTODOS	79
a. Procedimiento comportamental: memoria de trabajo espacial	79
b. Diseño experimental y análisis de datos	80
3. RESULTADOS	82

**EXPERIMENTO 5: EFECTOS DE LA MICROINYECCIÓN DE TETRADOTOXINA EN LA REGIÓN SUPRAMAMILAR EN UNA TAREA DE MEMORIA DE TRABAJO ESPACIAL**

1. INTRODUCCIÓN	85
2. MATERIAL Y MÉTODOS	86

a. Procedimiento comportamental: memoria de trabajo espacial _____	86
b. Diseño experimental y análisis de datos _____	87
3. RESULTADOS _____	89
a. Resultados histológicos _____	89
b. Resultados comportamentales _____	89
4. DISCUSIÓN _____	92
 <b>CAPITULO VII: EXPERIMENTO 6: RESPUESTA DE ANSIEDAD Y REGIÓN SUPRAMAMILAR</b>	
1. INTRODUCCIÓN _____	97
2. MATERIAL Y MÉTODOS _____	98
a. Aparatos _____	98
b. Pruebas conductuales _____	99
c. Diseño experimental y análisis de datos _____	100
3. RESULTADOS _____	100
4. DISCUSIÓN _____	102
 <b>CAPITULO VIII: EXPERIMENTO 7: EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA c-Fos ASOCIADA A LA INACTIVACIÓN TEMPORAL DE LA REGIÓN SUPRAMAMILAR.</b>	
1. INTRODUCCIÓN _____	106
2. MATERIAL Y MÉTODOS _____	108
a. Animales _____	108
b. Cirugía estereotáxica y Microinyecciones de TTX _____	109
c. Perfusión vascular, seriación del tejido y tinción inmunohistoquímica _____	109
d. Cuantificación estereológica _____	112
e. Análisis de datos _____	115
3. RESULTADOS _____	115
4. DISCUSIÓN _____	118
 <b>CAPITULO IX: CONCLUSIONES</b>	
CONCLUSIONES _____	123
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> _____	124
<b>AGRADECIMIENTOS</b> _____	151

# I

## **EL ESTUDIO PSICBIOLÓGICO DE LA MEMORIA.**

## 1. INTRODUCCIÓN AL ESTUDIO DE LA MEMORIA.

Todos los organismos modifican su conducta para adaptarse a las condiciones cambiantes e impredecibles del medio que los rodea. Junto a las fuerzas selectivas de la evolución, el aprendizaje constituye el modo principal de adaptación de los seres vivos (Morgado, 2005).

El aprendizaje está estrechamente relacionado con el término memoria. *El aprendizaje* es el proceso mediante el cual, se adquiere un cambio en el estado de conocimiento del sujeto, es un proceso de adquisición en el que se incorporan nuevos conocimientos y/o conductas y formas de relacionarse con el ambiente. De forma complementaria, *la memoria* no sería tan sólo el “depósito” de la información adquirida ya que, se presenta de forma dinámica, puesto que está sometida a procesos de reorganización de la información ya existentes, el decaimiento de recuerdos con el paso del tiempo, etc. De este modo, la memoria es una función que permite que la información que se ha aprendido se almacene y esté disponible para su recuperación en un momento determinado.

Aguado-Aguilar (2001) sostiene que las capacidades de aprendizaje y memoria en los animales de laboratorio se pueden estudiar desde tres aspectos diferentes, que no son excluyentes entre sí, sino que, analizan diferentes aspectos del aprendizaje y la memoria. Todos ellos son necesarios para una buena comprensión de estos procesos psicológicos.

1. **Aspecto conductual:** implican la medición de la conducta y las modificaciones que se observan en ésta bajo las distintas condiciones experimentales, aún cuando se trate de investigaciones psicológicas cuyo objetivo sea la explicación de un proceso interno o mental.
2. **Aspecto cognitivo:** las actividades del procesamiento de la información a lo largo del aprendizaje, al ser internas no son observables directamente. Éstas han de ser inferidas a partir de la observación de la conducta manifiesta, de ahí que el aspecto cognitivo en estudios experimentales vaya unido al estudio conductual.
3. **Aspecto neuronal:** las representaciones mentales, que constituyen la memoria, que se concretizan físicamente en el cerebro. Dentro de este apartado podemos distinguir 2 niveles: Un primer nivel molar o global, estudiaría la participación de diferentes estructuras y/o circuitos cerebrales, en los procesos de aprendizaje

y de la memoria. Diferentes estudios, empleando este nivel de análisis, han mostrado la relación entre diferentes sistemas o regiones cerebrales, con distintas formas y/o procesos de aprendizaje y memoria. Una de las aproximaciones experimentales más empleadas en este contexto, ha sido el uso de lesiones en diferentes regiones/sistemas cerebrales. De este modo, numerosos trabajos han observado que lesiones cerebrales discretas, inducen alteraciones específicas de aprendizaje y de memoria. Estas deficiencias serán de una determinada naturaleza dependiendo de la zona cerebral dañada y/o el sistema neurobiológico afectado. Un ejemplo de ello, serían las lesiones circunscritas a los ganglios basales que alteran las conductas aprendidas mediante condicionamiento instrumental, especialmente aquellas que involucran respuestas automáticas bien ejercitadas (Heindel y cols, 1988; Saint-Cyr y cols, 1988; Reading y cols, 1991). Un segundo nivel de estudio neuronal consiste en el análisis de los mecanismos celulares, subcelulares y moleculares relacionados con el aprendizaje y la memoria. De este modo, diferentes trabajos han estudiado los cambios celulares y moleculares que se asocian con el aprendizaje y la memoria. Tales cambios se relacionan principalmente con la modificación sináptica inducida por aprendizaje. Estos cambios sinápticos producidos en ciertas redes neuronales pueden dar cuenta de la formación de memorias (Aguado-Aguilar, 2001).

## 2. TIPOLOGÍA DE LA MEMORIA.

Dentro del ámbito de la psicología del aprendizaje se ha establecido una distinción ya clásica, entre aprendizajes de tipo asociativo y no asociativo. A lo largo de esta tesis doctoral, nos referiremos principalmente a aquellos aprendizajes que requieran la relación entre estímulos, es decir, el aprendizaje asociativo o relacional de conocimiento. La asociación, mecanismo fundamental en el aprendizaje y memoria, es un fuerte mecanismo para la modificación adaptativa de la conducta y la adquisición de conocimiento y un importante principio organizador de la memoria. El aprendizaje asociativo ha sido estudiado por los psicólogos y psicobiólogos y, recientemente por los neurocientíficos en numerosas especies animales, desde el hombre a los invertebrados, mediante técnicas de condicionamiento pavloviano e instrumental, y ha puesto de

manifiesto una notable generalidad de los principios y mecanismos que rigen esta forma de aprendizaje.

Las clasificaciones existentes hasta el momento sobre la memoria no son unitarias y se han propuesto diversos sistemas clasificatorios, que más que mutuamente excluyentes son complementarios en muchos casos.

El modelo más clásico sobre la organización de los sistemas de memoria en el cerebro, distingue dos tipos esenciales de este proceso que dependen de la variable “tiempo”, es decir, alude al grado de duración de los recuerdos (Kolb y Whishaw, 1986) y se denominan: memoria a corto plazo y memoria a largo plazo.

A. **LA MEMORIA A CORTO PLAZO:** es un sistema para almacenar una cantidad limitada de información durante un periodo breve de duración (Campos-Castelló, 2000). Es una memoria frágil y transitoria que enseguida se desvanece, resultando muy vulnerable a cualquier tipo de interferencias. Dentro de este tipo de memoria se puede incluir “la memoria de trabajo” (Baddeley, 1992).

La memoria de trabajo es el tipo de memoria consciente que utilizamos cuando tratamos de retener información sobre “algo que nos acaban de decir”, “cosas que acaban de pasar” o “pensamientos que acabamos de tener”, para integrarlos inmediatamente en el propio razonamiento, en la resolución mental en curso de algún tipo de problema o en la toma de decisiones. No obstante, según Baddeley (1992), la memoria de trabajo (MT) es más que una simple memoria; parece consistir en un sistema general de control cognitivo y de procesamiento ejecutivo que guía el comportamiento y que implica interacciones entre los diversos procesos mentales (atención, percepción, motivación, emociones y memoria). A lo largo de este trabajo de investigación aludiremos a la memoria de trabajo principalmente con esta connotación de temporalidad de los recuerdos.

Baddeley describe la memoria de trabajo como un mecanismo de almacenamiento temporal que permite retener a la vez diferentes ítems de información en la mente, compararlos, contrastarlos, o en su lugar, relacionarlos entre sí. Se responsabiliza del almacenamiento a corto plazo, a la vez que manipula la información necesaria para los procesos cognitivos de alta complejidad.



La memoria de trabajo participa por lo menos en dos tipos de procesos: el *control ejecutivo*, que hace referencia al mecanismo de procesamiento de la información y el *sostenimiento activo* que alude al almacenamiento temporal de la información. Este mecanismo de almacenamiento temporal presenta la característica de utilizarse en conexión con mecanismos especializados de almacenamiento provisional, que sólo se activan cuando es necesario retener un tipo de información específica. Además, la memoria de trabajo permanece en conexión con la memoria a largo plazo, permitiendo acceder a los conocimientos y experiencias pasadas del sujeto. De esta manera, con las aportaciones de esa información se operaría con mayor precisión en la resolución de los problemas planteados.

Asimismo, se propone una ruptura con el concepto tradicional de ‘almacén unitario’ para entender la memoria de trabajo como un sistema neurocognitivo complejo y formado por tres componentes:

– *Bucle articulatorio*: encargado de mantener activa y manipular la información presentada por medio del lenguaje. Por tanto, está implicado en tareas puramente lingüísticas, como la comprensión, la lectoescritura o la conversación, así como en el manejo de palabras, números, descripciones, etc.

– *Agenda visuoespacial*: encargada de elaborar y manipular información visual y espacial. Se ha comprobado que está implicada en la aptitud espacial, como por ejemplo el aprendizaje de mapas geográficos pero también en tareas que suponen memoria espacial, como el ajedrez.

– *Ejecutivo central*: se considera un elemento nuclear porque gobierna los sistemas subsidiarios de la memoria de trabajo. El ejecutivo central realiza dos funciones: a) Distribuir la atención que se asigna a cada una de las tareas a realizar (relevancia de la tarea, las demandas que se imponen al sistema y el grado de pericia del sujeto) y b) vigilar la atención de la tarea y su ajuste a las demandas del contexto. A medida que el sujeto se familiariza con la tarea, su realización consume menos recursos atencionales y permite la ejecución de otras tareas compatibles.

En los últimos años, la implicación activa de la corteza prefrontal (CPF) en la memoria de trabajo ha sido estudiada en humanos (Courtney y cols, 1998), primates no humanos (Levy y Goldman-Rakic, 1999) e incluso, en especies inferiores como roedores (Dudchenko, 2004). Los estudios desarrollados por

Joaquín Fuster han sido paradigmas para poder conocer las bases neuroanatómicas y neurofisiológicas de la memoria de trabajo en primates. De este modo, Fuster y Alexander (1971) demostraron la capacidad de neuronas individuales localizadas en la corteza prefrontal dorsolateral, durante la fase de retención en una tarea de emparejamiento demorado con la muestra (DMTS), para mantenerse activas durante los periodos de demora. Este hecho, parece indicar que estas neuronas prefrontales son capaces de mantener activa la representación de estímulos ausentes, durante periodos temporales cortos, manteniendo activa la información necesaria para emitir una respuesta posterior. Más recientemente, el estudio de primates humanos y no humanos con lesiones prefrontales (Eichenbaum, 2003a), así como el estudio de la actividad prefrontal en sujetos normales sometidos a diferentes tareas de memoria de trabajo mediante técnicas de imagen cerebral (Fletcher y Henson, 2001), han confirmado consistentemente la participación de esta región cortical en la memoria de trabajo.

En roedores, gran número de estudios han puesto de manifiesto que la corteza prefrontal medial (CPFm) no constituye una única unidad funcional. Así, se ha demostrado que las cortezas prelímbica (PL) e infralímbica (IL) son fundamentales para la resolución de tareas de discriminación y alternancia de respuesta que requieren flexibilidad conductual (Ragozzino y cols, 1999; 2003). En cambio, la región dorsal de la Corteza Cingulada Anterior (CCA) no parece implicada en esta respuesta (Ragozzino y cols, 1999), aunque se considera importante para la memoria de trabajo espacial (Ragozzino y cols, 1998). De forma general, esta especialización regional indicaría un papel de la CCA en la secuenciación temporal de la conducta o en un proceso de selección de respuesta general (Delatour y Gisquet-Verrer, 2001); mientras que las áreas PL-IL dirigen los procesos atencionales y la flexibilidad conductual que contribuyen al control ejecutivo (Delatour y Gisquet-Verrier, 2000), cruciales para la memoria de trabajo en una tarea espacial.

En roedores, si bien el papel de la CPFm ha sido ampliamente demostrado, también se ha señalado la importante participación de otras regiones cerebrales en tareas de memoria de trabajo basadas en el procesamiento espacial. De este modo, el hipocampo y la región mamilar (RM) (Nadel, 1991; Aggleton y cols, 1995) que trataremos más en detalle en otros apartados, parecen formar parte de este sistema en roedores.

B. **LA MEMORIA A LARGO PLAZO**: es un tipo de memoria que permite almacenar una gran cantidad de información en un periodo largo de tiempo. A diferencia de la memoria a corto plazo, es una memoria estable, duradera y muy poco vulnerable a las interferencias.

Para que se pueda llevar a cabo un almacenamiento de conocimientos a largo plazo (desde una perspectiva procesual), la información tendría que atravesar tres estadios sucesivos (Tarpy, 1988):

1. **Fase de aprendizaje o adquisición**. Se entendería como un estado de “codificación” en el que se registra un cambio en el sujeto, que adquiere una nueva conducta no presente antes en su repertorio conductual.
2. **Fase de retención o de consolidación**. Aludiría al periodo de tiempo, en el que la memoria se fija o almacena, manteniéndose a lo largo del tiempo.
3. **Fase de recuperación**. Correspondería al momento en que el sujeto ejecuta la reacción aprendida, demostrándose que se ha retenido la respuesta aprendida.
4. En la actualidad se incluye una cuarta fase, la **fase de reconsolidación**. La reactivación de antiguas memorias bien consolidadas, conlleva la iniciación de procesos de reconsolidación, donde se fija o almacena nuevamente la información (Nadel y cols, 2000).

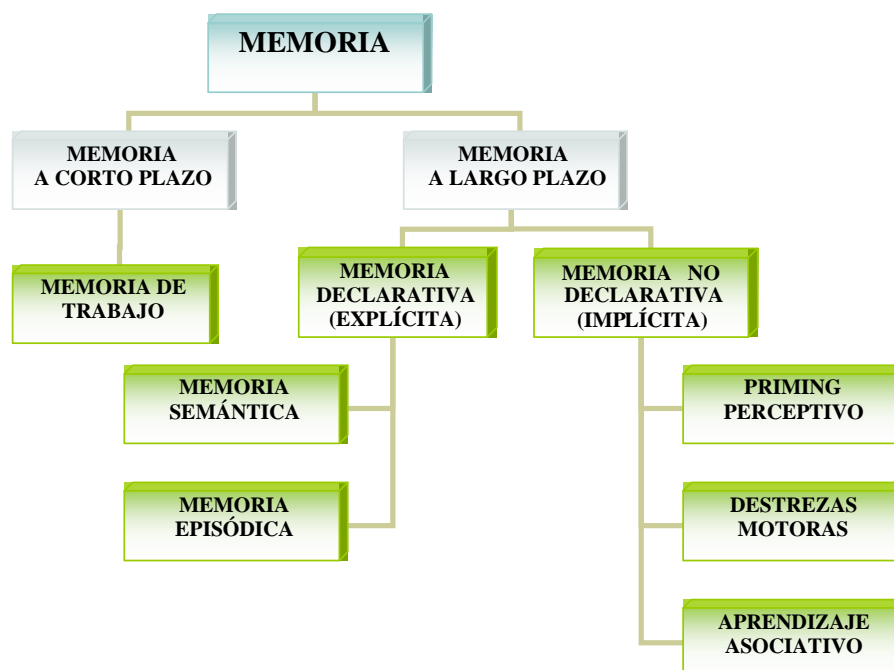
Los estudios realizados en la segunda mitad del siglo XX, han demostrado que la memoria a largo plazo implica en realidad dos tipos de memoria diferentes: la consciente y la no consciente, el “conocer cómo” y el “conocer qué” (Kubie y Ranck, 1984). Este hecho, ya fue abordado por Scoville y Milner al estudiar al sujeto H.M. (Scoville y Milner, 1957) y más recientemente retomado y sistematizado por L. R. Squire (Squire y cols, 1993). De este modo, intenta dar cuenta de esta distinción aplicada a la memoria a largo plazo y propone el siguiente sistema clasificatorio:

1. **Memoria declarativa (memoria explícita)**: este tipo de memoria implica, a menudo, la asociación de estímulos simultáneos y permite almacenar información acerca de un suceso que se da en un tiempo y lugar determinados: de ahí que, proporcione una sensación de familiaridad con sucesos previos. Es el proceso de adquisición de

información que el sujeto realiza de forma deliberada y consciente. A su vez, la memoria declarativa puede disociarse en memoria episódica y memoria semántica.

La memoria episódica procesa información acerca de las experiencias personales, del mundo en tanto que es vivido por uno mismo, es decir hace referencia a la memoria autobiográfica para eventos dentro de un contexto espacio-temporal particular. La memoria semántica sin embargo, procesa la información que adquirimos acerca de nuestro entorno y que es independiente de la experiencia personal, algo así como el conocimiento general del mundo.

Una diferencia entre ambas formas de memoria es que la memoria episódica depende del contexto. Ello significa que los recuerdos de experiencias personales van normalmente unidos al contexto temporal y espacial en que tales experiencias se han vivido. Así por ejemplo, volver a un lugar que no hemos visitado desde hace tiempo reactiva en nuestra memoria experiencias ligadas a dicho lugar que quizá, creíamos haber olvidado. En cambio, la información de tipo semántico suele ser independiente del contexto en que es adquirido y tiene carácter más “abstracto” y general. Otra diferencia importante es que el conocimiento episódico se adquiere en único ensayo (por definición, este tipo de conocimiento se refiere a episodios únicos), mientras que el conocimiento semántico resulta, por lo general, de la repetición y la acumulación progresiva de información (Aguado-Aguilar, 2001).



**Figura 1.** Clasificación de los diferentes sistemas de memoria. Modificado de Squire y cols, (1993).

El estudio neurobiológico de la memoria declarativa en humanos, desde una perspectiva neuroanatómica, se inició mediante los estudios de casos clínicos de sujetos que presentaban amnesia. En estos estudios, se realiza la descripción de déficits mnésicos desarrollados por sujetos que presentan lesiones en estructuras cerebrales concretas, realizándose una inferencia de la implicación neural a partir del déficit encontrado. En palabras de Squire (Squire y cols, 1990). “(...) *un análisis del déficit puede proporcionar información útil sobre la función normal del sistema dañado y acerca de la organización normal de la memoria*”.

La amnesia orgánica, es uno de los desórdenes que afectan a la memoria y es resultado del daño cerebral. El síndrome amnésico presenta cuatro características básicas (Mayes, 1995):

- Amnesia anterógrada, déficit de memoria explícita o declarativa observable después de la aparición del trauma.
- Amnesia retrógrada, déficit de memoria declarativa que se extiende con longitud variable a momentos previos al trauma.
- Relativa preservación de las memorias más antiguas en comparación con las más recientes y preservación de otros aspectos cognoscitivos (inteligencia y memoria inmediata).
- Memoria implícita o no declarativa, no alteradas.

A nivel neuroanatómico, el síndrome amnésico ha sido relacionado con la presencia de lesiones en estructuras cerebrales concretas: lóbulos temporales mediales, diencéfalo y cerebro anterobasal (Mayes, 1995). El inicio de tales estudios se debe al estudio del paciente H.M. en los años 50 por Scoville y Milner, (Scoville y Milner, 1957). La extirpación bilateral de los lóbulos temporales mediales ocasionó una severa amnesia anterógrada, mostrando una clara incapacidad para aprender y retener nueva información de tipo declarativo. Además, las lesiones del lóbulo temporal medial provocan una afectación selectiva para el almacenamiento de información declarativa a largo plazo sin afectar el recuerdo de hechos y acontecimientos recientes (McNaughton y cols, 1986; Poucet y cols, 1991). El estudio de pacientes neuropsicológicos con lesiones más o menos circunscritas al hipocampo (Cohen y Squire, 1980), así como los estudios en sujetos normales mediante el uso de técnicas de imagen cerebral (O'keefe y Speakman, 1987) han demostrado la importancia de la formación hipocampal en la memoria declarativa y en la amnesia anterógrada. Por otro lado, el estudio de pacientes

con síndrome de Korsakoff que muestran una severa amnesia anterógrada entre otra sintomatología asociada (Wernicke, 1881; Gudden, 1896; Victor y cols, 1971; Mair y cols, 1979; Mayes y cols, 1988), ha revelado que las alteraciones diencefálicas, principalmente en los cuerpos mamilares y en el núcleo dorsomedial del tálamo (Victor y cols, 1971; Adams y Victor, 1993), se relacionan con la aparición de una severa amnesia anterógrada en estos sujetos. No obstante, este aspecto será tratado más en detalle en un apartado posterior.

2. **Memoria no declarativa (memoria implícita)**: es la que se manifiesta conductualmente sin que el sujeto sea capaz de describir la información que utiliza y sin necesidad de que deba ser consciente, ni siquiera del hecho que anteriormente adquirió esa habilidad. A su vez, la memoria no declarativa está formada por diferentes categorías. Cada una de ellas, dependiente de diferentes substratos y sistemas neurobiológicos. Entre las formas de memoria implícita más ampliamente estudiadas se encuentran:

Priming perceptivo: esta memoria se basa en la facilitación perceptiva. De este modo, un estímulo concreto facilita el reconocimiento posterior. Por ejemplo, tras ver diversas imágenes, las personas las reconocen antes cuando se les presenta más tarde. En los amnésicos de lóbulos temporales estas capacidades no se ven afectadas, y parecen depender de las distintas zonas corticales de análisis sensorial.

Destrezas motoras: el aprendizaje de destrezas motoras requiere la integración y coordinación de diferentes unidades motoras generalmente centradas en un objetivo.

“Una interpretación ampliamente aceptada es que en el curso de esta forma de aprendizaje se va formando en la memoria una representación del acto motor, que consistiría en una especie de “programa motor” que controla la ejecución del mismo. Estos programas motores se completan sólo tras una práctica continuada, en cuyo curso tiene lugar una transición desde una fase inicial de control voluntario y deliberado de los movimientos, imperfectos y con un alto número de errores, hasta una fase final, caracterizada por la ejecución prácticamente automática del acto motor. A medida que la ejecución del acto motor va automatizándose, se reduce también la demanda atencional exigida por la tarea, de modo que es posible realizar de forma simultánea al menos ciertas tareas. Han comenzado también a delinearse algunos de los sistemas cerebrales que intervienen en el aprendizaje y

almacenamiento de destrezas motoras. Mientras que ciertos núcleos del cerebelo parecen ser indispensables para el aprendizaje asociativo con respuestas motoras discretas y simples, así como para la adaptación de algunos reflejos motores, los ganglios basales parecen estar implicados en la adquisición de destrezas más complejas” (Aguado-Aguilar, 2001).

Aprendizajes asociativos: pueden tener lugar a nivel no consciente y, que también manifiestan los amnésicos de lóbulos temporales, se incluyen igualmente en la categoría de memoria implícita y dependen de diversas estructuras según la naturaleza del condicionamiento. Dentro de este contexto son paradigmáticos los estudios de Thompson y cols, (1964) sobre la importancia de los núcleos cerebelares internos en el condicionamiento del reflejo de parpadeo del conejo y los estudios de LeDoux y su grupo sobre el papel de la amígdala basolateral en la memoria de las experiencias con significado emocional (LeDoux, 1992).

A pesar de poder dissociarse formas de memoria declarativa y no declarativa, durante la formación de una memoria, se hallan presentes tanto componentes declarativos como no declarativos y en numerosas ocasiones la transición desde el control deliberado inicial hasta la ejecución automatizada final de una misma tarea puede interpretarse como una transición desde el uso explícito al implícito de la información o la habilidad adquirida (Aguado- Aguilar, 2001).

### **3. LA MEMORIA ESPACIAL COMO MEMORIA RELACIONAL: ESTUDIO EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.**

Los animales necesitan disponer de un buen sistema de orientación espacial para organizar sus conductas en relación con el entorno en que se encuentran en cada momento. La orientación espacial es importante para muchas conductas de los animales: búsqueda de comida, conducta parental y reproductiva, regreso al nido o huida a un lugar seguro (Santín y cols, 2000). El aprendizaje y la memoria espacial se relacionan con la capacidad de adquirir y retener asociaciones de las características del ambiente, lo que permite al organismo desenvolverse en el espacio. La memoria espacial consiste en múltiples mecanismos especializados en codificar, almacenar y recuperar información acerca de rutas, configuraciones y localizaciones espaciales (Kessels y cols, 2001; Vicens y cols, 2003). Estas capacidades espaciales de los animales también

pueden estudiarse experimentalmente en laboratorios, empleando laberintos cuya solución depende del uso de información espacial. Históricamente, los primeros intentos para explicar la ejecución de los animales en tareas de tipo espacial, se pueden atribuir a Tolman, (1948). Sus estudios de discriminación espacial en un laberinto en T, sugerían que las ratas aprendían asociaciones entre lugares concretos y una recompensa, formando un mapa cognitivo de la estancia, que le permitiera orientarse y acceder al reforzador. Contrariamente, Hull defendía que las ratas aprendían asociaciones entre respuestas y recompensas, no formando representaciones del entorno a modo de un mapa espacial. Esta contraposición histórica, no se refiere únicamente a un uso terminológico diferente, sino que más bien se basa en diferencias conceptuales. Tolman y Hull sostienen que las ratas, en una tarea de discriminación espacial, aprenden relaciones totalmente diferentes: para Tolman se trataría de un condicionamiento clásico y para Hull de un condicionamiento instrumental (Chamizo, 1990). Más específicamente, la propuesta de Tolman, distingue entre los mapas cognitivos y la adquisición de hábitos basándose en los contenidos de las representaciones y en la flexibilidad con que se pueden expresar las memorias. De este modo, los organismos aprenden a anticipar no sólo estímulos particulares, sino también los elementos interconectados del mapa cognitivo que hacen posible realizar inferencias en la navegación de los sujetos (rutas más cortas, obtener soluciones nuevas, etc...) (Eichenbaum, 1997).

La teoría del mapa cognitivo ha ganado mayor popularidad después de la publicación del libro “The hippocampus as a cognitive map” donde se describen estudios que relacionan el hipocampo con el mapa cognitivo, dándole a este constructo no sólo una entidad psicológica, sino también una entidad neurofisiológica. Describen el mapa cognitivo del siguiente modo: *“Proporciona al organismo una representación similar a un mapa, que funciona como un marco de trabajo para organizar sus aferencias sensoriales y se percibe como estacionario para que el organismo se desplace”* (O’Keefe y Nadel, 1978).

Más recientemente, Leonard y McNaughton, (1990) reformulan esta definición interpretando el mapa cognitivo como *“una representación global de los objetos en algún sistema de coordenadas desde el que se pueden derivar sus relaciones espaciales mutuas”*.

En su propuesta teórica O’Keefe y Nadel (1978), distinguen entre estrategias cartográficas y estrategias táxicas. Para ellos, el aprendizaje de estrategias cartográficas



implica la formación de mapas espaciales del entorno, de forma contraria al aprendizaje basado en estrategias táxicas (Tabla 1).

<p style="text-align: center;"><b>APRENDIZAJE TÁXICO</b></p>	<p><i><u>De Orientación:</u> los animales aprenden a emplear programas motores, estereotipados y localizarán el camino hacia un lugar aprendiendo series de movimientos de orientación.</i></p> <p><i><u>De Guía:</u> se basa en el empleo de estímulos señal hacia los que los animales aprenden a aproximarse por hallarse asociados con la meta.</i></p>
<p style="text-align: center;"><b>APRENDIZAJE CARTOGRÁFICO</b></p>	<p><i>Se basa en la memoria sobre la localización de un lugar, con respecto a la configuración de pistas disponibles en el entorno circundante.</i></p>

**Tabla 1.** Clasificación del aprendizaje espacial propuesta por O'Keefe y Nadel, (1978).

Como se ha argumentado previamente, la región hipocampal de los humanos, parece ser crucial para la memoria declarativa (Cohen y Squire, 1980) o episódica (Vargha-Khadem y cols, 1997; King y cols, 2002; Smith y Mizumori, 2006) en diferentes tipos de información (visual, espacial, olfatoria, auditiva, etc...). Esta relación, sin embargo, no es tan clara en otras especies animales y existe gran controversia en torno al papel preciso que la formación hipocampal desempeña en roedores. El hipocampo podría participar en esta especie animal, de modo similar a lo observado en humanos, en una función general de memoria o podría restringirse a la memoria espacial (O'keefe y Nadel, 1978; Nadel, 1991).

De forma experimental, numerosos estudios animales han mostrado la sensibilidad de algunas tareas de aprendizaje para detectar alteraciones hipocampales (Aggleton y cols, 1992; Morris y cols, 1982; 1990; Olton y Papas, 1979; Ramos, 1998). No obstante aún es prematuro agrupar estas tareas para formular una teoría unificada sobre la función del hipocampo. Los resultados derivados de estos estudios sugieren principalmente dos funciones generales del hipocampo en la memoria animal (Santín y cols, 2000).

1. La función del hipocampo en la memoria animal se restringe a la formación y utilización de representaciones espaciales.
2. La función del hipocampo en la memoria animal es más general, centrada en la formación y uso de representaciones relacionales.

En apoyo al papel que la formación hipocampal mantiene con el procesamiento de información espacial pueden citarse los estudios con lesiones y registros electrofisiológicos. Estos estudios no sugieren una participación general del hipocampo en todas las formas de navegación, más bien su participación se restringe a aquellas formas de navegación que O'Keefe y Nadel (1978) denominaron cartográficas y a la navegación basada en la integración de la ruta (Whishaw, 1998), sin hallarse directamente relacionado con la navegación táctica (O'Keefe y Nadel, 1978).

A favor de la relación que la formación hipocampal tiene con el procesamiento de información espacial, se pueden citar numerosos trabajos electrofisiológicos que han confirmado la existencia de "células de lugar" en el hipocampo. Estas neuronas hipocampales incrementan su tasa de descarga cuando el animal se encuentra en un lugar concreto del espacio (O'Keefe y Dovstrovsky, 1971; Olton, 1977) y percibe un estímulo o desarrolla una conducta en un lugar concreto (O'Keefe y Nadel, 1978; Nadel, 1991). Son numerosos los estudios electrofisiológicos que indican que existen neuronas piramidales en la región 1 y 3 del cuerno de Ammón (CA<sub>1</sub> y CA<sub>3</sub>) que disparan en relación a la posición del animal en el ambiente. Estas células de lugar están activas durante la exploración y la localización de lugares (Olton, 1977; Nadel, 1991); así cuando las ratas son expuestas a estímulos nuevos en un campo abierto, las células de lugar se vuelven progresivamente activas en determinados lugares del espacio, hasta que la localización de sus campos receptivos se vuelve estacionaria (Muller y Kubie, 1989). Además, los campos receptivos de las células hipocampales están controlados por el entorno, ya que, rotando las pistas se produce una rotación también en los campos receptivos espaciales. No obstante, este control del contexto no se debe a una simple exposición a los estímulos, porque cuando las pistas se eliminan, la mayor parte de las células, muestran campos receptivos espaciales similares a los observados cuando las pistas están presentes. Todos estos datos indican que la activación de las células de lugar no se desencadena simplemente por la percepción visual (Muller y Kubie, 1989; O'keefe y Speakman, 1987; Quirk y cols, 1990).

Además de la importancia de las células de lugar hipocampales, recientemente se han descubierto poblaciones de neuronas relevantes en la computación espacial que se

desarrolla en el hipocampo, denominadas genéricamente “neuronas de dirección de la cabeza”. Estas células direccionales son diferentes a las células de lugar y aunque su localización neuroanatómica aún no ha sido establecida definitivamente, se han encontrado en diversas regiones relacionadas con el procesamiento espacial como la formación hipocampal y la corteza parietal posterior (Taube y cols, 1996). Básicamente, la actividad de estas neuronas está relacionada con la orientación de la cara del animal en relación al entorno y son independientes de la localización (Taube y cols, 1990; Muller y cols, 1991; Rank, 1984). Una propiedad importante de estas células es su capacidad para mantener su actividad aún cuando las pistas ambientales hayan sido eliminadas o las luces se hayan apagado (Taube y cols, 1990). Lo que sugiere que las células de dirección de la cabeza, al igual que las células de lugar hipocampales, poseen memoria y no son activadas simplemente por la estimulación sensorial, sino que representan algunos aspectos del entorno (Poucet, 1993).

Los estudios de lesiones en la formación hipocampal, también permiten relacionar el sistema hipocampal con la memoria espacial, ya que esta memoria es extremadamente dependiente del hipocampo en roedores. Estos estudios indican que el daño del hipocampo o de las estructuras asociadas (fimbria-fórnix, septum, corteza entorrinal y complejo subicular) provocan severos y permanentes déficits en numerosas habilidades espaciales como la navegación en la piscina circular de Morris (Morris y cols, 1982; 1990; Brandeis y cols, 1989) y la ejecución en el laberinto radial (Olton, 1977; 1978; Olton y cols, 1979; Olton y Papas, 1979; Carlson, 1996). Las lesiones hipocampales, también provocan déficits en la exploración normal de las ratas y estas ratas no presentan patrones normales de habituación (Foreman y Stevens, 1987), sin hallarse afectadas las habilidades de discriminación sensorial simple (Markowska y Lukaszewska, 1981). A pesar de las graves alteraciones que provocan las lesiones hipocampales sobre el procesamiento espacial, no se puede considerar como una disfunción espacial general, ya que no se observan deterioros en la retención de información espacial bien aprendida, pese a que no se pueda adquirir nueva información espacial (McNaughton y cols, 1989; Poucet y cols, 1991). Estas observaciones sugieren que el hipocampo no es el lugar de almacenamiento de la información espacial a largo plazo, siendo una región crítica para la adquisición inicial de la información espacial.

Los resultados mostrados hasta ahora sugieren que el hipocampo es importante en la formación de memorias espaciales, pero de manera similar a lo observado en sujetos humanos con lesiones hipocampales, se podría pensar que el hipocampo está

relacionado también con comportamientos no espaciales (Berger y cols, 1983; Weiss y cols, 1996; Eichenbaum y cols, 1987; Otto y Eichenbaum, 1992; Young y cols, 1994; Gothard y cols, 1996).

Wood y cols, (1999) observan como las ratas entrenadas en una tarea de desemparejamiento demorado con la muestra (basada en información olfativa y desarrollada en diferentes lugares), mostrando un incremento en la tasa de disparos de numerosas neuronas hipocampales (CA<sub>1</sub> y CA<sub>3</sub>). Esta activación neuronal se relacionaba claramente con los eventos perceptivos, conductuales o cognitivos, sin importar la localización en la que se encontraban los animales, indicando claramente que los eventos no espaciales son fundamentales en la representación hipocampal y que el hipocampo puede ser una estructura de conocimiento global para registrar episodios específicos (Wood y cols, 1999). De este modo, el hipocampo podría relacionarse, en ratas con la formación de memorias episódicas, tal y como ha sido frecuentemente observado en sujetos humanos con lesiones hipocampales. Estos resultados, sin embargo, no niegan la importancia de agrupaciones neuronales hipocampales en el procesamiento espacial, ya que sus resultados sugieren que, tanto la información espacial como no espacial, son componentes fundamentales de las representaciones hipocampales.

En este mismo sentido, Alkon y cols, (1991) mantienen que el sistema hipocampal es la base neuroanatómica de las memorias declarativas, caracterizadas fundamentalmente por representaciones relacionales en la que las memorias están fuertemente interconectadas, pueden activarse por todos los inputs previamente asociados y que se expresa de manera flexible en contextos nuevos. Contrariamente, los sistemas no hipocampales se considerarían la base de la memoria procedimental, caracterizada por formar representaciones no relacionales, en las que las memorias son funcionalmente independientes unas de otras y presentan rigidez en el procesamiento de situaciones o contextos particulares. Este modelo permite analizar de forma global, la relación que el aprendizaje espacial mantiene con la formación hipocampal. De este modo, los aprendizajes espaciales, como el aprendizaje en la piscina circular de Morris, podrían implicar asociaciones complejas (representaciones relacionales) y su correcta ejecución dependería de una formación hipocampal funcional.

Los resultados mostrados hasta ahora ofrecen evidencias anatómicas y electrofisiológicas (principalmente de las células de lugar) que apoyan las teorías relacionales sobre la función hipocampal. Modelos relacionales avalados por numerosas evidencias experimentales han sido propuestos y defendidos por numerosos autores, y se

han construido teorías generales sobre la función del hipocampo en la memoria. Como ejemplos podemos citar a Sutherland y Rudy (1989) que han propuesto otras teorías sobre el funcionamiento de la formación hipocampal conocida como teoría de la asociación configuracional. Básicamente, en esta teoría se sugiere que el sistema hipocampal combina la representación de eventos estimulares elementales o simples para formar representaciones únicas, proporcionando un marco teórico que permite interpretar muchas de las investigaciones realizadas hasta la fecha que explicaría la función principal de la formación hipocampal en términos de memorias relacionales.

Morris (1981) examinó la naturaleza relacional de las representaciones hipocampales en una tarea espacial desarrollada en la piscina circular. En ella se requiere localizar una plataforma de escape no visible usando las pistas distales extralaberínticas del recinto experimental. Una de las características de esta tarea era que los animales partían de lugares diferentes en cada uno de los ensayos, resultando más ventajoso representar la posición de la plataforma de escape, en función de las relacionales disposicionales entre las pistas. Las ratas con lesiones hipocampales, presentan severos déficits para solucionar esta tarea, sin embargo, no alteran de manera importante su capacidad para realizar aprendizajes de lugar guiados por las mismas pistas distales, cuando el lugar de salida es siempre constante (Morris y cols, 1982). No obstante, los animales controles son más rápidos en formar el aprendizaje espacial cuando se mantiene invariable el lugar de salida, lo que sugiere que la naturaleza de las representaciones es diferente. Según el análisis de Alkon y cols, (1991), todas las ratas (con lesiones hipocampales y controles) emplean una representación de las pistas distales más que una representación motora para identificar la plataforma de escape, como sugiere el hecho de que la trayectoria de navegación de las ratas normales está influenciada principalmente por las pistas sin importar el lugar de donde parten.

# II

## LA REGIÓN MAMILAR Y LA MEMORIA: PARTICIPACIÓN DEL NÚCLEO SUPRAMAMILAR

## 1. NEUROANATOMÍA Y CONEXIONES DE LA REGIÓN MAMILAR.

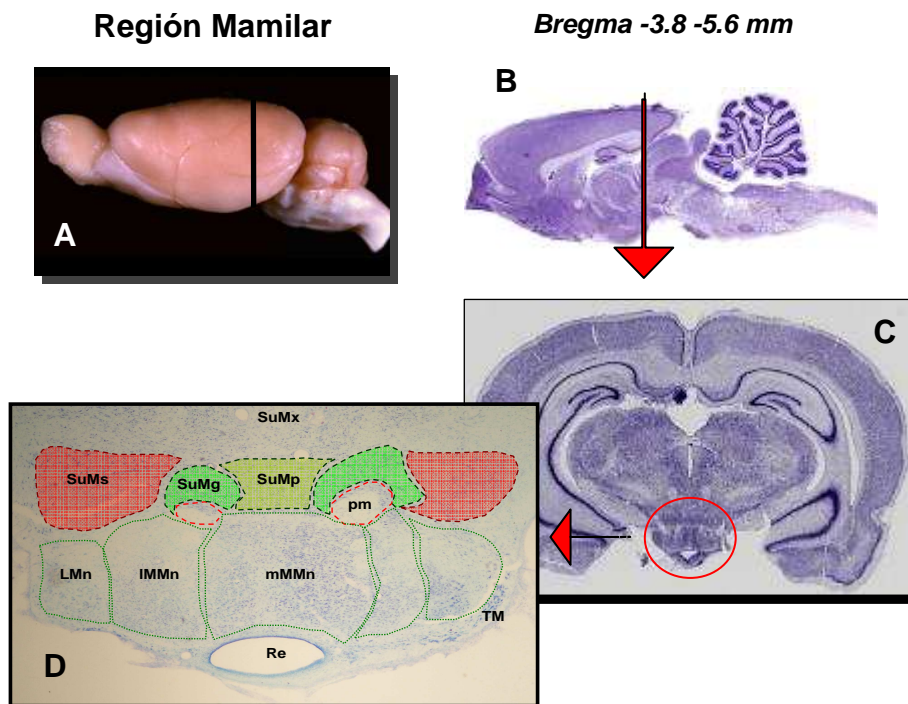
La región mamilar (RM) se localiza en la porción más caudal al hipotálamo y se compone por varios núcleos y fibras (Sziklas y Petrides, 1998). Los núcleos principales de esta región hipotalámica son los cuerpos mamilares (CCMM), el núcleo premamilar, el núcleo supramamilar (SuM) y el núcleo tegmental ventral (TV) (Sziklas y cols, 1996). De estos núcleos son los cuerpos mamilares y el núcleo supramamilar los que se han asociado de modo más consistente con la modulación del hipocampo y con la memoria.

Los cuerpos mamilares (CCMM) constituyen el conjunto de núcleos más voluminoso de la región mamilar. En rata, la descripción morfológica más completa de los CCMM es la realizada por Allen y Hopkins (1989), diferenciando: Núcleo Mamilar Lateral (LMn); Núcleo Mamilar Medial pars lateralis parte rostral (MMlr); Núcleo Mamilar Medial pars lateralis parte caudal (MMlc); Núcleo Mamilar Medial pars medialis (Mmmn); Núcleo Mamilar Medial pars medianus; Núcleo Mamilar Medial pars basalis y Núcleo Mamilar Medial pars posterior (Figura 2).

Los cuerpos mamilares presentan una amplia conectividad con diferentes núcleos cerebrales a través del fórnix, del pedúnculo mamilar (pm) y de los tractos mamilotalámico (mt) y mamilotegmental (Mtg) (Raisman y cols, 1966; Cruce, 1977). De este modo y basándonos en los trabajos de diferentes neuroanatomistas (Allen y Hopkins, 1988; 1989; Hayakawa y Zyo, 1991; Seki y Zyo, 1989; Shibata, 1987) destacamos las conexiones siguientes:

Las aferencias descendentes, proceden principalmente del complejo subicular, de la corteza infralímbica, de la corteza retrosplenial, de la corteza prefrontal medial, del núcleo de la banda diagonal de Broca, del núcleo septal lateral y del núcleo hipotalámico anterior. Con respecto a las aferencias ascendentes, éstas parten del núcleo tegmental ventral de Gudden (TV) y de la “pars compacta” del núcleo central superior (CC). A su vez, las principales conexiones eferentes de los cuerpos mamilares se establecen con los núcleos anteromedial, anteroventral y anterodorsal del tálamo, el núcleo tegmental ventral de Gudden, la pars compacta del núcleo central superior, el núcleo pontino medial y el núcleo pontino tegmento-reticular.

El núcleo supramamilar (SuM) se localiza dorsalmente a los cuerpos mamilares y ventral al área posterior del hipotálamo (Pan y McNaughton, 2004). Este pequeño núcleo hipotalámico puede dividirse en al menos dos subnúcleos (Paxinos y Watson, 1998): la porción latero-caudal denominada SuM lateral (SuMl) y la porción medial, limitada a ambos lados por el SuM lateral, denominada SuM medial (SuMm).



**Figura 2.** Esquema de la ubicación de los cuerpos mamilares (CCMM) y núcleo supramamilar (SuM). A. Vista lateral del cerebro de rata, donde se muestra en el eje antero-posterior la localización de los CCMM y el SuM. B. Sección sagital del cerebro de rata teñido con violeta de cresilo, donde se señala el lugar donde se encuentra los CCMM y el SuM. C. Corte coronal de un cerebro de rata teñido con azul de toluidina, donde se señala la ubicación de los CCMM y el SuM. D. Sección coronal de cerebro de rata a nivel de hipotálamo posterior (azul de toluidina) donde se señala la localización de los principales subnúcleos de los CCMM (LMn: Núcleo Mamilar Lateral; IMMn: Núcleo Mamilar Medial Lateral; Mmmn: Núcleo Mamilar Medial Mediano); y del SuM (SuMp: porción parvicelular del SuM; SuMg: porción grandicelular del SuM; SuMs: porción externa del SuM); SuMx: decusación del SuM; pm: pedúnculo mamilar; TM : núcleo tuberomamilar; Re: receso del tercer ventrículo.

Recientemente, Pan y McNaughton (2004) han propuesto una nueva clasificación para dividir este núcleo basándose en criterios celulares. De este modo, proponen dividir el núcleo supramamilar en tres porciones principales (Figura 2):

1. Porción parvicelular del SuM (SuMp): constituye la región más medial del núcleo supramamilar, correspondiendo a la porción más medial del SuM en la clasificación de Paxinos y Watson (1998). Está constituida por células de pequeño



tamaño (10-15  $\mu\text{m}$  de diámetro), de ahí el nombre que recibe (Borhegyi y Leranth, 1997).

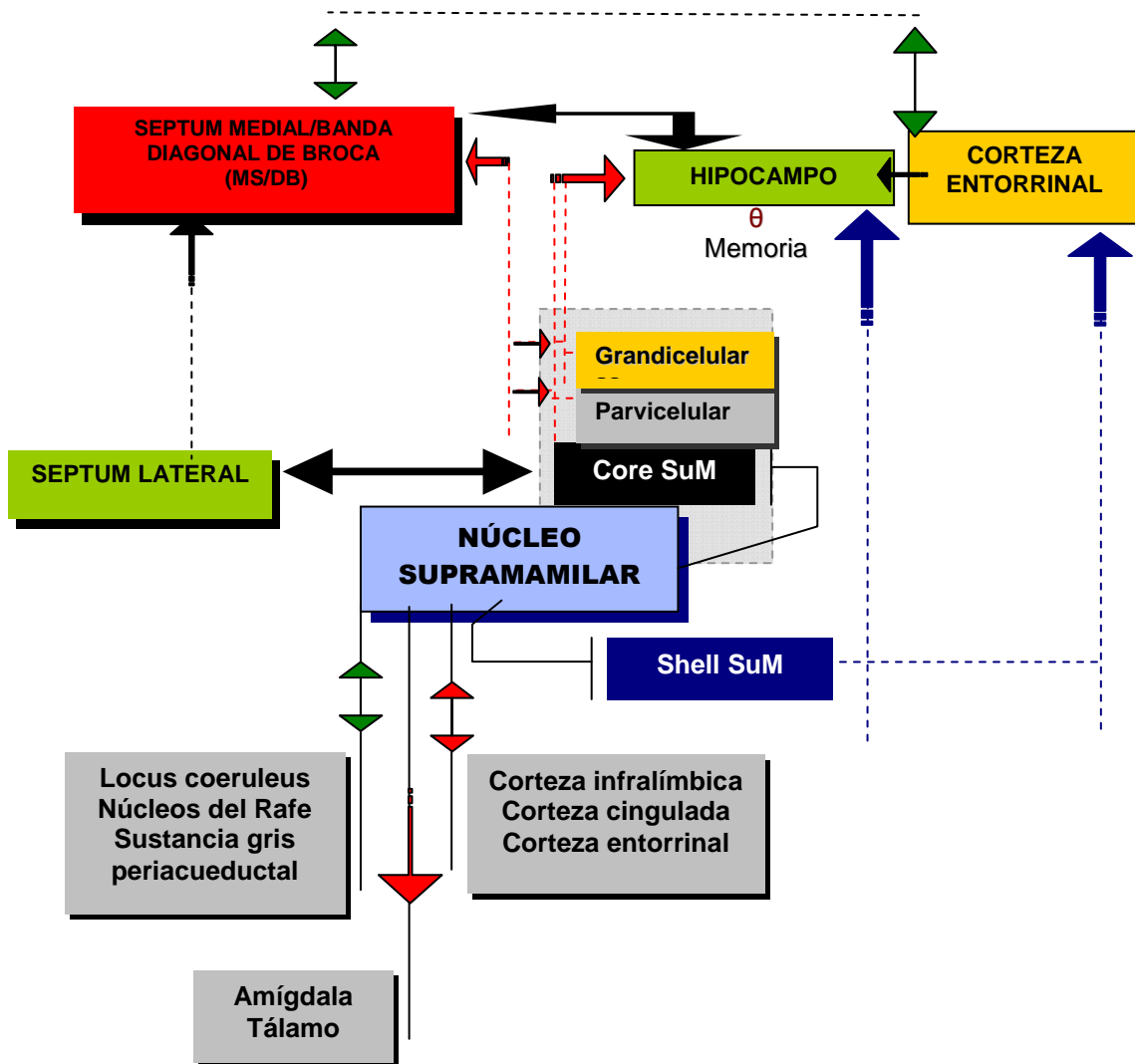
2. Porción grandicelular del SuM (SuMg): esta agrupación neuronal se localiza a ambos lados del SuMp, localizado dorsal y lateralmente al pedúnculo mamilar. Esta pequeña región se corresponde principalmente con las porciones laterales del núcleo supramamilar medial, en la clasificación de Paxinos y Watson (1998). La denominación de porción grandicelular se debe a la presencia de neuronas de gran tamaño (alrededor de 30  $\mu\text{m}$  de diámetro) (Borhegyi y Leranth, 1997). Esta porción, junto con el SuMp, constituyen el “core” del SuM.
3. Porción externa del SuM o Shell (SuMs): Se corresponde con la porción más lateral del núcleo supramamilar lateral en la clasificación de Paxinos y Watson (1998), siendo la región más lateral del núcleo supramamilar. Celularmente, el SuMs se caracteriza por la presencia de las neuronas más pequeñas halladas en el SuM (con tamaño inferior a los 10  $\mu\text{m}$  de diámetro) (Borhegyi y Leranth, 1997).

Este núcleo hipotalámico se encuentra densamente conexionado con el septum y con el hipocampo (Figura 3). Las fibras eferentes del SuM se originan principalmente en las porciones laterales del núcleo y se distribuyen densamente hacia el septum medial y la banda diagonal de Broca (MS/DB). El SuM establece sinapsis excitatorias tanto con neuronas GABAérgicas como colinérgicas en la MS/DB, siendo glutamatérgicas un subconjunto importante de estas proyecciones excitatorias (Leranth y Kiss, 1996; Borhegyi y Freund, 1998; Gonzalo-Ruiz y cols, 1999). Estas sinapsis excitatorias se localizan en aquellas neuronas septales que a su vez proyectan al hipocampo (Kiss y cols, 2000). Las proyecciones desde MS/DB al SuM proceden de un conjunto de neuronas localizadas lateralmente a la línea media (Leranth y cols, 1999).

Las proyecciones del SuM hacia el hipocampo se originan principalmente en los dos tercios laterales del SuM (Vertes y kocsis, 1997) inervando el giro dentado (GD) y la región CA<sub>2</sub>/CA<sub>3a</sub> del cuerno de Ammón en el hipocampo dorsal (Haglund y cols, 1984; Nitsch y Leranth, 1994). En concreto estas proyecciones hipocampales del SuM, finalizan en la capa granular del giro dentado y en el stratum oriens y piramidal de la región CA<sub>2</sub>/CA<sub>3a</sub>, tanto en células principales (granulares y piramidales) como GABAérgicas (Kiss y cols, 2000). Estas proyecciones directas de las neuronas del SuM,

son de tipo excitatorio, siendo el glutamato el neurotransmisor mayoritariamente empleado en esta vía (Kiss y cols, 2000). Además de estas eferencias hipocampales, el SuM recibe aferentes hipocampales, siendo éstas de menor importancia (Pan y McNaughton, 2004).

De este modo, el patrón de proyecciones que presenta el SuM, permite pensar que pueda modular la función hipocampal de dos modos: de forma directa a través de sus proyecciones hipocampales y de forma indirecta, a través del área septal medial (Kiss y cols, 2002). En este sentido, Vertes y McKenna (2000) han demostrado la existencia de un subconjunto de neuronas SuM con proyecciones colaterales al septum medial y al hipocampo, lo que indica la capacidad de estas neuronas para modular funcionalmente ambas regiones al mismo tiempo.



**Figura 3.** Conexiones del complejo mamilar (con especial importancia del SuM) (Vertes, 1988; 1992; Gonzalo y Ruiz y cols, 1999; Vertes y McKenna, 2000).

Por otro lado, el SuM se encuentra conectado entre otras regiones (Figura 3) con: el núcleo reuniens del tálamo, el septum lateral, la amígdala, los núcleos del Rafe y la corteza entorrinal. Las proyecciones del núcleo supramamilar hacia el núcleo reuniens son particularmente notorias porque este núcleo constituye la primera fuente de aferentes talámicos hacia la formación hipocampal (Dollerman-Van der Weel y Witter, 1996; Herkenham, 1978; Su y Bentivoglio, 1990; Wouterlood y cols, 1990; Yanagihara y cols, 1987). Las fibras del núcleo reuniens terminan de manera selectiva en la región del CA<sub>1</sub> del cuerno de Ammón, y establecen sinapsis asimétricas con las dendritas distales de las células piramidales (Dollerman-Van der Weel y Witter, 1996; Wouterlood y cols, 1990).

## **2. PAPEL DE LA REGIÓN MAMILAR EN LA MEMORIA.**

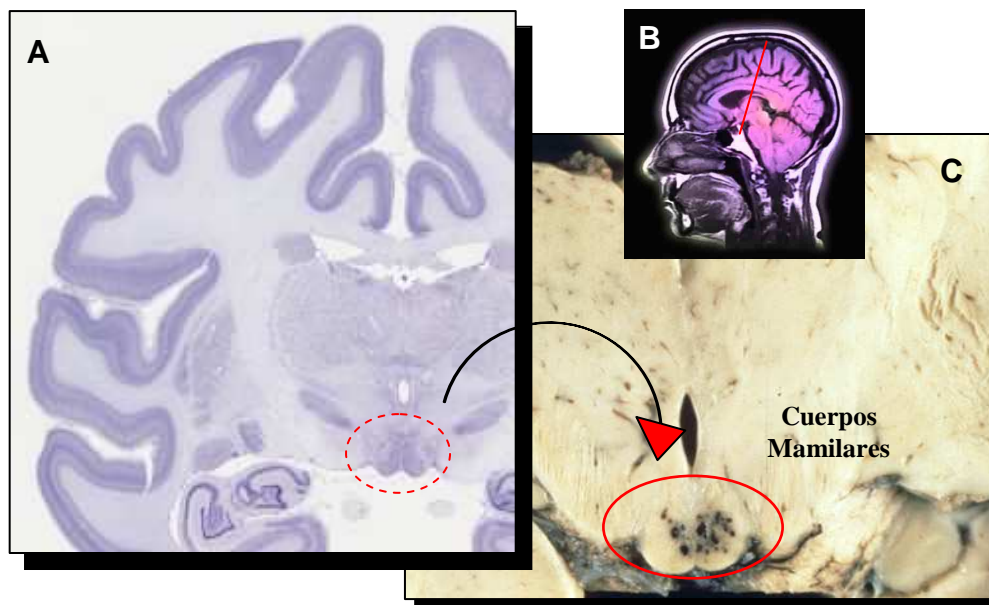
De los diversos componentes anatómicos del sistema de la memoria declarativa quizá, sean los cuerpos mamilares la estructura cerebral que cuenta con menor apoyo experimental. El papel de los cuerpos mamilares en la memoria humana está sometido a un intenso debate, aún no está muy clara la función de éstos, dentro de los distintos síndromes amnésicos que se observan en humanos. No obstante, diferentes estudios clínicos han observado anormalidades en la región mamilar en pacientes con importantes deterioros de memoria, lo que hace pensar que, esta región cerebral desempeña un papel importante en determinadas patologías que cursan con deterioros de memoria. De este modo, una característica de los sujetos que desarrollan el síndrome de Korsakoff es el severo déficit de memoria. Deterioro de memoria relacionado en muchos casos con un daño importante en la región mamilar (Kopelman y Stanhope, 1998; Kolb y Wishaw, 1993).

Aunque diferentes estudios neuropatológicos han identificado en este síndrome varias lesiones de materia gris en la zona periventricular y periacueductal, la característica neuropatológica más consistente es la alteración de la región de los cuerpos mamilares. Gudden (1896) fue uno de los primeros investigadores en observar las alteraciones en los cuerpos mamilares en pacientes alcohólicos (Figura 4), relacionando sus observaciones con los casos descritos por Wernicke (1881). Previamente Wernicke informó de los cambios patológicos en las paredes del tercer

ventrículo, en la materia gris alrededor del acueducto cerebral y en el suelo del cuarto ventrículo.

Más recientemente, Victor y cols, (1971) encontraron cambios en los cuerpos mamilares en pacientes que sufrían la psicosis de Korsakoff (Figura 4). No obstante, defienden que las alteraciones de memoria en estos sujetos se deben a las lesiones encontradas en el núcleo medio dorsal del tálamo y/o cuerpos mamilares.

En la actualidad, permanece confuso el peso relativo que cada uno de estos núcleos cerebrales y sus interconexiones tienen en el desarrollo del síndrome amnésico. De hecho, aún continúa siendo polémico si este síndrome es una entidad sindrómica unitaria o si en realidad es dissociable en subsíndromes. Para clarificar esta cuestión, ha de determinarse si ciertas agrupaciones sintomáticas correlacionan con lesiones en estructuras concretas o si un circuito cerebral da cuenta de la totalidad del síndrome amnésico.



**Figura 4.** A. Corte coronal de cerebro humano teñido con azul de toluidina, donde se observa claramente la localización de los CCMM. B. Sección sagital de cerebro humano obtenida por resonancia magnética nuclear a nivel de los CCMM. C. Imagen macroscópica correspondiente a un corte coronal a nivel de cuerpos mamilares, donde se observa una importante necrosis en dicha región, en un paciente con encefalopatía de Wernicke-Korsakoff. Modificado de [pathology.mc.duke.edu](http://pathology.mc.duke.edu).

Los datos presentados hasta el momento, parecen apoyar la importancia de los cuerpos mamilares en la memoria declarativa, pero ¿resulta suficiente la lesión de la

región mamilar para originar un desorden en la memoria? Diferentes estudios neuropsicológicos parecen confirmar esta suposición.

En este sentido, en el estudio del paciente B. J. se observó un daño bilateral en los cuerpos mamilares, acompañado del daño adicional en algunos núcleos adyacentes hipotalámicos y en la pituitaria. El núcleo supramamilar y el tracto mamilotalámico también formaron parte de la lesión cerebral resultante. El estudio neuropsicológico reflejó que, aunque otras habilidades permanecieron intactas, B. J. sufrió una marcada amnesia anterógrada (Holdstock y cols, 1995).

Otros estudios neuropsicológicos han mostrado que la alteración morfológica circunscrita a los cuerpos mamilares debido a diferentes procesos patológicos es suficiente para inducir alteraciones severas y persistentes de memoria declarativa. De este modo, Dusoir y cols, (1990) observaron una grave alteración de la memoria visuoespacial y de la memoria verbal (en tareas de recuerdo libre y demorado, pero no de reconocimiento) debida a la lesión bilateral de los cuerpos mamilares. De forma similar, los trabajos de Loesch y cols, (1995); Tanaka y cols, (1997) e Hildebrant y cols, (2001) observaron que después de la extirpación de diferentes tipos de tumores cerebrales (craneofaringioma y germinoma), se evidenciaba una lesión neuroanatómica restringida a los cuerpos mamilares. Esta única lesión, observable mediante resonancia magnética nuclear, se relacionaba con alteraciones de memoria declarativa, principalmente de recuerdo libre y de recuerdo demorado, sin hallarse alterado el reconocimiento.

Estos resultados, indican que la lesión restringida de los cuerpos mamilares es condición suficiente para inducir alteraciones de la memoria declarativa en humanos. De forma más específica, estas alteraciones se relacionan principalmente con la dificultad o incapacidad de estos sujetos para formar nuevos recuerdos, de duración variable, a partir del momento de la lesión de los cuerpos mamilares.

Complementariamente, los estudios realizados en roedores (Thompson y cols, 1964; Mair y Lacourse, 1992; Sutherland y Rodríguez, 1989; Harper y cols, 1994; Tonkiss y Rawlins, 1992; Aggleton y cols, 1990) y primates no humanos (Zola-Morgan y cols, 1989; Holmes y cols, 1983a; 1983b) han intentado explicar, de un modo más exhaustivo la implicación de los CCMM en los procesos de aprendizaje y memoria. En la actualidad, aún se desconoce el papel preciso que los cuerpos mamilares desempeñan en los procesos de aprendizaje y memoria, aunque algunas investigaciones pretenden determinar las tareas en las que es necesaria su participación, analizando

específicamente cuales son las demandas mnésicas de las tareas necesarias para observar la implicación de los cuerpos mamilares (tipo de información a procesar, dificultad de la tarea, tipo de asociaciones, etc...).

Entre los estudios que han abordado estos cometidos, se encuentran los desarrollados por Beracochea y su grupo, que apoyan una participación de los cuerpos mamilares en tareas de memoria de trabajo cuando se incrementa la dificultad (Beracochea y Jaffard, 1987; 1990; 1995; Beracochea y cols, 1989). Sin embargo, para Sziklas y su grupo no son los cuerpos mamilares los directamente implicados en los procesos de memoria, sino más bien la región mamilar, que incluye tanto el núcleo mamilar medial, el núcleo mamilar lateral, el núcleo supramamilar y el área tegmental ventral entre otras estructuras. Para ellos, la región mamilar, es un componente fundamental del circuito hipocampal y se relaciona principalmente con la memoria de trabajo espacial (Sziklas y Petrides, 1993; 1998; Sziklas y cols, 1996) haciéndose evidente esta relación, en animales con lesiones extensas de la región mamilar junto con un incremento de la dificultad de la tarea (Sziklas y Petrides, 1998).

A pesar de la especificidad sugerida por Sziklas y Petrides, (1998), se podría pensar que esta región es importante en la ejecución de cualquier tipo de tarea espacial, suposición no apoyada por las investigaciones actuales, ya que, por ejemplo, no se han observado alteraciones en tareas de discriminación de lugar en animales con lesiones en los cuerpos mamilares (Krazem y cols, 1995). Pero, ¿por qué no afectan las lesiones de los cuerpos mamilares a la ejecución en estas tareas espaciales? Posiblemente la respuesta pueda hallarse en la clase de asociaciones y estrategias que el animal ha de formar y emplear para solucionar las tareas. De este modo, Neave y cols, (1997), evaluaron la ejecución de animales con lesiones de los cuerpos mamilares en una tarea de discriminación egocéntrica, en la que los animales tenían que aplicar una solución motora (giro del cuerpo hacia la derecha) y observaron que los animales eran capaces de solucionar eficazmente esta tarea. Este hecho, sugiere que al menos, alguna de las tareas de discriminación espacial, pueden solucionarse empleando información sobre los giros del cuerpo o mediante pistas presentes en el entorno que los animales con lesiones en los cuerpos mamilares serían capaces de solucionar. Además, Neave y cols, (1997), muestran que los animales con lesiones mamilares, emplean estrategias basadas en la orientación egocéntrica, aún cuando las respuestas correctas dependan de estímulos espaciales externos.

De forma similar, estudios desarrollados por Sziklas y Petrides, (1998), también indican que algunas pruebas realizadas en el laberinto en T, pueden solucionarse mediante asociaciones visuo-motoras simples, siendo perfectamente solucionadas por animales con lesiones mamilares. Pero tampoco parece probable que los cuerpos mamilares participen en un procesamiento general de los aspectos aloecéntricos, ya que, cuando el entrenamiento se basa en realizar asociaciones entre estímulos y localizaciones espaciales con información aloecéntrica, sin posibilidad de aplicar soluciones basadas en estrategias de respuesta motora, la lesión de los cuerpos mamilares tampoco afecta a su adquisición (Sziklas y cols, 1996). Basándose en estos estudios, Sziklas y Petrides, (1998), sugieren que la región mamilar no es importante para formar asociaciones entre pistas espaciales (tanto con procesamiento egocéntrico como aloecéntrico) y estímulos visuales. No obstante, este aspecto es objeto de gran polémica y contrariamente, Aggleton y su grupo sostienen que los cuerpos mamilares, en caso de desempeñar algún papel importante en los procesos de memoria (Aggleton y cols, 1990; 1991; 1995; Aggleton y Shagal, 1993) será específico de aquellas tareas que impliquen procesamiento aloecéntrico (Neave y cols, 1997).

Profundizando en la participación de los cuerpos mamilares en el procesamiento de información espacial, Santín y cols (1999) demostraron que lesiones electrolíticas del núcleo mamilar medial (MMn) altera selectivamente la capacidad de los roedores para realizar correctamente una tarea de memoria de trabajo espacial en el laberinto acuático de Morris, sin verse afectado el aprendizaje de una tarea espacial con demandas de memoria de referencia. De ese modo, Santín y cols (1999) defienden que la participación de los cuerpos mamilares en la memoria, se restringe principalmente a aquellas tareas con componentes espaciales y con demandas de memoria de trabajo, al menos bajo el paradigma de emparejamiento demorado con un lugar (DMTP). De igual modo, Santín y cols, (2003) mostraron que el entrenamiento de ratas en el laberinto acuático, en una tarea de memoria de trabajo, pero no en una de memoria de referencia, inducía un aumento de la inmunorreactividad para la proteína c-Fos en el núcleo mamilar medial. No obstante, se observó este aumento en la porción más dorsal de la región mamilar, en el núcleo supramamilar medial, sin embargo, este incremento, se asoció con el procesamiento general del contexto espacial.

Todos estos resultados, indican que la región mamilar participa en la memoria espacial y al menos la porción medial de los cuerpos mamilares (núcleo mamilar medial), se asocia con el procesamiento espacial sólo en tareas con demandas de

memoria de trabajo. No obstante, la mayor parte de los estudios de lesión, sobre los que se asientan parcialmente estas conclusiones, además de incluir los cuerpos mamilares (en conjunto o subnúcleos específicos), afectan sistemas de fibras como el tracto mamilotalámico y/o lesiones variables del núcleo supramamilar, localizado dorsalmente a los cuerpos mamilares. De este modo, los resultados obtenidos han de ser interpretados con cautela hasta que se conozca de forma precisa el papel de cada uno de los núcleos de la región mamilar en la memoria.

### **3. FUNCIONES DEL NÚCLEO SUPRAMAMILAR.**

A lo largo de la última década, se ha acumulado numerosa evidencia que muestra como la alteración funcional del SuM afecta a las propiedades neurofisiológicas del hipocampo. Es ampliamente conocido que una de las propiedades neurofisiológicas de las neuronas hipocampales es la presencia del ritmo theta, una banda de frecuencia que oscila entre los 4 y los 8 Hz (Pan y McNaughton, 2004). Este ritmo theta no es una propiedad intrínseca de las neuronas hipocampales, sino que se encuentra bajo el control de un marcapasos, localizado en el área septal medial (Pan y McNaughton, 2004). No obstante, en los últimos años se ha observado de forma repetida, la importancia del SuM en la modulación/generación de este ritmo en el hipocampo (Vertes y Kocsis, 1997; Kirk, 1998). De este modo, han sido tres los hallazgos experimentales que permiten sustentar esta modulación funcional del hipocampo por parte del SuM. Los primeros estudios demostraron que la estimulación de la región SuM inducía este ritmo en el hipocampo (Vertes, 1981). Posteriormente, se observó que microinyecciones de procaína en el SuM provocaban la abolición del ritmo theta hipocampal generado espontáneamente o el que se obtiene con la estimulación de regiones reticulares (Kirk y McNaughton, 1993; Bland y cols, 1994). Y por último, también se ha aportado una extensa evidencia experimental que demuestra que las neuronas del SuM disparan sincrónicamente con el ritmo theta (Kirk y McNaughton, 1993; Bland y cols, 1994). De este modo, estos estudios neurofisiológicos demuestran claramente, la importancia del SuM en la generación/modulación del ritmo theta hipocampal (Figura 3).

El ritmo theta se observa electroencefalográficamente en el hipocampo de las ratas durante la exploración, el arousal, la atención, el movimiento y diferentes formas de aprendizaje (Vertes y Kocsis, 1997; Sainsbury, 1998; Olvera-Cortes y cols, 2004). De este modo, se ha hipotetizado que las células piramidales hipocampales emplean este



ritmo para codificar aspectos espaciales del entorno y/o aspectos relacionados con el procesamiento cognitivo (Huxter y cols, 2003), como la memoria de reconocimiento (Wiebe y Staubli, 2001). Lesiones que eliminan el ritmo theta deterioran la exploración normal (Pan y McNaughton, 2002), el aprendizaje espacial (Pan y McNaughton, 1997) y la ejecución en tareas que requieren la recuperación de aprendizajes previos, como el aprendizaje en el laberinto en T (Hasselmo y cols, 2002).

Estos datos, indican que la actividad theta durante el aprendizaje, se encuentra fuertemente asociada con el procesamiento de información que se desarrolla en el hipocampo. De este modo, la modificación del ritmo theta hipocampal constituiría un indicador sobre procesamiento hipocampal, lo cual daría lugar a modificaciones conductuales observables durante la evaluación de la memoria y el aprendizaje. Otros estudios, han demostrado también como el ritmo theta se relaciona con los fenómenos plásticos que se desarrollan en el hipocampo durante el aprendizaje y la memoria. De este modo, es bien conocido que las sinapsis excitatorias hipocampales presentan un aumento duradero en sus potenciales sinápticos, después de una estimulación presináptica de alta frecuencia. Este fenómeno denominado potenciación a largo plazo (PLP), se considera uno de los mecanismos celulares de la memoria (Bliss y Collingridge, 1993; Martin y Morris, 2002). Recientemente, se ha observado que el ritmo theta hipocampal participa de forma directa y activa en la modulación de este fenómeno plástico, ya que se induce preferentemente aplicando la estimulación en el pico del ritmo theta (Hyman y cols, 2003).

Nakanishi y cols, (2001) han demostrado que la estimulación de alta frecuencia del SuM emparejada con una estimulación tetánica débil de la vía perforante, provoca la aparición de PLP en las sinapsis que establece la vía perforante con las células del giro dentado. De este modo, el input excitatorio del SuM en esta vía, es dependiente de actividad, lo cual abre la posibilidad a un tipo de modulación de la función hipocampal, ampliamente asociada con el contexto del aprendizaje y la memoria. Posiblemente, la actividad del SuM a través de sus proyecciones directas hipocampales, contribuya de forma significativa a los procesos asociativos que se desarrollan en el hipocampo durante el procesamiento mnésico.

Complementariamente, aunque escasa, se dispone de alguna evidencia experimental que permite asociar directamente el SuM con la memoria. Los primeros datos que apoyan esta hipótesis, se observan en los experimentos diseñados para estudiar el papel de los cuerpos mamilares en la memoria, como hemos descrito en el

apartado anterior. La lesión de la región mamilar conduce a la aparición de severas alteraciones de memoria tanto en animales de experimentación (Santín y cols, 1999; Beracochea y cols, 1989; Sziklas y Petrides, 1993; 1998; Sziklas y cols, 1996; Aggleton y cols, 1990; 1991; 1995) como en humanos (Loesch y cols, 1995; Tanaka y cols, 1997; Dusoir y cols, 1990; Hildebrant y cols, 2001). No obstante, la lesión experimental de los cuerpos mamilares, en muchos casos, llevaba asociada la lesión del SuM en su totalidad o de un porcentaje más o menos importante del núcleo, lo cual hace pensar en su posible participación en los déficits mnésicos encontrados. Más recientemente, diferentes estudios se han centrado en estudiar la contribución del SuM en el aprendizaje y la memoria. De este modo, se ha observado un aumento en la inmunorreactividad c-Fos en el SuM asociada con la memoria espacial (Santín y cols, 2003; Vann y cols, 2000). En un intento de vincular la alteración de la función hipocampal y los déficits comportamentales inducidos por la inactivación funcional de las neuronas del SuM, el grupo de McNaughton ha observado que la microinyección intra-SuM de clordiazepóxido, reduce la frecuencia theta hipocampal y deteriora la memoria espacial (Woodnorth y McNaughton, 2002a; 2002b; Pan y McNaughton, 1997; 2002). No obstante, este déficit en memoria espacial fue muy leve, posiblemente por la escasa participación de la vía SuM-hipocampo en la tarea seleccionada (Aranda y cols, 2006). En apoyo a esta sugerencia, Sahidi y cols, (2004) han demostrado la participación del SuM en tareas de memoria espacial, mostrando una participación preferencial de este núcleo en una tarea con componentes de memoria de trabajo.

El papel del núcleo supramamilar en el contexto de la conducta emocional, ha sido menos estudiado. No obstante, estudios recientes sugieren que la alteración funcional del SuM reduce la aparición de conductas ansiogénicas tanto de tipo condicionado como incondicionado. Hasta la fecha, Pan y McNaughton (2002) han desarrollado el primer trabajo experimental en el que se estudia directamente, el papel del SuM y regiones colindantes en el comportamiento emocional. De este modo, la lesión del SuM provoca una reducción del miedo en un paradigma de miedo contextual, un aumento en la exploración en el campo abierto y favorece la inhibición conductual en un paradigma de condicionamiento operante. Pan y McNaughton, (2002) han sugerido que el SuM estaría más relacionado con los comportamientos emocionales que con el procesamiento cognitivo. En apoyo de esta teoría, Sahidi y cols, (2004), usando como modelo de estudio el aprendizaje de la evitación pasiva, han observado que el SuM es crucial para que el hipocampo consolide un aprendizaje de tipo emocional.

Los mecanismos neurobiológicos precisos mediante los que el SuM está relacionado con la conducta emocional, no son del todo claros. Se ha hipotetizado que el SuM modula la conducta emocional, como la conducta de miedo/ansiedad, mediante la modulación de la función hipocampal (Pan y McNaughton, 2004). Esta modulación puede ser directa, a través de eferencias directas, principalmente al giro dentado (GD) y CA<sub>2</sub>/CA<sub>3a</sub>, o de forma indirecta, modulando la actividad de las neuronas del septum medial que proyectan al hipocampo. Tanto el septum medial como el hipocampo desempeñan un papel importante en las conductas de ansiedad. La inducción de lesiones permanentes y reversibles del septum medial, provocan la aparición de comportamientos ansiolíticos en diferentes modelos animales (Degroot y Treit, 2004; Menard y Treit, 1999), indicando un papel estimulador por parte del septum en condiciones normales. Con respecto al hipocampo, se ha evidenciado una clara disociación entre la porción dorsal y la ventral en cuanto a su implicación emocional. De este modo, la alteración funcional del hipocampo dorsal sólo afecta a la evitación pasiva, sin alterar la ejecución en tareas de miedo incondicionado (Treit y Menard, 1997; Degroot y Treit, 2004). De forma contraria, el hipocampo ventral, es crucial en la regulación de las respuestas de miedo/ansiedad, ya que su alteración funcional, induce efectos ansiolíticos reduciendo el miedo de los sujetos (Degroot y Treit, 2004). De este modo, se observa una relación clara del hipocampo ventral con los procesos emocionales, mientras que la participación del hipocampo dorsal se ha asociado con procesos cognitivos. Estos hallazgos permiten sugerir un doble efecto modulador del SuM sobre la función hipocampal, a nivel dorsal (regulando funciones cognitivas) y a nivel ventral (regulando funciones emocionales). Es posible, que la existencia de proyecciones directas e indirectas desde el SuM hacia el hipocampo, pueda constituir la base de este papel dual en la memoria y en la emoción. De hecho, las proyecciones hipocampales directas del SuM sólo se han observado en su porción dorsal (Vertes y McKenna, 2000), mientras que las proyecciones indirectas, mediadas por el MS/DB se distribuyen ampliamente por la región dorsal y ventral hipocampales (Yoshida y Oka, 1990).

# III

## OBJETIVOS

1. Diseñar una tarea válida para registrar el aprendizaje espacial de los roedores, de modo que resulte útil para planificar tareas basadas en el procesamiento allocéntrico de la información (**experimento 1**).
2. Estudiar la implicación de la región supramamilar en la adquisición, consolidación y recuperación de un aprendizaje espacial con demandas de memoria de referencia (**experimentos 2 y 3**).
3. Estudiar la implicación de la región supramamilar en la memoria de trabajo espacial y conocer más específicamente los mecanismos psicológicos que sustentan la relación de la región supramamilar con la memoria de trabajo (**experimentos 4 y 5**).
4. Analizar la participación de la región supramamilar en la modulación del miedo condicionado e incondicionado (**experimento 6**).
5. Estudiar cómo afecta la inactivación funcional de la región supramamilar a la actividad neuronal de dos zonas de proyección, el área septal medial y la región CA<sub>3</sub> del hipocampo dorsal (**experimento 7**).

# IV

## EXPERIMENTO 1

### Aprendizaje espacial con demandas de memoria de referencia y de trabajo

## 1. INTRODUCCIÓN.

Como hemos reflejado en la introducción, resulta habitual el estudio de las capacidades de aprendizaje y memoria en animales de experimentación empleando tareas espaciales. La navegación espacial se considera una conducta altamente compleja y organizada, que se caracteriza por la búsqueda de lugares en el entorno. Alyan y Jander (1994), sostienen que está caracterizada por el desarrollo de movimientos autocontrolados en el espacio y que se dirigen a localizar un lugar no visible para los sujetos. No obstante, la navegación como problema espacial, puede solucionarse mediante la aplicación de diferentes estrategias (espaciales y no espaciales) (Chamizo, 1990).

En esta tesis doctoral hemos propuesto el estudio de las funciones de la región supramamilar haciendo uso de tareas que implican el procesamiento espacial del entorno por parte de los animales. Con el fin de asegurar que los animales son capaces de aprender tareas de memoria, que requieren el procesamiento espacial del entorno, hemos desarrollado un primer experimento en el que se pretende:

- 1- Comprobar la capacidad de las ratas para desarrollar un aprendizaje espacial en un entorno, y la dependencia de este aprendizaje de un sistema de representación cartográfica o basada en el procesamiento de información espacial aloéctrica.
- 2- Comprobar la capacidad de las ratas para aprender tareas con diferentes demandas de memoria. Por un lado, la capacidad de aprender a solucionar eficazmente una tarea espacial que implique demandas de memoria de referencia. La memoria de referencia, es independiente del ensayo, y se emplea para aprender reglas generales. Mediante estos procedimientos espaciales aprenden a localizar un lugar concreto dentro de un entorno (Santín y cols, 1999). En estos procedimientos, la información disponible para solucionar una tarea de memoria de referencia es constante a lo largo del entrenamiento y se refuerza mediante el entrenamiento repetido (Frick y cols, 1995; Young y cols, 1996). Por otro lado, evaluar la capacidad de las ratas para aprender a solucionar tareas espaciales cuya solución dependa de la aplicación de una regla de memoria de trabajo. Esta memoria es una forma de memoria a corto plazo (MCP) e independiente de la memoria a largo plazo (MLP) (Stewart y Morris, 1993). Es una memoria temporal y dependiente del ensayo, ya que la memoria formada a corto plazo tan sólo es relevante para solucionar en un ensayo la tarea (Santín y cols, 1999). La tarea de memoria de trabajo seleccionada en este experimento implica además, la

aplicación de una regla de emparejamiento demorado con la muestra (DMTS) de tipo espacial. En concreto, las ratas han de aprender a localizar un lugar que contiene el reforzador en un único ensayo (ensayo de muestra). A continuación un ensayo de recuerdo evalúa la capacidad de las ratas para recordar la localización espacial del reforzador durante el ensayo de muestra. En los ensayos siguientes, se modifica la localización del reforzador, siendo éste el motivo que determina que la información presentada sea sólo relevante por un ensayo. Este procedimiento de evaluar las capacidades espaciales constituye el mejor procedimiento para evitar el uso de estrategias no cartográficas (no basadas en el procesamiento aloentrnico de la información contextual) en la solución de tareas espaciales (Brandeis y cols, 1989).

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS.

### A. Animales.

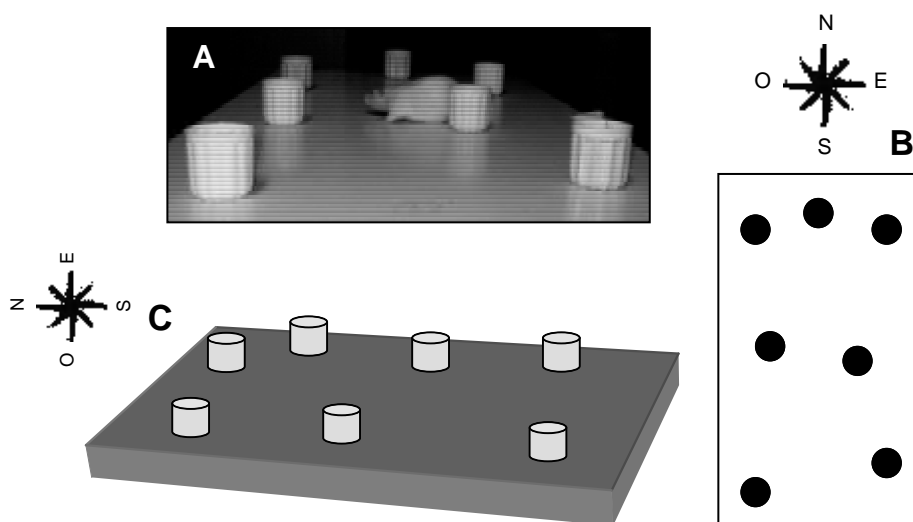
Se emplearon 15 ratas macho Sprague–Dawley (Criffa. Barcelona) con pesos iniciales de 346 +/- 60 gr. Los animales se mantuvieron en condiciones estándar de estabulación: temperatura de 22 +/- 3°C y ciclo constante de luz/oscuridad de 12 horas (8:00 a.m./20:00 p.m.) a lo largo de todo el experimento. Todos los animales disponían de comida y bebida “*ad libitum*” hasta el inicio de la restricción de la dieta (una semana antes del registro comportamental). Después de los 7 días de restricción los animales experimentaron una pérdida de peso de un 20%-25%.

La manipulación y uso de los animales se realizó conforme a la normativa vigente, el Real Decreto 1201/2005, de 10 de octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (BOE de 21 de octubre de 2005), Ley 32/2007 de 7 de noviembre, para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio (BOE de 8 de noviembre de 2007). Igualmente se siguió la Recomendación de la Comisión, de 18 de junio de 2007, sobre las líneas directrices relativas al alojamiento y al cuidado de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. (Notificada con el número C (2007) 2525), texto 2007/526/CE, D.O.C.E., de 30 de julio de 2007. Los protocolos de experimentación animal empleados fueron aprobados por el Comité Ético de la Universidad de Málaga.



## B. Aparatos.

Las mediciones comportamentales, se desarrollaron en un laberinto construido en madera y de las siguientes dimensiones: (75 cm x 150 cm x 75 cm). Sobre él se situaban 7 recipientes de igual tamaño, forma y color que contenían arena y donde se dispensaba el reforzador (Figura 5). Mezclado con la arena de los recipientes se añadió orégano, con el fin de evitar que los animales experimentales localizaran el reforzador orientándose por el olfato. Otra medida que se tomó para evitar la localización del reforzador mediante claves olfativas fue proveer de ambientadores las salas experimentales empleadas en la investigación. Las habitaciones experimentales se encontraban dotadas de diferentes claves espaciales (póster, mobiliario y experimentador) que permiten la orientación espacial basándose en su localización en la sala. Las pruebas de conducta se realizaron entre las 17:00 y 21:00 horas.



**Figura 5.** Laberinto empleado para el entrenamiento de las ratas en las tareas de memoria. A. Fotografía que muestra la localización de los siete recipientes, donde se puede localizar el reforzador en el laberinto. B y C. Esquemas que representan la posición de los recipientes en el laberinto.

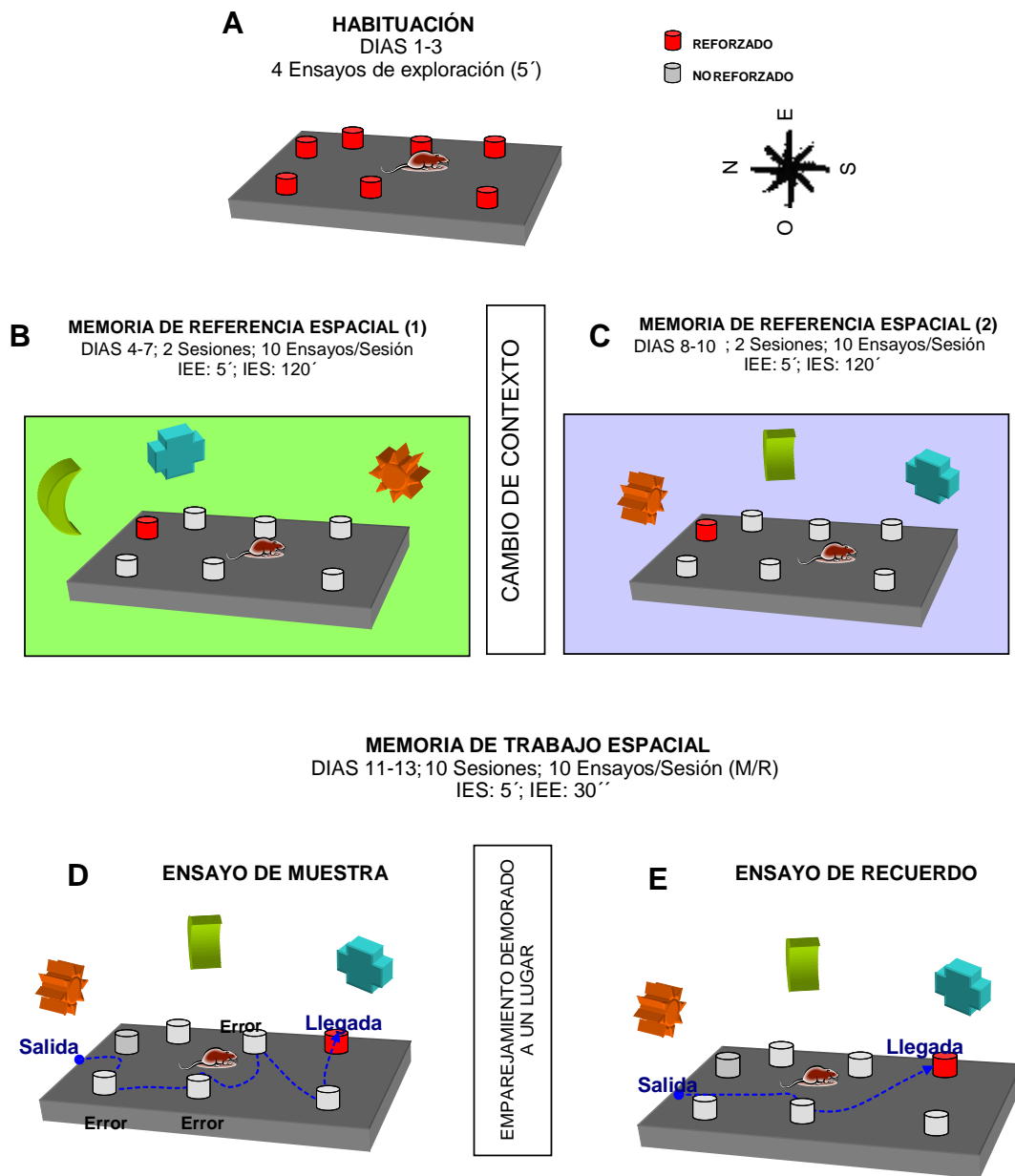
## C. Pruebas conductuales.

Antes de comenzar con las pruebas de aprendizaje de lugar los animales fueron manipulados por el experimentador durante 5 días consecutivos y sometidos a un ensayo de exploración libre para favorecer la habituación de los roedores a las condiciones estímulares de la prueba. La manipulación previa así como la exposición al contexto experimental y al laberinto, permiten controlar una serie de factores que afectan al aprendizaje de las tareas de memoria y que podrían enmascarar los resultados obtenidos. La manipulación de los animales antes del entrenamiento minimiza el estrés de los

animales, fenómeno que perjudica el aprendizaje (Kaneto, 1997) y algunos fenómenos fisiológicos asociados como la inducción de potenciación a largo plazo (Diamond y cols, 1990; Xu y cols, 1997). La exposición de los animales de laboratorio a nuevas situaciones puede interferir en el aprendizaje de tareas espaciales, mientras que los animales que están familiarizados con el contexto, aprenden antes y más eficazmente (Hölscher, 1999). En concreto, la preexposición al laberinto permite un mejor conocimiento del contexto y facilita la construcción de un mapa espacial (Chamizo y Mackintosh, 1989).

Al día siguiente del ensayo de exploración libre en el laberinto, se procedió con la *fase de habituación*. Durante esta fase, los animales exploraron durante tres días consecutivos el laberinto (4 ensayos de 5 minutos de duración cada uno) (Figura 6A). El periodo de habituación permitió que progresivamente los animales fueran capaces de obtener el reforzador (comida) de cada uno de los 7 recipientes en los que se encontraba. La habituación finalizó cuando los animales ingerían el reforzador del interior de los siete recipientes.

*Aprendizaje de lugar con demandas de memoria de referencia:* Una vez finalizado el periodo de habituación se procedió con el entrenamiento en una tarea de memoria espacial (Figura 6B, C). El entrenamiento se realizó durante 4 días consecutivos. Cada día de entrenamiento constaba de dos sesiones con 10 ensayos cada una. El intervalo entre ensayos fue de 5 minutos y el intervalo entre sesiones de 2 horas. El reforzador siempre se localizaba en el mismo recipiente, mientras que el lugar de salida siempre era diferente. La posición de salida del animal se aleatorizó entre 7 posibles salidas desde el margen del laberinto. Una vez que todos los animales alcanzaron un buen grado de aprendizaje espacial, se modificó el contexto experimental, cambiando de habitación el laberinto pero manteniendo reforzado el mismo recipiente empleado previamente. Esta modificación contextual nos permitió estudiar si el aprendizaje de lugar era resultado del uso de claves espaciales o si por el contrario se trataba de un aprendizaje no basado en el procesamiento de estímulos allocéntricos. El aprendizaje de lugar en el nuevo contexto se extendió durante 3 días consecutivos, manteniéndose las mismas sesiones, ensayos e intervalos entre sesiones y ensayos empleados previamente.



**Figura 6.** Imagen que representa el protocolo experimental empleado para el desarrollo del experimento 1. A. Muestra la fase de habituación en donde los animales se familiarizan con el aparato experimental y el entorno espacial. B. Representación gráfica del primer aprendizaje espacial con demandas de memoria de referencia en un primer contexto. En C se representa el cambio de contexto que se realizó para estudiar su efecto sobre el aprendizaje espacial previamente establecido. D y E. Representación gráfica del entrenamiento en la tarea de memoria de trabajo espacial. Durante el ensayo de muestra (D) el animal aprende a localizar un reforzador en un lugar concreto y durante el ensayo de recuerdo (E) el animal tiene que encontrar el reforzador en el mismo lugar en el que se encontraba durante el ensayo de muestra (tarea de emparejamiento demorado a un lugar). IEE: intervalo entre ensayos; IES: intervalo entre sesiones; M: ensayo de muestra; R: ensayo de recuerdo.

Aprendizaje de lugar con demandas de memoria de trabajo: Una vez finalizada la tarea de aprendizaje espacial con demandas de memoria de referencia, se procedió con el entrenamiento en la tarea de memoria de trabajo. El entrenamiento se realizó durante 3 días consecutivos y cada uno de los días los animales se sometieron a 10 sesiones de entrenamiento, con un intervalo entre sesiones de 5 minutos (Figura 6D, E). En cada sesión de entrenamiento los animales disponían de dos ensayos: un primer ensayo de muestra y un segundo ensayo de recuerdo, con un intervalo entre los ensayos de 30 segundos. Durante el ensayo de muestra se aleatorizaban el lugar de salida (se seleccionaba un lugar de salida entre siete posibles desde el margen externo del laberinto) y la localización del reforzador (situado en uno de los siete recipientes del laberinto). Durante el ensayo de recuerdo se mantuvieron constantes ambas localizaciones, lugar de salida del animal y localización del reforzador. A lo largo de las 10 sesiones de entrenamiento en cada uno de los días, se variaron aleatoriamente el lugar de salida y el recipiente que contenía el reforzador.

#### **D. Diseño experimental y análisis de los datos.**

Todos los análisis estadísticos se realizaron usando el programa para tratamiento de datos STATISTICA 7.0 para Windows (StatSoft, Inc).

Aprendizaje de lugar con demandas de memoria de referencia: Se utilizó un diseño intrasujeto donde todas las unidades experimentales del grupo pasa por todas las condiciones experimentales. La variable intrasujeto fueron los días de entrenamiento con 7 niveles.

Las variables dependientes registradas fueron: el “*número de errores*” cometidos en cada ensayo y el tiempo desde que el animal es depositado en el laberinto hasta que obtiene el reforzador (“*tiempo de búsqueda*”). El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo mediante la aplicación de un ANOVA de medidas repetidas, tanto en el estudio de la variable “*número de errores*” como en la variable “*tiempo de búsqueda*”. Cuando la F de la ANOVA era estadísticamente significativa se aplicaron pruebas de significación a posteriori (diferencias honestamente significativas (HSD) de Tukey para pares de medias).

Aprendizaje de lugar con demandas de memoria de trabajo: Se empleó un diseño intrasujeto, donde la variable intrasujeto fue el ensayo que disponía de dos niveles (ensayo de muestra y ensayo de recuerdo).

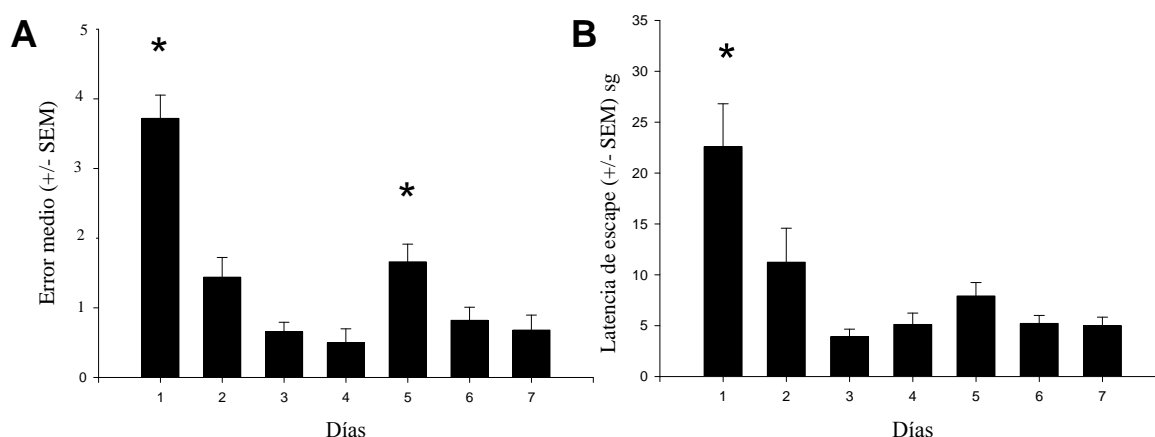
Las variables dependientes registradas fueron el “*número de errores*” y el “*tiempo de búsqueda*”. El análisis estadístico se realizó mediante la aplicación de la “t” de Student para muestras relacionadas.

El número de animales empleados para los análisis estadísticos fue de 15 ratas.

### 3. RESULTADOS.

*Aprendizaje de lugar con demandas de memoria de referencia:* El análisis de la varianza del “*número de errores*”, mostró diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes días ( $F_{(6,84)} = 60.30$ ;  $p < 0.001$ ) (Figura 7A). Los análisis a posteriori mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre los días de aprendizaje: día 1 frente a los restantes días; día 2 frente a los días 1, 3, 4, 6 y 7; día 3 frente a los días 1, 2, 5 y 7; el día 4 muestra diferencias significativas con los días 1, 2 y 5; el día 5 muestra diferencias estadísticamente significativa con los días 1, 3, 4, 6 y 7; el día 6 muestra diferencias estadísticamente significativas con los días 1, 2 y 5; y el día 7 frente a los días 1, 2, 3 y 5.

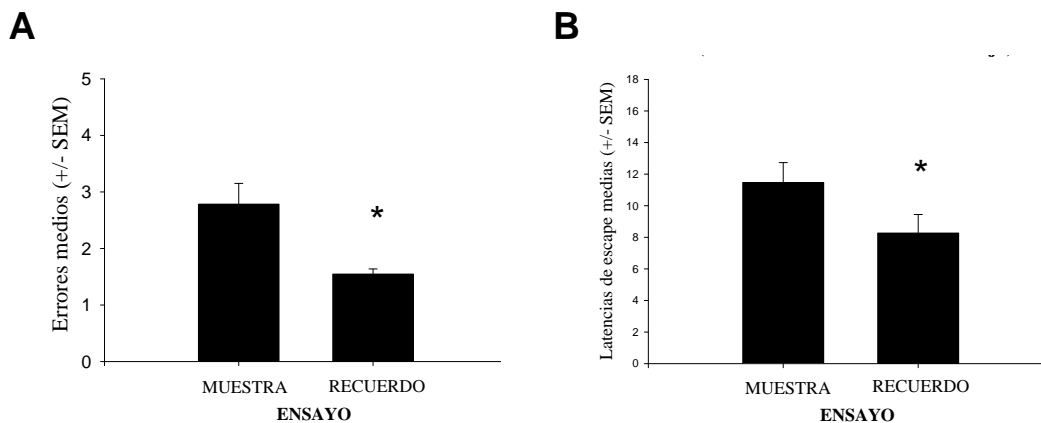
Con respecto a la variable dependiente “*tiempo de búsqueda*”, el ANOVA reflejó la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes días de registro ( $F_{(6,84)} = 21.38$ ;  $p < 0.001$ ). Los análisis a posteriori mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0.05$ ), entre los distintos registros de aprendizaje, (Figura 7B). Día 1 frente a los días 2, 3, 4, 5, 6, 7; día 2 frente a los días 1, 3, 4, 6, 7; día 3 frente a los días 1 y 2; día 4 frente a los días 1 y 2; día 5, muestra diferencias con el día 1; día 6 frente a los días 1 y 2; día 7 frente a los días 1 y 2.



**Figura 7.** Representación gráfica del aprendizaje espacial con demandas de memoria de referencia. En las gráficas se observa como a medida que los animales son entrenados disminuyen los errores (A) (días 1-4), y el tiempo que tardan en encontrar el reforzador (B) (días 1-4). El cambio de contexto estimular

provoca un aumento de los errores (A) (día 5), que disminuyen a medida que los animales son entrenados en la tarea (días 6 y 7). El cambio de contexto no influye de forma tan significativa en el tiempo que los animales tardan en encontrar el reforzador (B) (días 5-7). \* $p < 0.05$ .

Aprendizaje de lugar con demandas de memoria de trabajo: El número de errores medios cometidos por los animales fue en los ensayos de la muestra (3.37) y el error medio en el ensayo de recuerdo (1.9). La comparación entre los 2 tipos de ensayos nos muestra como los animales cometen más errores en el ensayo de la muestra que en el ensayo de retención, ( $t_{14} = 9.394$ ;  $p < 0.001$ ) (Figura 8A). El análisis del “*tiempo de búsqueda*” mostró diferencias estadísticamente significativas entre los 2 tipos de ensayos (muestra-recuerdo) ( $t_{(14)} = 8.377$ ;  $p < 0.001$ ). El valor medio del tiempo utilizado por los roedores en los ensayos de muestra fue de 9.07 segundos y el de los ensayos de retención de 6.05 segundos (Figura 8B).



**Figura 8.** Representación gráfica del aprendizaje espacial con demandas de memoria de trabajo. En las gráficas se observa que disminuyen los errores (A) y el tiempo que tardan en encontrar el reforzador (B) en el ensayo de recuerdo en comparación con los valores registrados durante el ensayo de muestra. \* $p < 0.05$ .

#### 4. DISCUSIÓN.

Este primer experimento fue diseñado para estudiar la capacidad de las ratas para solucionar tareas de memoria que requieran el uso de información espacial, en un laberinto que posteriormente será usado para estudiar la participación de la región supramamilar en la memoria espacial. Este tipo de tareas permiten que el experimentador module las reglas de memoria que los animales de experimentación han de aplicar en el aprendizaje de la tarea espacial. No obstante, los animales pueden

solucionar tareas espaciales y aprender a localizar lugares concretos en el entorno aplicando diferentes estrategias: de guía, de orientación y espacial (procesamiento aloécéntrico de la información contextual) principalmente (Santín y cols, 2000).

Con la finalidad de confirmar que el procesamiento empleado por los animales para solucionar esta tarea era de tipo aloécéntrico-espacial, se procedió con dos aprendizajes espaciales en contextos estimulares diferentes (cambio de habitación con presencia de diferentes pistas extralaberínticas). Una vez que los roedores aprendieron la localización exacta del recipiente que contenía el reforzador, se cambió el laberinto a una nueva sala experimental, modificándose de este modo el entorno estimular. Los resultados muestran que el cambio de contexto estimular, afecta al aprendizaje espacial previamente adquirido y las ratas han de volver nuevamente a adquirir conocimiento acerca del entorno para localizar eficazmente la posición del reforzador (aumento del número medio de errores relacionado con el cambio de contexto) (Figura 7A). Es decir, los animales tienen que aprender la nueva configuración estimular de la sala experimental para poder aprender a localizar el reforzador con el mismo grado de eficacia que lo había conseguido durante el último día del aprendizaje espacial previo. Por otro lado, nuestros datos indican que aún cuando se produce un aumento del número medio de errores asociados al cambio del contexto, éste no afecta al tiempo que los animales tardan en encontrar el reforzador (no se observó un aumento estadísticamente significativa en el tiempo de búsqueda al cambiar el contexto) (Figura 7B). Esta ausencia de diferencias, probablemente se deba a la mayor rapidez que tienen los animales después de haber sido entrenados durante cuatro días en la tarea. En general, los resultados obtenidos indican que en esta tarea, la localización del reforzador en el laberinto se debe al aprendizaje de las relaciones espaciales (distancia, distribución, etc...) de las pistas extralaberínticas disponibles, hecho que permite situar espacialmente el reforzador. Si los animales hubieran empleado alguna señal visible (presencia de pistas o claves proximales) que señalizara la localización concreta del reforzador, no se hubiera observado un aumento en el número de errores al cambiar el contexto estimular. Es decir, los animales habrían mantenido el mismo grado de ejecución, observado durante los últimos ensayos del primer aprendizaje de lugar. De forma complementaria, tampoco es posible que los roedores ejecuten eficazmente esta tarea empleando una estrategia motora (de orientación), ya que los animales inician cada ensayo de entrenamiento saliendo desde posiciones diferentes. Esta característica de nuestro

diseño, impide que el uso de una estrategia motora (secuencia de movimientos estereotipados) permita identificar correctamente la ubicación del reforzador.

Por otro lado, la diferencia observada entre el primer día de aprendizaje espacial al comparar la ejecución en los dos contextos (días 1 y 5) (Figura 7), resulta coherente con el diferente grado de conocimiento procedimental de la tarea que tienen los animales en ambos días. Es decir, el primer día del aprendizaje espacial en el contexto 1, los roedores no conocen las demandas procedimentales de la tarea (posición del reforzador en un recipiente y regla de memoria), mientras que el quinto día, cuando se cambia de contexto experimental (contexto 2), los animales han adquirido conocimiento sobre esos aspectos. Este hecho, posiblemente explique la mayor rapidez y el menor número de errores que los animales cometen para aprender la localización del reforzador en un contexto nuevo.

En este mismo experimento, diseñamos una segunda tarea de aprendizaje espacial, que requiere que los animales adquieran y apliquen una regla de memoria diferente. En este caso la solución de la tarea espacial depende de la aplicación correcta de una regla de emparejamiento demorado con la muestra, siendo la muestra la posición de un reforzador en uno de los siete recipientes dispuestos a lo largo del laberinto. Este tipo de tareas se emplean principalmente para evaluar la memoria de trabajo (Goldman-Rakic, 1992; Fuster, 1995). Nuestros resultados muestran que las ratas normales reducen significativamente el número de errores y el tiempo empleado para localizar un reforzador durante el ensayo de recuerdo en una tarea de emparejamiento demorado a un lugar, es decir, solucionan eficazmente una tarea de memoria de trabajo espacial (Figura 8). Este tipo de tareas requieren que los animales representen información espacial acerca de la localización concreta del reforzador, y la mantengan activa durante un intervalo de tiempo (30 segundos en nuestra tarea) a fin de realizar una elección correcta durante el ensayo de recuerdo (Goldman-Rakic, 1992). El componente espacial de estas tareas es menos controvertido que en las tareas de memoria de referencia, ya que el cambio constante (entre sesiones) tanto del lugar de salida como de localización del reforzador impiden que los animales puedan emplear estrategias no espaciales (Brandeis y cols, 1989).

En conclusión, nuestros resultados muestran claramente que las ratas Sprague-Dawley empleadas en nuestro trabajo, son capaces de aprender a solucionar tareas espaciales, aplicando tanto una regla de memoria de referencia como una regla de memoria de trabajo (emparejamiento demorado con la muestra). Esta característica, nos



permitirá diseñar experimentos de intervención nerviosa, para estudiar las bases neuroanatómicas de la memoria espacial. De este modo, el uso de estas tareas constituyen un buen instrumento para estudiar la participación de la región supramamilar en el procesamiento general del espacio (la lesión o alteración funcional provocaría déficits de ejecución en ambas tareas) o la participación de la misma en un proceso más concreto (memoria de referencia y de trabajo de tipo espacial).

**V**

## **EXPERIMENTOS 2 y 3**

**Memoria de referencia espacial y región supramamilar**

## **INTRODUCCIÓN.**

Como hemos mencionado en la introducción de la presente tesis doctoral, la región mamilar ha sido objeto de estudio en relación con la memoria. Estos estudios, desarrollados tanto en sujetos humanos como en animales de experimentación han demostrado la importancia de esta región diencefálica en la memoria declarativa humana y en la memoria espacial (Wernicke, 1881; Gudden, 1896; Victor y cols, 1971; Harper, 2009). Sin embargo, en la actualidad, son muy pocos los estudios que se han preocupado por conocer el papel que la porción más dorsal de la región mamilar, donde se encuentra el núcleo supramamilar, desempeña en la memoria (en el apartado 3 (B) del 2º experimento y en el apartado 3 (B) del 3º experimento de este trabajo, se presenta la información más relevante sobre la implicación de la región supramamilar en la memoria de referencia espacial).

De este modo, el capítulo V de esta tesis doctoral se ha desarrollado para conocer con mayor detalle, la importancia de la región supramamilar en la memoria espacial. En concreto, este capítulo se dedica a estudiar la relación que esta región diencefálica tiene con la memoria espacial cuando los animales tienen que aprender a localizar la posición constante (memoria de referencia espacial) de un lugar en un entorno conocido. Para desarrollar este objetivo, se han diseñado dos experimentos, donde se estudiará postoperatoriamente la capacidad de los animales para aprender una nueva tarea espacial con demandas de memoria de referencia (experimento 2). En un experimento independiente (experimento 3) se estudiará de forma más detallada la implicación de la región supramamilar en la memoria de referencia espacial, y su participación en las fases de adquisición, consolidación y recuperación, mediante la inactivación temporal de esta región con tetradotoxina.

## **EXPERIMENTO 2: EFECTOS DE LA LESIÓN ELECTROLÍTICA DE LA REGIÓN SUPRAMAMILAR EN UNA TAREA DE MEMORIA DE REFERENCIA ESPACIAL.**

### **1. INTRODUCCIÓN.**

El experimento 2 que se presenta en este capítulo, constituye parte de un trabajo más general en el que se estudiaron la memoria de referencia espacial, la memoria de trabajo espacial y la respuesta de ansiedad de animales con lesiones en la región supramamilar. No obstante, la evaluación de cada uno de estos procesos se ha organizado de forma temática en capítulos sucesivos, para facilitar la claridad conceptual y expositiva. De este modo, en este quinto capítulo se presentarán sólo los resultados que tienen que ver con la memoria de referencia espacial.

Para desarrollar este experimento, los animales fueron entrenados preoperatoriamente y de forma consecutiva en tres tareas para estudiar la memoria de referencia espacial, la memoria de trabajo espacial y respuesta de ansiedad respectivamente. A continuación, los animales fueron asignados aleatoriamente a dos condiciones de tratamiento (lesión electrolítica de la región supramamilar y simulación de la misma). Postoperatoriamente, todos los animales volvieron a pasar por las mismas tareas comportamentales pero de modo inverso (respuesta de ansiedad, memoria de trabajo espacial y memoria de referencia espacial) (Figura 9). El entrenamiento preoperatorio facilitó que los animales adquirieran un elevado conocimiento del entorno espacial así como su entrenamiento en el uso de la información espacial para solucionar tareas con demandas de memoria diferentes. Asimismo, el entrenamiento postoperatorio en la tarea de memoria de referencia espacial nos permitió estudiar si la lesión de la región supramamilar alteraba la capacidad de los roedores para adquirir un nuevo aprendizaje espacial con demandas de memoria de referencia.

### **2. MATERIAL Y MÉTODOS.**

#### **A. Animales.**

Se emplearon 24 ratas macho *Sprague-Dawley*, con unos pesos iniciales de  $346 \pm 60$  grs. Todos los animales fueron suministrados por el centro de cría de animales de experimentación CRIFFA S.A. (Barcelona, España). Las condiciones de estabulación y

mantenimiento de los animales experimentales fueron las mismas que las empleadas para el desarrollo del experimento 1 (véase apartado 2° (A), página 36 de esta tesis doctoral).

Una vez que se finalizó con la restricción de la dieta, los animales se dividieron aleatoriamente en dos grupos:

1. Grupo lesionado (n = 15): los animales recibieron una lesión electrolítica en la región supramamilar (SuMr).
2. Grupo pseudo-lesionado (n = 9): los animales fueron sometidos al mismo proceso quirúrgico que los animales del grupo lesionado, pero no recibieron la administración de la descarga eléctrica.

La manipulación y uso de los animales se realizó conforme a la normativa vigente, (véase el apartado 2° (A) del experimento 1 del capítulo IV, página 36 de este trabajo).

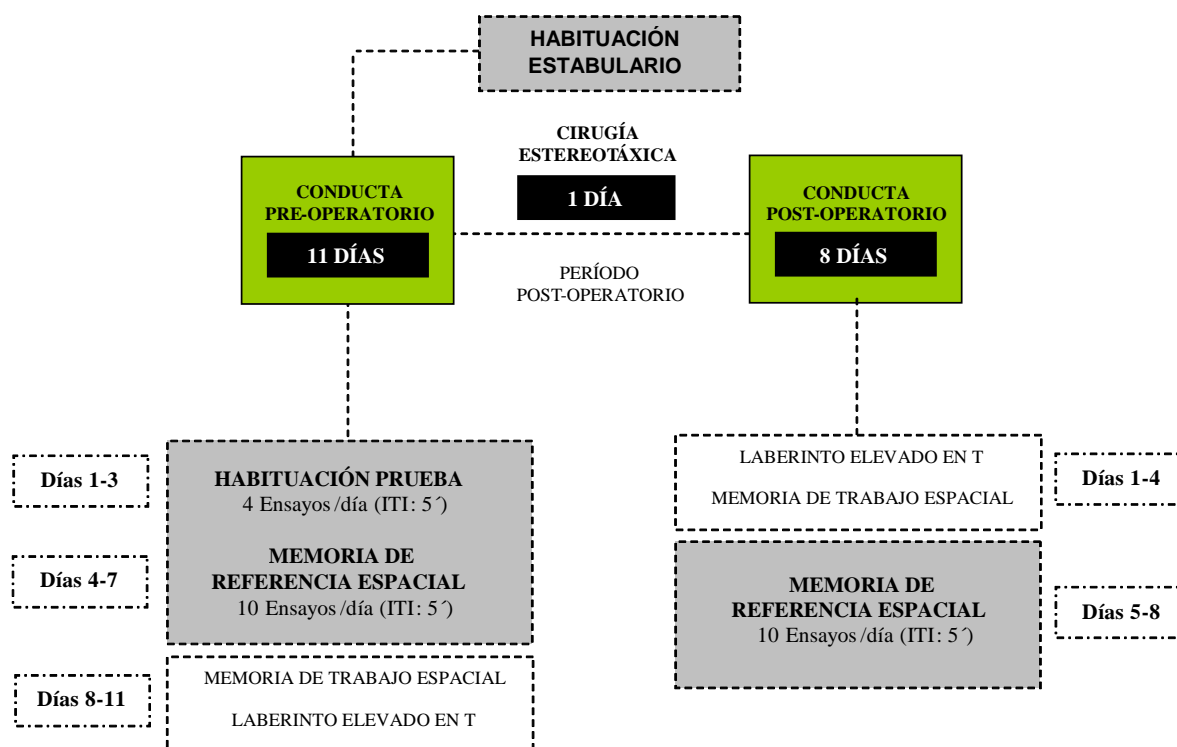
## **B. Procedimiento comportamental: memoria de referencia espacial.**

El estudio de memoria de referencia espacial en ratas, se realizó empleando el laberinto previamente descrito en el experimento 1, manteniéndose las mismas condiciones de control y manipulación de los animales (véase apartado 2° (B) del experimento 1, página 37 de esta tesis doctoral).

Una vez finalizada la adaptación de los animales al estabulario, la restricción de la dieta y la manipulación se continuó con el entrenamiento en las tareas comportamentales (nótese que en este capítulo, sólo se desarrollará el entrenamiento en la tarea de memoria de referencia espacial y en los capítulos posteriores se presentará el resto de tareas). El procedimiento comportamental se estructuró del siguiente modo (Figura 9):

1. Fase de habituación: con el fin de facilitar la habituación de los roedores a las condiciones estimulares, se administró un ensayo de exploración libre de 5 minutos de duración en ausencia de reforzadores. Al día siguiente, los siete recipientes fueron rellenados con el reforzador, permitiéndose que los animales exploraran libremente el laberinto para acceder a los reforzadores. Los animales se retiraban del laberinto cuando había pasado 5 minutos o habían comido los reforzadores de los 7 recipientes. Esta fase duró 3 días consecutivos y cada día se administraron 4 ensayos con un intervalo entre los mismos de 5 minutos. La posición de salida de cada animal se aleatorizó entre los posibles lugares de salida desde el margen del laberinto.

2. Fase de aprendizaje espacial con demandas de memoria de referencia: una vez finalizado el periodo de habituación se procedió con el entrenamiento en la tarea de memoria espacial (Figura 9). Esta tarea fue idéntica a la empleada durante el experimento 1 (apartado 2 (C), página 37 de este trabajo). Brevemente, el entrenamiento se realizó durante 4 días consecutivos con 10 ensayos por día y con un intervalo entre los ensayos de 5 minutos. El reforzador siempre permaneció en el mismo recipiente durante todo el periodo de entrenamiento, mientras que el lugar de salida de los animales se aleatorizó entre las 7 posibles salidas desde el margen del laberinto. De este modo, se evitaba la posible solución no espacial de la tarea. Se registraron el tiempo que los animales tardaron en localizar el reforzador (*tiempo de búsqueda*) y el número de recipientes visitados por los roedores antes de localizar el que contenía el reforzador (*número de errores*). Postoperatoriamente todos los animales fueron entrenados en la misma tarea de aprendizaje espacial con demandas de memoria de referencia, pero en este caso el reforzador se situó en un lugar diferente al empleado durante el entrenamiento preoperatorio.




**Figura 9.** Representación esquemática del diseño experimental usado en el experimento 2. Todos los animales se entrenaron en la tarea de memoria de referencia espacial antes y después de la intervención quirúrgica. Durante el periodo pre-operatorio, los animales fueron habituados al procedimiento experimental durante 3 días consecutivos (1-3 días) y entrenados en una tarea de memoria de referencia espacial durante 4 días consecutivos (4-7 días). A continuación se administraron las tareas de memoria de trabajo espacial y el laberinto elevado en T. Postoperatoriamente y después del entrenamiento en el

laberinto elevado en T y de la tarea de memoria de trabajo espacial, todos los animales volvieron a ser entrenados en una tarea de memoria de referencia espacial (días 5-8).

### C. Cirugía estereotáxica: lesión electrolítica de la región supramamilar.

Antes de iniciarse el procedimiento quirúrgico, los animales se anestesiaron haciendo uso del agente anestésico equitexina, que se obtiene mediante la mezcla de diferentes compuestos farmacológicos (en la Figura 10 se detallan los compuestos así como su preparación).

**EQUITEXINA (50mL)**

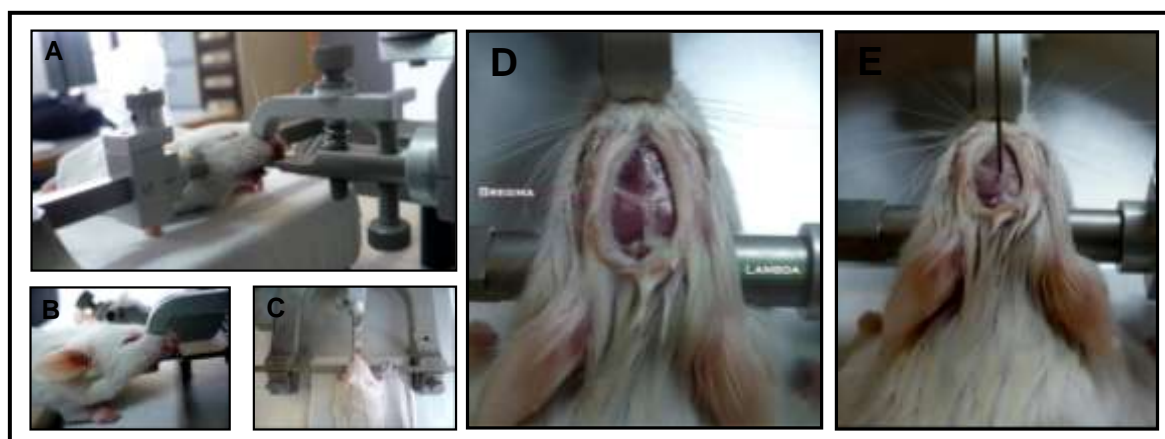
Pentobarbital Sódico: 0,5 gr..... $C_{11}H_{17}N_2O_3Na$ Alcohol absoluto: 5,87 mL..... $CH_3CH_2O_3OH$	<b>A</b>	
Hidrato de Cloral: 2,7 gr..... $C_2H_3Cl_3O_2$ Propilen Glicol: 21,83 mL..... $C_3H_8O_2$	<b>B</b>	
Sulfato de Magnesio: 1,08 gr..... $CH_3CH_2O_3OH$ Agua destilada: 24,33 mL..... $H_2O$	<b>C</b>	

\* Mezclar en el siguiente orden para evitar la precipitación de los compuestos (A+B+C).  
Almacenar a temperatura ambiente y protegida de la luz.

**Figura 10.** Compuestos farmacológicos y protocolo para la preparación del agente anestésico "equitexina". \* Indica la secuencia de adición de los diferentes componentes para la obtención de la equitexina a fin de evitar la precipitación y facilitar su conservación.

La equitexina se administró intraperitonealmente (i.p.), empleando una dosis de 3-4 ml/kg. Transcurridos 5 minutos se administró Sulfato de Atropina (Braun Medical, SA) (0,005 ml/kg i.p.), para aliviar la congestión respiratoria de la anestesia general (Markou y Koob, 1993). Se constató que el animal alcanzara un grado de analgesia adecuado para realizar la intervención quirúrgica, mediante la evaluación de la ausencia de los reflejos flexor, pupilar y la respuesta ante la estimulación dolorosa en la porción más caudal de la cola (Waynfrth y Flecknell, 1992).

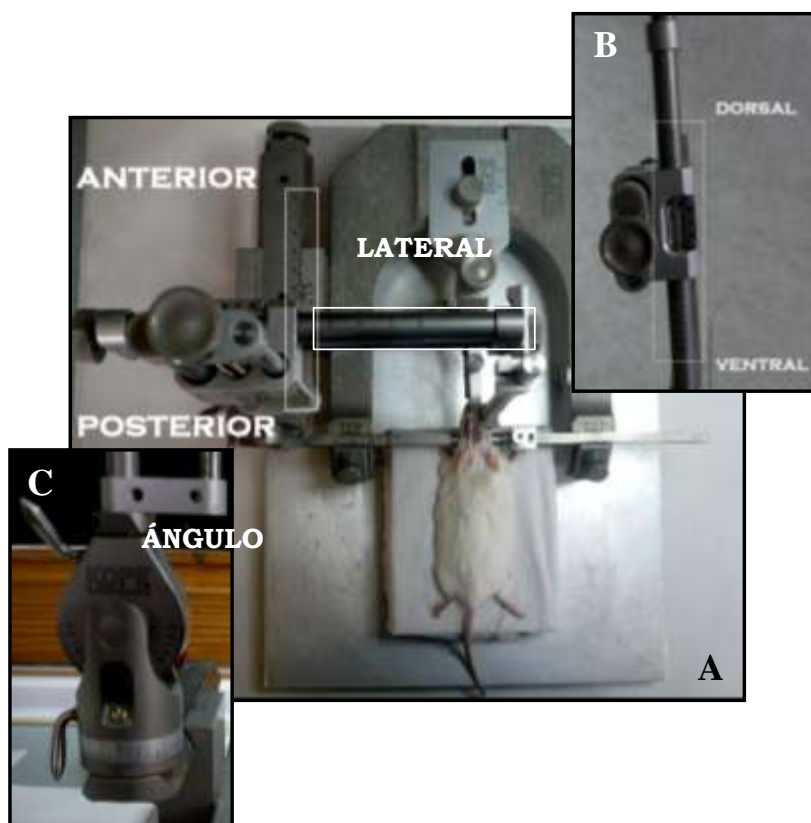
Una vez que el animal se encontraba en las condiciones óptimas, se colocó sobre el aparato estereotáxico fijando e inmovilizando la cabeza. Esta inmovilización se llevó a cabo mediante la fijación de los dientes incisivos y de los conductos auditivos al aparato estereotáxico (Figura 11). Seguidamente, se practicó una incisión longitudinal sobre la piel, quedando al descubierto el cráneo, retrayendo el periostio hasta visualizar el punto de confluencia del hueso frontal con los dos parietales. Este punto central de confluencia denominado Bregma, fue empleado como lugar de referencia para calcular estereotáxicamente la localización de la región supramamilar (Figura 11).



**Figura 11.** En esta secuencia de fotografías se muestra la colocación de los animales experimentales en el aparato estereotáxico (KOPF instruments. Model 900. California.USA) (A), fijación de la cabeza a través de los incisivos (B) e incisivos y meatos auditivos (C). D. Muestra la posición de bregma y lambda en la parte anterior y posterior respectivamente de la superficie del cráneo. E. Posicionamiento vertical del electrodo sobre bregma, para tomar las coordenadas estereotáxicas a fin de alcanzar la región supramamilar.

Como coordenadas estereotáxicas se emplearon las siguientes: 4.6 mm posterior a bregma (coordenada antero-posterior), a nivel de línea media y 8 mm de profundidad con respecto a la duramadre (coordenada dorso-ventral) (Paxinos y Watson, 1998). Estas coordenadas, se transfirieron al aparato estereotáxico para proceder con la lesión electrolítica de la región supramamilar (véase la Figura 11 donde se representa el modo de transferencia de las coordenadas al aparato estereotáxico).





**Figura 12.** En estas tres fotografías se indica sobre el aparato estereotáxico, el modo de situar las coordenadas estereotáxicas, con respecto a bregma y la duramadre, para realizar los tratamientos experimentales (lesión electrolítica e implantación de cánulas en la región supramamilar). A. Obtención de las coordenadas antero-posterior y lateral (ésta última sólo en los estudios de implantación de cánula). B. Obtención de la coordenada dorso-ventral a partir de la capa meníngea duramadre. C. Obtención del ángulo de penetración (sólo en los estudios de implantación de cánula).

Una vez situada la coordenada antero-posterior sobre la superficie del cráneo, se procedió con la trepanación del mismo con un perforador craneal y una broca de 1mm de diámetro, para acceder a la duramadre, romperla e introducir el electrodo, cuyo extremo no aislado tenía una longitud de 1mm, descendiendo 8 mm a partir de dicha capa meníngea. Una vez alcanzada la porción dorsal de la región supramamilar medial, se procedió con la emisión de corriente eléctrica positiva continua a través del electrodo. La intensidad y duración del paso de la corriente eléctrica a lo largo del electrodo, se seleccionaron empleando un generador de lesiones (GL-2 Cibertec). La intensidad empleada fue de 2 mA y una duración de 10 segundos, al cabo de los cuales, se bloqueó el paso de corriente eléctrica, retirándose el electrodo del interior del cerebro del animal (Figura 13). Finalmente, se procedió con la sutura de la piel, aplicación de un agente antiséptico dermatológico (Betadine. Asta-Médica. S.A.), para evitar posibles infecciones. Postoperatoriamente, se controló la temperatura corporal de los animales

empleando una fuente de calor externa. Una vez que el animal se encontraba parcialmente recuperado de la intervención quirúrgica, se depositó en una jaula individual sin comida durante las siguientes 24 horas, con el fin de eliminar posibles complicaciones postoperatorias. Asimismo, para paliar posibles efectos dolorosos durante el postoperatorio, se diluyeron 300 mg/kg de paracetamol en 500 ml del agua disponible para la ingesta. Transcurridos 11 días desde la intervención quirúrgica, los animales fueron empleados para realizar los estudios comportamentales. Los animales usados como grupo control (pseudolesionados), fueron sometidos a los mismos cuidados preoperatorios y postoperatorios que los animales pertenecientes al grupo experimental y se procedió con el mismo procedimiento quirúrgico pero sin administrar la descarga eléctrica.

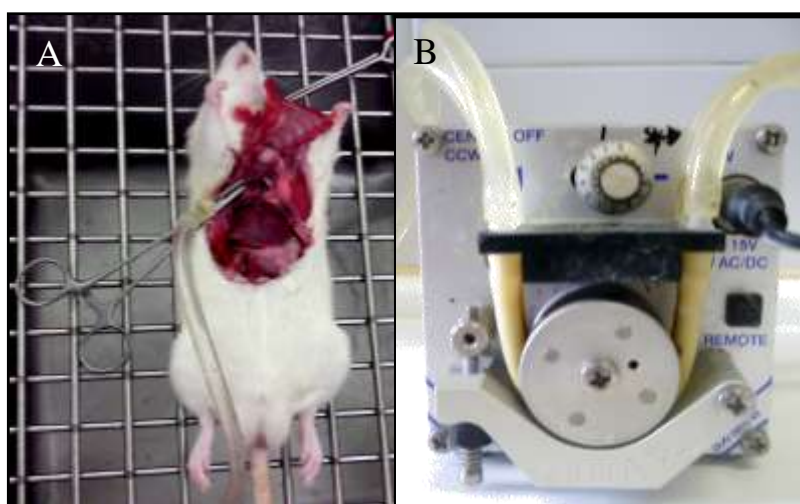


**Figura 13.** En esta secuencia de imágenes, se muestra el procedimiento seguido para la inducción de la lesión electrolítica en la porción dorsal de la región supramamilar. A. Generador de lesiones empleado (GL-2 Cibertec), en donde se puede apreciar una pantalla en donde figura el tiempo de emisión de la corriente eléctrica (10 sg) y otra pantalla en la que figurará en el momento de emisión de la descarga la intensidad (2mA). B. La imagen muestra una simulación de un animal con un electrodo al que se encuentra conectado un cable (rojo), transmisor de la corriente eléctrica positiva continua. El cable amarillo cierra el circuito eléctrico, actuando como electrolito, la región cerebral en contacto con el extremo no aislado del electrodo. De este modo, esta región será la que sufra la lesión electrolítica. C. Muestra la sutura de un animal que ha sufrido una lesión electrolítica.

#### D. Perfusión intracardíaca y procesamiento histológico del tejido cerebral.

Todos los animales empleados, fueron anestesiados con pentobarbital sódico (60 mg/kg i.p.) (SIGMA, Steinheim, Alemania) para proceder con la perfusión intracardíaca. Una vez que el animal se encontraba perfectamente anestesiado, sin mostrar reflejos ante la estimulación dolorosa, se practicó una incisión a nivel torácico, desde las paredes abdominales hasta el esternón, cortando posteriormente el diafragma

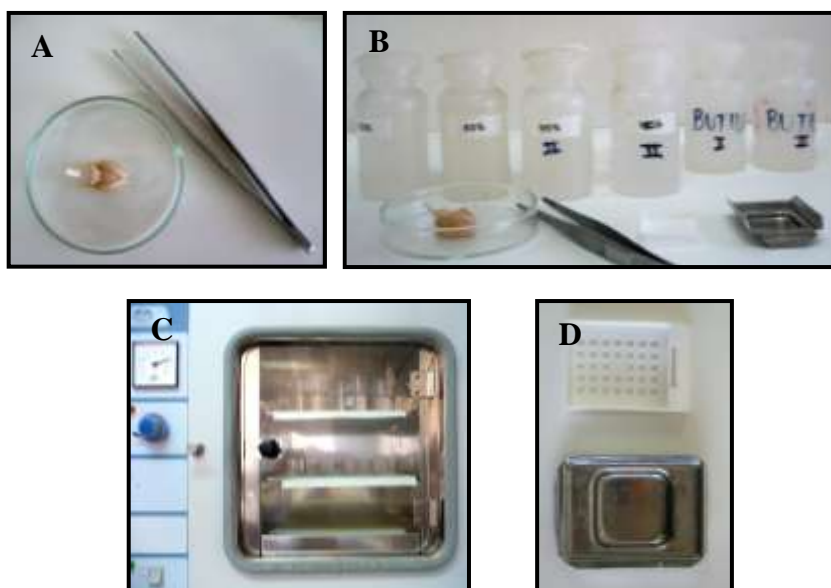
para poder localizar el corazón aún bombeante. Se inyectó en el ventrículo izquierdo heparina sódica (1,5 ml/kg; Rovi, SL, Vigo, España), cuya acción anticoagulante impide la formación de trombos, hecho que dificultaría la correcta fijación del tejido. A continuación, se practicó una incisión en el extremo externo del ventrículo izquierdo para introducir una cánula, que se desplazó por el interior de la cavidad ventricular hasta alcanzar la arteria aorta, lugar en el que se fijó gracias a la ayuda de una pinza kelly curva. Simultáneamente se practicó una incisión en la aurícula derecha, para permitir el vaciado sanguíneo del animal. A continuación se ponía en funcionamiento la bomba peristáltica (S2-MINI-Alitea AB, Suecia), a la que se hallaba conectada la cánula de perfusión. En un primer momento, se hizo pasar un total de 200 mL de tampón fosfato salino (PBS 0.1M, pH 7.4) y a continuación se sustituyó por 300 mL de solución fijadora (fomaldehído al 10% (Panreac Química SA, Barcelona, España)), tamponado en PBS 0.1M, pH 7.4. Una vez finalizada la fijación, se procedió con la decapitación del animal y la extracción del cerebro. El cerebro permaneció durante varios días en la misma solución fijadora empleada durante la perfusión vascular, favoreciéndose de este modo una perfecta fijación para su posterior tratamiento histológico.



**Figura 14.** A. Posición de un animal en cúbito supino, anestesiado y sometido a una perfusión intracardíaca, con una cánula de perfusión situada en el ventrículo izquierdo del animal y la aurícula derecha seccionada. B. Bomba peristáltica empleada para la perfusión intracardíaca de la solución lavadora y posteriormente de la fijadora.

Una vez transcurridas al menos dos semanas de post-fijación, se continuó con la preparación del tejido para su posterior visualización. Brevemente, se obtuvo un bloque de tejido en el que se encontraba la región supramamilar del hipotálamo para continuar con la deshidratación e inclusión del mismo. El bloque de tejido cerebral obtenido, se

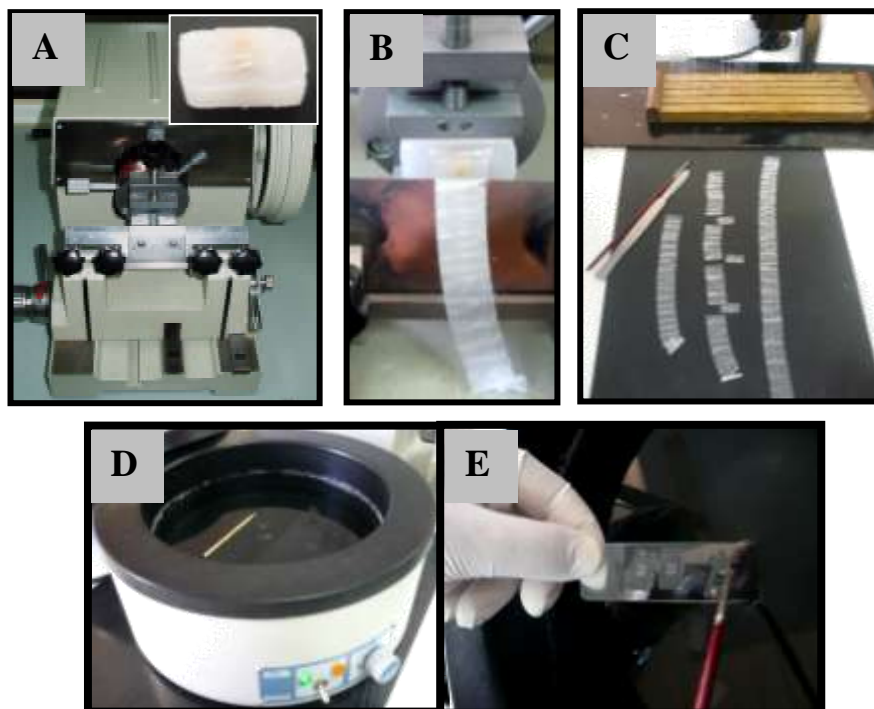
deshidrató mediante la inmersión en una cadena de alcoholes de concentración creciente (70°, 80°, 96° (2 veces), 100° (2 veces), introduciéndose por último en un líquido intermediario, acetato de butilo (2 veces), que es miscible tanto con el alcohol como con el medio de inclusión posterior, la parafina. A continuación, el tejido se introdujo en parafina líquida (Panreac Química, SA, Barcelona, España) durante unas 24 horas (manteniéndose líquida en estufa a 60°C). Al cabo de este tiempo, se procedió con la inclusión del tejido cerebral en parafina, para lo que se colocó el bloque de tejido en placas leukar y se cubrió con parafina líquida. El tejido permaneció en estos moldes unas 24 horas, hasta que se solidificó la parafina, obteniéndose un bloque compacto (Figura 15).



**Figura 15.** Las imágenes muestran la secuencia de pasos necesarios para la inclusión del tejido cerebral en parafina. A. Fotografía mostrando un cerebro de rata para proceder con su deshidratación. B. Cadena de alcoholes y líquido intermedio alcohol-parafina (acetato de butilo) empleados para la deshidratación del tejido y su inclusión en parafina. C. Estufa empleada para realizar la inmersión del tejido en parafina líquida. D. Moldes (placas leukar) empleados para la inclusión de los bloques que contienen el tejido cerebral.

Para el estudio histológico es imprescindible el seccionado previo de la región de interés. Con este fin, se recurrió al uso de un microtomo de rotación (Nahita, SA., Berain, España), instrumento que permite la obtención de secciones con el grosor adecuado para su posterior tinción y observación al microscopio. La seriación del bloque de tejido que contenía la región supramamilar, se realizó obteniendo una sección de cada 5 con un grosor de 10 micrómetros. Las secciones obtenidas con ayuda del microtomo, se estiraban mediante su inmersión en un baño de agua termostatzado

(aprox. 36 °C) y se montaban sobre portaobjetos. Las secciones así obtenidas, se mantuvieron en una estufa a 37° C para su secado, estirado y perfecta adherencia al portaobjetos (Figura 16).



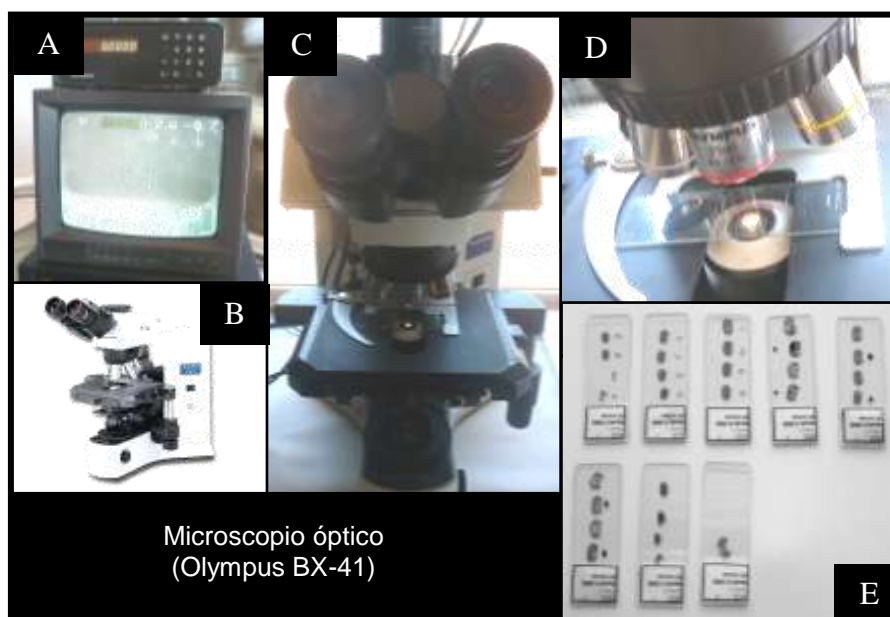
**Figura 16.** En esta serie de fotografías se muestran los pasos y aparatos principales para la seriación del tejido cerebral. A. Microtomo empleado para obtener las secciones del tejido (Nahita SA., Berain, España). B. Obtención de una serie de secciones de tejido cerebral incluido en parafina, mediante el uso del microtomo. C. Series de secciones de las que se seleccionarán los cortes que posteriormente serán empleados para teñir y observar al microscopio óptico. D. Baño termostático (Selecta. Barcelona. España) en el que se pueden apreciar un grupo de secciones en su interior. Este tratamiento permite que se estire el tejido y se libere parcialmente de la parafina que lo rodea. E. Colocación de las secciones procedentes del baño termostático en un portaobjetos para su organización y posterior tinción.

Una vez que las secciones histológicas se encontraban perfectamente adheridas al portaobjetos, se procedió a su tinción empleando como colorante el azul de toluidina. La preparación de la solución de trabajo con este colorante se realizó del siguiente modo:

- Azul de toluidina ((C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>Cl<sub>3</sub>S)ZnCl<sub>2</sub>) (Panreac SA, Barcelona)..... 0,5 gr
- Borato de sodio (Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O) (Panreac SA, Barcelona ..... 0,5 gr
- Agua destilada ..... 100 ml

El procedimiento seguido para la tinción de las secciones histológicas se realizó del siguiente modo: 1. Desparafinado mediante inmersión de las secciones en un solvente orgánico, Xileno ( $C_8H_{10}$ , Panreac Química, S.A., Barcelona, España). 2. Hidratación mediante empleo de una cadena de alcoholes con concentración decreciente (5 minutos en cada alcohol): 100°, 96°, 80°, 70° y agua destilada ( $H_2O$ ). 3. Tinción mediante inmersión en azul de toluidina (30-60 sg). 4. Lavado en agua corriente. 5. Deshidratación mediante el uso de una cadena de alcoholes con concentración creciente (70°, 80°, 96°, 100°). 6. Inmersión en xileno. 7. Montaje y protección de las secciones con cubreobjetos haciendo uso de DPX (Panreac S.A., Barcelona, España) como medio adhesivo.

Concluido este proceso, las secciones fueron examinadas mediante un microscopio óptico (Olympus. BX-41) para evaluar la posición y extensión de la lesión electrolítica en la región supramamilar. Esta evaluación se llevo a cabo mediante el muestreo de todas las secciones obtenidas por animal (se comenzó visualizando las secciones más caudales, finalizando con el examen de las secciones más rostrales). El criterio que se utilizó para confirmar la presencia de lesión electrolítica fue la presencia de una vacuola y la gliosis reactiva circundante que aparecen como resultado de una lesión electrolítica (Figura 17). Se emplearon solamente aquellos animales cuya lesión se encontraba circunscrita a la región supramamilar y no presentaban daño observable de ninguno de los núcleos del complejo mamilar (Figura 17).



**Figura 17.** La secuencia de fotografías muestra el microscopio (Olympus BX-41) empleado para la observación y estudio de las secciones histológicas una vez teñidas. A. Monitor conectado al microscopio

que facilita la observación del tejido por varios observadores. B y C. Diferentes vistas del microscopio empleado. D. Localización de la sección en la pletina del microscopio para su observación. E. Grupo de secciones teñidas, etiquetadas y dispuestas para su observación mediante el microscopio óptico.

### **E. Diseño experimental y análisis de datos.**

Se utilizó un diseño factorial mixto 2 x 2 x 4, donde la variable entre-sujetos fue el grupo, con dos niveles: grupo lesionado y grupo pseudolesionado. Una primera variable intra-sujetos, fue el momento del registro del entrenamiento con dos niveles: entrenamiento espacial antes de la intervención quirúrgica y entrenamiento espacial después de la intervención quirúrgica. La segunda variable intra-sujetos, fueron los días de entrenamiento, con cuatro niveles: día 1, día 2, día 3, día 4.

Las variables dependientes registradas fueron: el “*número de errores*” (número de recipientes visitados hasta localizar el que contenía el reforzador) y el “*tiempo de búsqueda*” (tiempo transcurrido desde que el animal se situaba en el lugar de salida del laberinto espacial hasta su llegada al recipiente donde se encontraba el reforzador).

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo mediante la aplicación de un ANOVA de medidas repetidas independiente para cada una de las variables registradas. Antes de proceder con el análisis estadístico, se comprobaron los supuestos para la aplicación del ANOVA. En aquellos casos en que se incumplió el supuesto de esfericidad ( $W$  de Mauchly  $\leq 0.05$ ), se hizo uso del ajuste de los grados de libertad mediante la epsilon de Greenhouse-Geisser. En aquellos casos en que las medidas repetidas fueron estadísticamente significativas ( $F \leq 0.05$ ), se estudió la variabilidad explicada por la tendencia lineal.

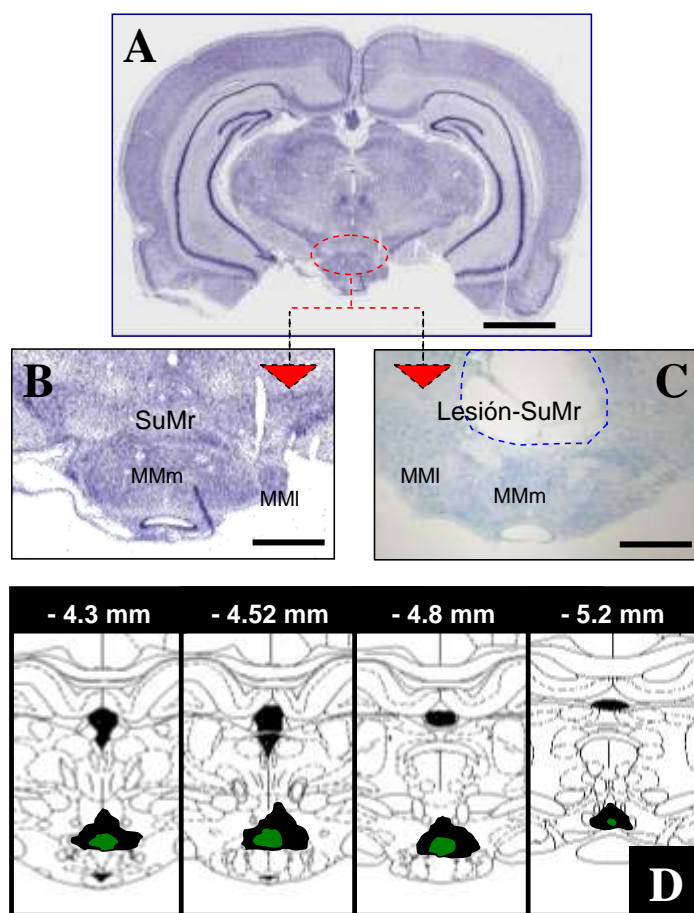
Todos los análisis estadísticos se realizaron usando el programa STATISTICA 7.0 para Windows (StatSoft, Inc).

## **3. RESULTADOS.**

### **A. Resultados histológicos.**

Mediante el estudio de las secciones histológicas, se excluyeron 6 de los animales que recibieron la lesión electrolítica ya que ésta se encontraba muy lateralizada, encontrándose ésta restringida a una pequeña porción lateral de la SuMr. Un total de 18 ratas (9 lesionadas y 9 pseudolesionadas) se emplearon para su posterior análisis comportamental. El estudio de la localización y extensión de la lesión electrolítica indicó que en las 9 ratas seleccionadas, la lesión no había dañado los

cuerpos mamilares (núcleos lateral y medial) ni el tracto mamilotalámico (mt) (Figura 18). En todos los animales la lesión había dañado la región supramamilar y en diferente grado, región que se localiza inmediatamente encima de la región supramamilar (SuMr). En 8 de los 9 animales, se observó la alteración de la porción más ventral del hipotálamo posterior, junto con una pequeña lesión de la porción lateral del área tegmental ventral (ATV) en 2 animales y de la porción ventral del área hipotalámica lateral (LH) en otros 2 animales. Asimismo, se evidenció que el tracto mamilotegmental (Mtg) se encontraba unilateralmente lesionado en 5 animales y bilateralmente en otras 2 ratas. En una de las 9 ratas lesionadas, la lesión se restringió al núcleo supramamilar medial (SuMm) junto con una pequeña alteración de la región localizada dorsalmente al SuMm. Esta lesión altamente restringida al SuMm, probablemente fue el resultado del desgaste del extremo no aislado del electrodo. En la figura 18 se presenta de forma esquemática la extensión máxima y mínima de las lesiones de la SuMr descritas.



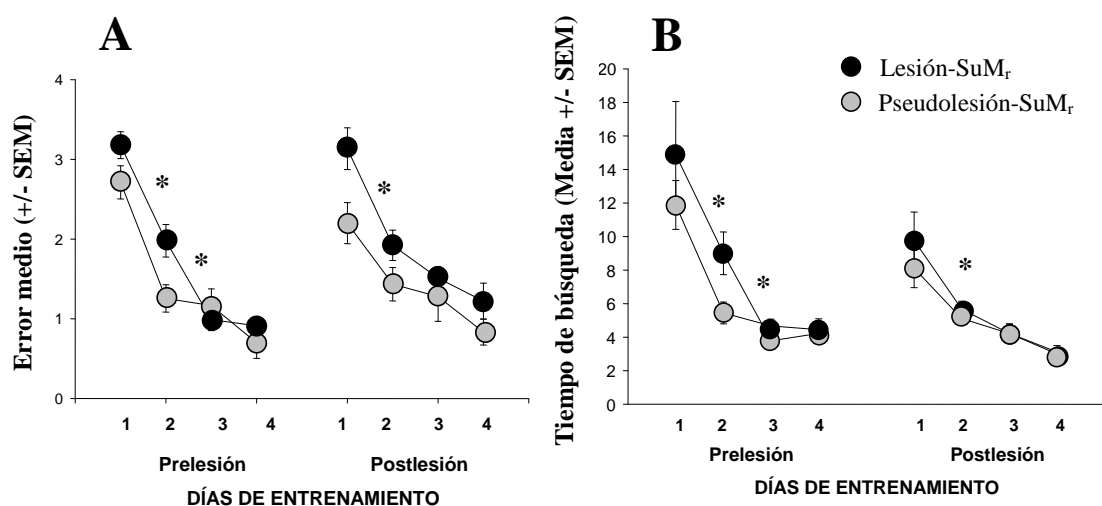
**Figura 18.** La secuencia de imágenes indica la localización de la región supramamilar (SuMr) del hipotálamo de la rata, región empleada para efectuar la lesión electrolítica. A. Sección coronal de cerebro de rata a nivel de la región más caudal de hipotálamo. En la porción ventromedial de la sección, se muestra la ubicación de SuMr (preparación histológica teñida con violeta de cresilo). B. Región ventro-medial del hipotálamo posterior, en donde puede observarse la localización de la región SuM, y



los dos núcleos principales de los cuerpos mamilares (MMm: núcleo mamilar medial; MMI: núcleo mamilar lateral). C. Microfotografía de la región ventro-medial del hipotálamo de una rata en la que se observa la presencia de la lesión electrolítica de la SuMr. Preparación histológica teñida con azul de toluidina. D. Esquema de la región ventromedial del hipotálamo posterior, seriada en dirección rostro-caudal con respecto a bregma (4.33, 4.52, 4,8 y 5.2 mm posterior a bregma). En la parte inferior, se representa la extensión máxima (negro) y mínima (verde) observada en SuMr en los animales experimentales (n = 9). Escala: A: 1500  $\mu$ m, B y C: 500  $\mu$ m.

## B. Resultados comportamentales.

Los análisis estadísticos realizados no mostraron diferencias entre los grupos ni en el número medio de errores ( $F_{(1,16)} = 3.93$ ;  $p \geq 0.065$ ) ni en el tiempo medio de búsqueda ( $F_{(1,16)} = 1.72$ ;  $p \geq 0.208$ ). Los animales pertenecientes a ambos grupos, redujeron el número medio de errores ( $F_{(1,22,19,55)} = 140.3$ ;  $p \leq 0.001$ ) así como el tiempo medio empleado para localizar el reforzador ( $F_{(1,22,19,55)} = 41.38$ ;  $p \leq 0.001$ ) a medida que progresaba el entrenamiento en la tarea de memoria de referencia espacial, tanto pre-operatoriamente como post-operatoriamente. Por último, se observó que el tiempo medio empleado por los animales de ambos grupos para encontrar el reforzador fue menor durante el entrenamiento post-operatorio que durante el entrenamiento pre-operatorio ( $F_{(1,16)} = 13.122$ ;  $p \leq 0.05$ ).



**Figura 19.** Representación gráfica de los estudios comportamentales en la tarea de memoria de referencia espacial realizados en el laberinto en tierra (estudio de la variable dependiente “número de errores” y “tiempo de búsqueda”). A. Representación gráfica del “número de errores” donde se observó una reducción en el registro medio de errores a lo largo de los días de entrenamiento tanto pre como post-operatorio, la lesión electrolítica en la región del supramamilar (SuMr) no afecta al aprendizaje espacial con demandas de memoria de referencia. B. Representación gráfica del “tiempo de búsqueda”, donde se observó una disminución en el tiempo medio empleado por los animales para realizar la tarea a lo largo de los días del entrenamiento tanto pre como post-operatorio. El conocimiento del proceso de la tarea y el entrenamiento preoperatorio aumentaron la velocidad de los animales para resolver la tarea como puede ser observado en los registros post-operatorios.

### **EXPERIMENTO 3: EFECTOS DE LA MICROINYECCIÓN DE TETRADOTOXINA EN LA REGIÓN SUPRAMAMILAR EN UNA TAREA DE MEMORIA DE REFERENCIA ESPACIAL.**

#### **1. INTRODUCCIÓN.**

Este tercer experimento, al igual que el anterior, se diseñó para estudiar si la región supramamilar del hipotálamo es importante en la memoria espacial con demandas de memoria de referencia. No obstante, a diferencia del otro experimento de este capítulo, el uso de un agente farmacológico como la TTX, que bloquea temporalmente los canales de  $\text{Na}^{2+}$  y evita así la despolarización y la activación neuronal, nos permitió estudiar en un mismo animal su ejecución en condiciones normales y en condiciones de inactivación funcional de la región supramamilar. Además, debido a que la TTX presenta una acción temporal limitada (ha perdido por completo su efecto a las 24 horas (Tobias y cols, 2001; Cimadevilla y cols, 2005)) nos facilitó estudiar en mayor detalle la participación de la región supramamilar en la fase de adquisición, consolidación y recuperación de la memoria espacial.

#### **2. MATERIAL Y MÉTODOS.**

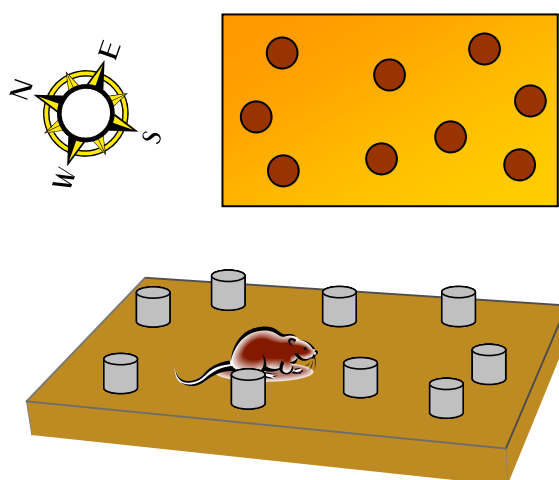
##### **A. Animales.**

Para el desarrollo de este estudio, se emplearon un total de 19 ratas macho Sprague-Dawley (CRIFFA, Barcelona, España). Los pesos iniciales de los animales fueron de 250-320 grs. Las condiciones de estabulación y mantenimiento fueron las mismas que las descritas previamente para el experimento 1 (véase apartado 2 (A), página 36 de esta tesis doctoral).

##### **B. Aparatos.**

El entrenamiento de las ratas en la tarea de memoria espacial se realizó en un laberinto similar al empleado en los experimentos 1 y 2, pero al que se le incorporaron algunas variaciones, con un aumento del número de lugares reforzados y las dimensiones del laberinto. Estas variaciones en el laberinto se realizaron para aumentar el grado de sensibilidad de la prueba para detectar alteraciones en las pruebas comportamentales. El laberinto consistía en una tabla de madera, de forma rectangular (180 cm de largo x 120 cm de ancho) y se encontraba 70 cm elevado sobre el suelo.

Sobre la superficie del laberinto se dispusieron 9 recipientes de igual tamaño, forma y color (9 cm x 9 cm) que contenían arena y sobre los que se dispensó el reforzador (pequeñas piezas de galleta). Se seleccionaron 8 lugares, localizados en el margen externo del laberinto, desde los que se liberaron a los animales para proceder con la tarea comportamental. La sala experimental se encontraba iluminada con una lámpara de 60 vatios de potencia que se localizaba encima del laberinto, anclada en el techo a una altura de 2 metros y medio. La temperatura ambiental se mantuvo constante en  $22 \pm 2$  °C y las mediciones conductuales se realizaron entre las 18:00 y 20:00 horas.



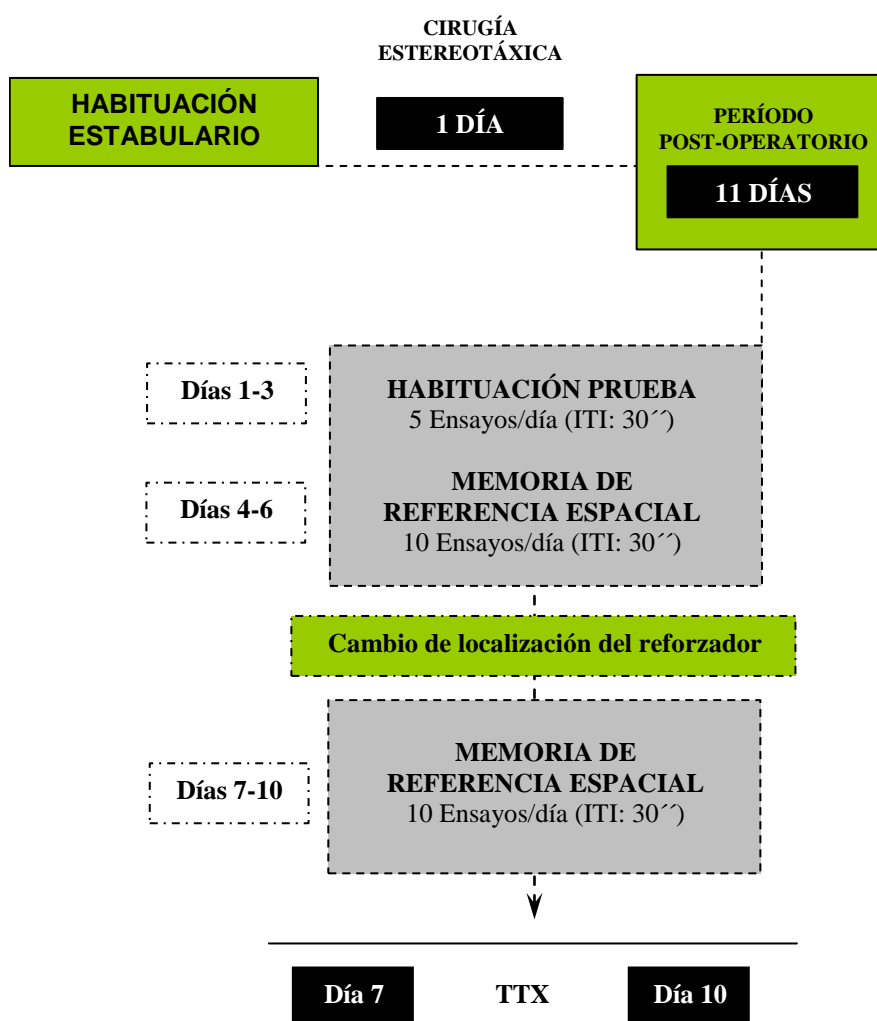
**Figura 20.** Diagrama que muestra el laberinto empleado para el entrenamiento de las ratas en las tareas de memoria durante los experimentos con microinyecciones de TTX. Nótese que el número de lugares con posibilidad de ser reforzados ha aumentado de 7 a 9, al igual que las dimensiones del mismo (150 cm x 75 cm vs 180 cm x 120 cm) con respecto a los estudios basados en la inducción de lesiones electrolíticas.

### C. Procedimiento comportamental: memoria de referencia espacial.

Durante los cuatro días previos al entrenamiento de los animales en la tarea de aprendizaje espacial, todos los animales fueron habituados al laberinto y a las condiciones estimulatorias de la sala experimental (Figura 21). En el primer día, los animales tuvieron que explorar libremente el laberinto durante 5 minutos, en ausencia del reforzador. Durante los tres días siguientes, el experimentador rellenaba todos los recipientes con el reforzador y a continuación, los animales tenían que obtener el reforzador del interior de los recipientes. Se administraron 5 ensayos por día con una duración de 5 minutos cada ensayo y un intervalo entre los ensayos de 30 segundos. Los animales permanecieron en el laberinto hasta que obtenían los 9 reforzadores o pasaban un tiempo máximo en el laberinto de 5 minutos.

Una vez que finalizaba la fase de habituación y durante los días siguientes tres días (días 4-6), todos los animales fueron entrenados en una tarea de aprendizaje espacial con demandas de memoria de referencia (Figura 21). El protocolo de entrenamiento empleado consistió en la administración de 10 ensayos cada día, con un intervalo entre los ensayos de 30 segundos. La posición de salida de los animales se aleatorizó entre una de las 8 posiciones posibles localizadas en el margen externo del laberinto (Figura 20). Durante estos tres días y en todos los ensayos, el reforzador se localizaba sólo en uno de los recipientes, de tal modo que los animales tenían que aprender la ubicación del reforzador en uno de los 9 recipientes. Una vez que el animal encontraba el reforzador y lo ingería, éste se depositaba en su jaula donde permanecía durante 30 segundos hasta que el experimentador la introducía de nuevo en el laberinto desde una posición diferente, para proceder con el siguiente ensayo. El cuarto día de entrenamiento en esta tarea, el experimentador cambiaba la posición del reforzador y los animales tenían que aprender a localizarlo en su nueva ubicación. En el desarrollo de este entrenamiento se empleó el mismo protocolo seguido durante los tres primeros días y se extendió a lo largo de cuatro días (días 7-10) (figura 21). Al inicio del primer día, los animales fueron divididos en dos grupos diferentes, y los días 7 y 10 uno de los grupos recibió una microinyección única de TTX en la SuMr ( $n = 10$ ) y el otro grupo una microinyección en la misma región de solución salina (SAL) ( $n = 9$ ). Las microinyecciones se administraron 30 minutos antes del entrenamiento espacial en todos los animales. En los días 8 y 9 las ratas fueron entrenadas en la tarea espacial sin recibir ninguna microinyección en la SuMr (Figura 21). Las microinyecciones que se administraron los días 7 y 10 nos permitieron estudiar el papel de la SuMr en la adquisición y recuperación de aprendizaje espacial respectivamente. Además, la ausencia de microinyecciones durante los días 8 y 9 nos permitió estudiar el papel de la SuMr en la consolidación del aprendizaje espacial, ya que el efecto de las microinyecciones de TTX dura al menos 90 minutos (Tobias y cols, 2001; Cimadevilla y cols, 2005), ésta puede afectar tanto a la fase de adquisición como a la fase consolidación. En ausencia del déficit de adquisición, esta primera microinyección nos permitirá estudiar el efecto de la misma sobre la fase de consolidación. Durante la fase de entrenamiento en la tarea espacial se registraron el número de errores así como el tiempo empleado en localizar el reforzador (tiempo de búsqueda). El número de errores constituye una buena medida del grado de aprendizaje espacial (Vann y Aggleton, 2003) y el tiempo dedicado por los animales a la búsqueda del reforzador se relaciona

positivamente con el número de errores cometidos por los animales, constituyendo una medida concurrente con los errores cometidos para evaluar el grado de aprendizaje espacial. No obstante, es conveniente mencionar que esta variable se ve afectada cuando las intervenciones cerebrales provocan alteraciones locomotoras (Beracochea y Krazem, 1991), lo cual nos permitirá determinar hasta que punto un déficit observado en la tarea de memoria se puede explicar por la alteración de una función cognitiva o es el resultado de una alteración motora.

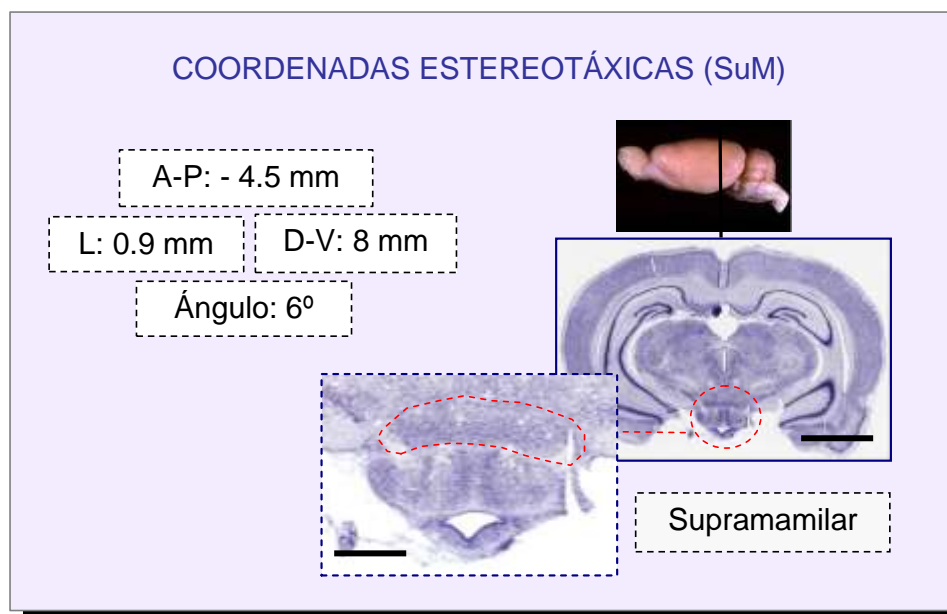


**Figura 21.** Representación esquemática del diseño experimental usado en nuestro estudio, mostrando los días en los que se desarrolló la tarea de memoria de referencia espacial. Durante el periodo pre-conductual y después de 10 días de habituación en el laboratorio, todos los animales se operaron estereotáxicamente y se mantuvieron 11 días de postoperatorio. El entrenamiento conductual comenzó con la habituación de las ratas a la habitación conductual y al laberinto durante 3 días. Tras la habituación, comenzó el experimento de memoria de referencia espacial, el entrenamiento duró 3 días (4-6 días) hasta que los roedores aprendieron la regla de memoria de referencia. En el entrenamiento con microinyecciones se cambió el lugar de la recompensa, aunque el contexto fue familiar. Después de este periodo de entrenamiento, a los animales se les aplicaron microinyecciones con tetratoxina (TTX) ( $n=10$ ) o solución salina (SAL) ( $n=9$ ) en el entrenamiento los días 7 y 10. Las microinyecciones estos dos

días se realizaron para estudiar la implicación de la SuMr en la adquisición y consolidación (día 7) y la recuperación (día 10) de memoria espacial en esta tarea con demandas de memoria de referencia.

#### **D. Cirugía estereotáxica: Microinyección intracerebral de TTX en la SuMr.**

Las ratas fueron sometidas a la cirugía estereotáxica después de permanecer al menos 10 días en nuestro estabulario. Antes de iniciarse el procedimiento quirúrgico los animales fueron anestesiados con equitexina (3.5 ml/kg i.p.) y transcurridos 5 minutos se les administró sulfato de atropina (Braun Medical, SA) (0.05 ml/kg. i.p.), para aliviar la congestión respiratoria de la anestesia general (Markou y Koob, 1993). Una vez constatado el nivel analgésico alcanzado por el animal, éste se colocó sobre el aparato estereotáxico, fijando e inmovilizando la cabeza mediante la fijación de los dientes incisivos y de los conductos auditivos al aparato estereotáxico. Seguidamente, se practicó una incisión longitudinal visualizando el punto bregma en la porción anterior de la superficie del cráneo que se empleará para transferir la coordenadas estereotáxicas y acceder a la SuMr (Figura 22). Una vez se identificó sobre el cráneo la coordenada antero-posterior y la lateral (4.5 mm posterior a bregma y 0.9 mm lateral a la línea media respectivamente) se perforó el cráneo con una broca de 1 mm de diámetro para dejar visible la duramadre. Tomando como referencia la duramadre, una cánula guía (0.5 mm de diámetro externo y 20 mm de largo) anclada al aparato estereotáxico, se introdujo en el cerebro con una inclinación de 6° sobre la línea vertical y una profundidad de 8 mm, alcanzando de este modo la porción inmediatamente superior a la SuMr y fijándose ésta 1 mm por encima del límite dorsal de esta región. Nótese que el cambio de coordenadas para acceder a la SuMr con respecto al experimento anterior se debe a un intento de mejorar la recuperación postoperatoria de los animales, controlando posible alteración del seno sagital superior que se produce mediante un acceso más medial al cerebro.

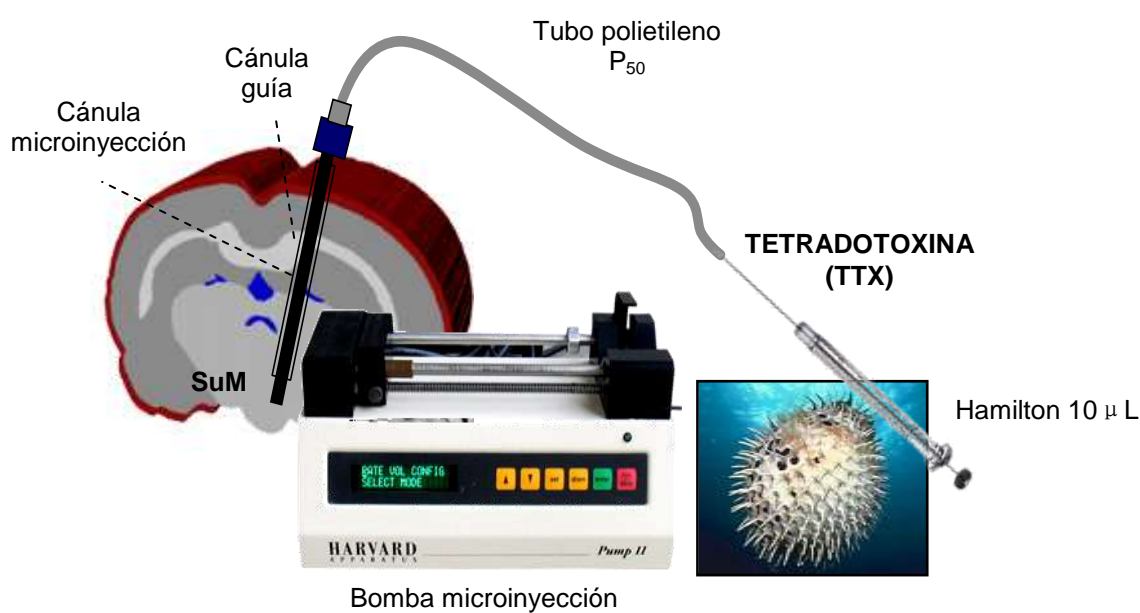


**Figura 22.** Secuencia de imágenes que indica la localización de la región supramamilar (SuMr) del hipotálamo. La imagen superior muestra una fotografía de una vista lateral del cerebro de rata, y la línea transversal al eje antero-posterior indica la localización de SuMr, región que se observa en la sección coronal mostrada a continuación así como en la ampliación de la región ventro-caudal del hipotálamo que se presenta a continuación. Preparación histológica teñida con violeta de cresilo. En el margen izquierdo figuran las coordenadas estereotáxicas empleadas para acceder a la SuMr. Las coordenadas estereotáxicas fueron tomadas del atlas estereotáxico de Paxinos y Watson (1998). Escala: imagen superior (500  $\mu\text{m}$ ), imagen inferior (1500  $\mu\text{m}$ ).

A continuación, se insertaron dos tornillos en la superficie del cráneo y se añadió cemento dental para asegurar el anclaje y la fijación de las cánulas al cráneo del animal. La cánula guía se cerró para su protección con un estilete de la misma longitud de la cánula guía y que se ajustaba perfectamente a ésta, evitando que la cánula se cerrara durante el postoperatorio. Por último, las cánulas fueron protegidas mediante la fijación alrededor de la misma de un tubo de plástico, que evitará que las ratas puedan dañar o quitar la cánula. Una vez concluido este procedimiento, se procedió con la sutura y los animales fueron depositados en su jaula para iniciar el periodo postoperatorio de 11 días. Durante los tres primeros días del postoperatorio se les administró paracetamol (300 mg/kg) (Upsamedica, SL), diluido en el agua que se les proporcionaba para la ingesta.

Antes de proceder con las microinyecciones, se retiraba el estilete, se limpiaba la cánula y se insertaba una cánula de microinyección (30 G), que se ajustaba perfectamente a la cánula guía y sobresalía 1 mm por debajo de ésta. La cánula de microinyección se encontraba conectada mediante un tubo de polietileno (P<sub>50</sub>) a una

jeringuilla Hamilton de 10  $\mu$ l. El flujo de la jeringuilla se reguló mediante una bomba de microinyección (Harvard Apparatus. Boston. USA), administrándose tetradotoxina (TTX,  $C_{11}H_{17}N_3O_8$ , Sigma, ST. Louis) (5 ng de TTX diluida en 0.5  $\mu$ l de solución salina (NaCl 0.9%) o 0.5  $\mu$ l de la solución salina durante 2 minutos. La aguja de microinyección se retiró lentamente del interior del cerebro de los animales 1 minuto después de la administración, evitando el reflujo de la solución con una retirada inmediata de la misma. La TTX es un potente bloqueador de los canales de sodio (Narahashi, 1972) y cuyo efecto se revierte completamente 24 horas después de la administración (Rothfeld y cols, 1986; Zhuravin y Bures, 1991). El empleo de la TTX tiene la desventaja de que los efectos observados pueden ser debidos a la afectación directa de las células o de las fibras de paso, no obstante también presenta como ventaja la posibilidad de inactivar una región durante un momento concreto y asociarse a un proceso mnésico particular (adquisición, consolidación y recuperación). Además, el uso de este agente farmacológico permite estudiar el comportamiento del mismo animal en condiciones de inactivación así como en condiciones normales.



**Figura 23.** Representación del proceso de microinyección de tetradotoxina (TTX) en la región supramamilar (SuMr) del hipotálamo. Se muestra la bomba de inyección empleada (Harvard apparatus. Boston. USA) así como la microjeringuilla tipo hamilton (10 $\mu$ L) empleada. La parte final de la microjeringuilla se encontraba conectada con un tubo de polietileno (P<sub>50</sub>) a través del que se administraba la solución de TTX (5ng en 0.5 $\mu$ L de solución salina) con una tasa de administración de 0.25 $\mu$ L/min.. En el dibujo superior se representa una sección del cerebro de rata a nivel de la SuMr, en donde se puede observar la cánula guía, implantada mediante cirugía estereotáxica, y la cánula de inyección, que sobresale 1mm del extremo final de la cánula guía, permitiendo así el acceso a la porción dorsal de la SuMr.



### **E. Perfusión intracardíaca y procesamiento histológico del tejido cerebral.**

El procedimiento empleado para la perfusión intracardíaca de los animales y la obtención de secciones histológicas fue el mismo que el empleado durante el experimento 2 (apartado 2° (D), página 54 de esta tesis doctoral). En este estudio, las preparaciones histológicas resultantes se emplearon para confirmar o descartar la correcta localización de la cánula en la SuMr.

La localización de las cánulas en cada uno de los animales se realizó mediante la visualización de las secciones histológicas en un microscopio óptico, y con la ayuda del atlas estereotáxico de Paxinos y Watson (1998). Todos los animales en los que la posición de la cánula se encontraba alejada más de 0,5 mm del SuM se excluyeron del análisis estadístico.

### **F. Diseño experimental y análisis de datos.**

Para el estudio comportamental antes de la microinyección se utilizó un diseño factorial mixto 2 x 4, donde la variable entresujetos fue el grupo (dos niveles: grupo con microinyecciones de tetratoxina (TTX) y grupo con microinyecciones de solución salina (SAL), y una variable intrasujetos con tres niveles (tres días de entrenamiento). Para el estudio comportamental relacionado con las microinyecciones se aplicó el mismo diseño, pero en este caso la variable intrasujeto disponía de cuatro niveles (cuatro días de entrenamiento).

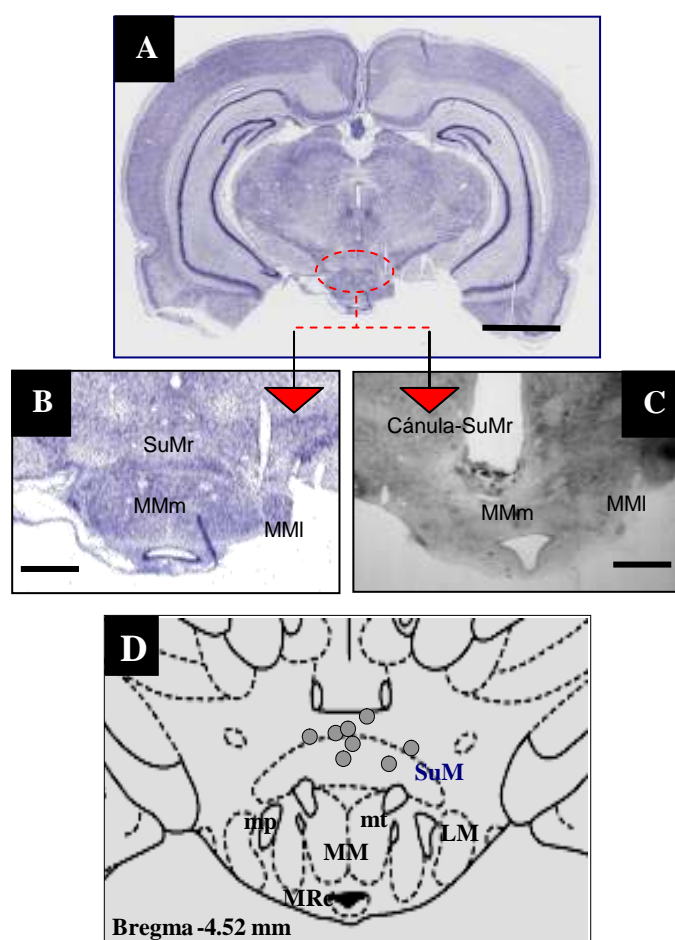
Las variables dependientes registradas fueron: “*el número de errores*” (número de recipientes visitados hasta localizar el que contiene el reforzador) y el “*tiempo de búsqueda*” (tiempo transcurrido desde que el animal se situaba en el lugar de salida hasta su llegada al recipiente donde se encontraba el reforzador). El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo mediante la aplicación de ANOVA de medidas repetidas tanto en el estudio de la variable “*número de errores*” como en la variable “*tiempo de búsqueda*”. Cuando fue necesario se hizo uso del ajuste de los grados de libertad mediante la epsilon de Greenhouse-Geisser. Cuando el ANOVA indicaba que había diferencias estadísticamente significativas, se aplicaron comparaciones *a posteriori* (diferencia mínimamente significativa de Fisher (LSD)).

Todos los análisis estadísticos se realizaron usando el programa para tratamiento de datos STATISTICA 7.0 para Windows (StatSoft, Inc).

### 3. RESULTADOS

#### A. Resultados histológicos.

Una vez realizados los estudios histológicos de cada uno de los animales, se descartaron 2 ratas para su posterior análisis conductual ya que la cánula de microinyección se encontraba alejada del SuM más de 0.5 mm. En la figura 24 C se presenta una microfotografía en donde se puede reconocer la posición de la cánula y en la figura 24 D, se puede observar la posición del extremo final de la cánula en la SuMr.

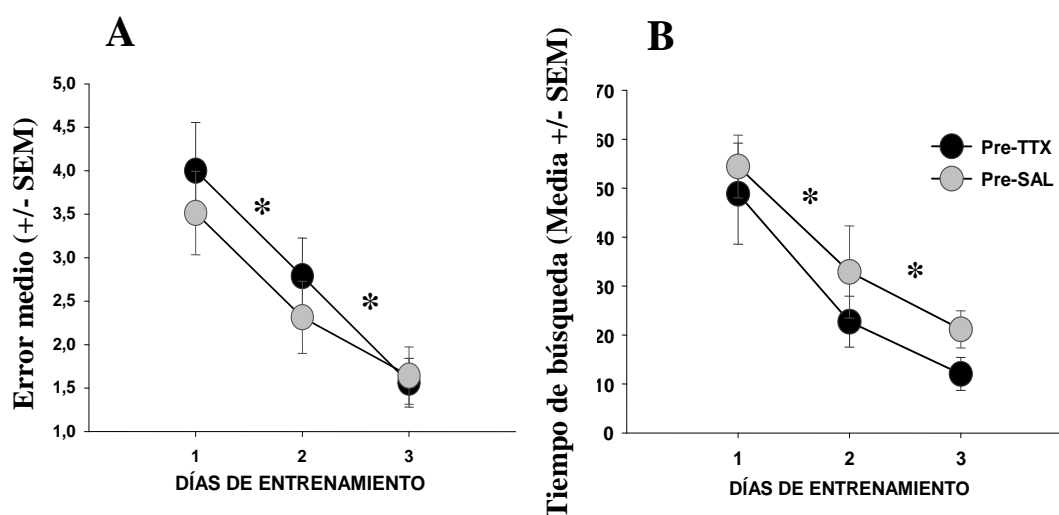


**Figura 24.** (A) Microfotografía de una sección coronal a nivel del hipotálamo posterior de rata, donde se muestra la localización de la región supramamilar (SuMr). Preparación histológica teñida con violeta de cresilo. B. Ampliación de la microfotografía A, en donde se aprecia la ubicación de la SuMr así como de los núcleos mamilar medial (MMm) y núcleo mamilar lateral (MMl). C. Microfotografía que muestra la localización de la cánula de la SuMr en un animal experimental. Preparación histológica teñida con azul de toluidina. D. Representación gráfica de la localización de las cánulas de inyección en los animales sometidos a microinyección con TTX (gris). Imagen adaptada de Paxinos y Watson (1998). LM: núcleo mamilar lateral; MM: núcleo mamilar medial; MRe: receso del 3<sup>er</sup> ventrículo; SuM: núcleo supramamilar; mt: tracto mamilotalámico; mp: pedúnculo mamilar. Escalas: A: 1500  $\mu$ m, B y C: 500  $\mu$ m.

## B. Resultados comportamentales.

El número total de animales empleado para el análisis estadístico fue de 17, donde 8 animales recibieron microinyecciones de TTX y otros 9 animales recibieron microinyecciones de solución salina.

El análisis global durante el entrenamiento antes de las microinyecciones, no reflejó ninguna diferencia estadísticamente significativa entre los grupos ni en el tiempo de búsqueda hasta encontrar el reforzador ( $F_{(1,13)} = 1.091$ ;  $p \geq 0.05$ ) ni en el número de errores ( $F_{(1,13)} = 0.345$ ;  $p \geq 0.05$ ). Además, todos los animales redujeron significativamente el número de errores ( $F_{(2,26)} = 25.399$ ;  $p \leq 0.001$ ) y el tiempo empleado para localizar el reforzador ( $F_{(2,26)} = 24.854$ ;  $p \leq 0.001$ ) a medida que transcurrían los 3 días de entrenamiento. Estos resultados demuestran que todos los animales aprenden la tarea de memoria espacial antes de que fueran sometidos a las manipulaciones experimentales (Figura 25).

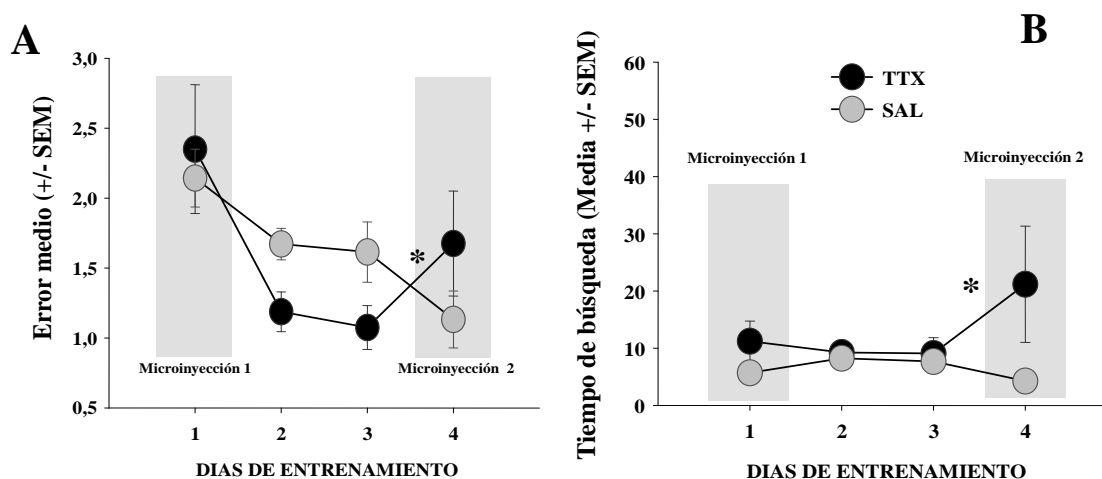


**Figura 25.** Representación gráfica de los registros comportamentales realizados en la tarea de memoria de referencia espacial. Se observa una reducción de los errores (A) y del tiempo de búsqueda (B) tanto en el grupo salino como en el grupo de tetradoxina durante el pre-entrenamiento. El conocimiento del procedimiento y el entrenamiento aumenta la rapidez de los animales para solucionar la tarea. ( $*p \leq 0.05$ ) (pre-TTX= pre-Tetradoxina; pre-SAL= pre-Salino).

Por otro lado, el análisis global del entrenamiento después de las microinyecciones indicó que los animales de ambos grupos redujeron el número de errores ( $F_{(3,39)} = 7.817$ ;  $p \leq 0.001$ ) pero no el tiempo empleado para localizar el reforzador ( $F_{(3,39)} = 1.888$ ;  $p \geq 0.05$ ) a lo largo de los cuatro días de entrenamiento. Además, este análisis global tampoco reflejó un efecto significativo del efecto grupo ni

en el número de errores cometidos ( $F_{(3,39)} = 0.062$ ;  $p \geq 0.05$ ) ni en el tiempo empleado para localizar el reforzador ( $F_{(3,39)} = 2.290$ ;  $p \geq 0.05$ ).

Sin embargo, el análisis estadístico sí mostró la presencia de una interacción significativa entre ambos factores (grupo x días de entrenamiento) pero solo en la variable “número de errores” ( $F_{(3,39)} = 3.8$ ;  $p \leq 0.05$ ). La aplicación de la prueba LSD *a posteriori*, reflejó que los animales de ambos grupos reducían los errores a medida que transcurrían los cuatro días del entrenamiento ( $p \leq 0.05$ ), aunque los animales del grupo al que se les había microinyectado TTX en la SuMr presentaban un incremento significativo en el número de errores cometidos durante el último día del entrenamiento ( $p \leq 0.05$ ). Complementariamente, el análisis independiente del tiempo empleado por los animales de ambos grupos para acceder al reforzador, mostró que sólo en los animales que recibieron microinyecciones de TTX en la SuMr se producía un aumento significativo de éste cuando se comparaba con el día anterior ( $p \leq 0.05$ ). (Figura 26).



**Figura 26.** Representación gráfica de los resultados obtenidos en la tarea de memoria de referencia espacial con microinyecciones. La administración de TTX después del entrenamiento, no produjo ninguna alteración ni en errores (A) ni en el tiempo de búsqueda (B), indicando que la inactivación del SuM no altera la adquisición de la información espacial. Del mismo modo, no se observó ninguna alteración el 2º y el 3º día del entrenamiento ni en los errores (A) ni en el tiempo de búsqueda (B), indicando que la realización de microinyecciones de tetradoxina en SuM no afectó a la consolidación de información espacial. Sin embargo, la inactivación del SuM antes de la tarea de recuperación de información espacial (día 4), provocó un aumento de los errores cometidos (A) y del tiempo de búsqueda (B). (\* $p \leq 0.05$ ) (TTX= Tetradoxina; SAL= Solución Salina).

#### 4. DISCUSIÓN.

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo indican que la lesión electrolítica de la SuMr no altera la capacidad de los roedores para aprender a localizar un reforzador en un entorno conocido. De acuerdo con los resultados de este primer experimento del capítulo V, también hemos descrito que la inactivación temporal de la SuMr no deteriora la capacidad de los animales para adquirir y consolidar un aprendizaje espacial con demandas de memoria de referencia, en un contexto conocido. De forma contraria, nuestros resultados en este segundo experimento de este capítulo, indican claramente que la inactivación de la SuMr perjudica la capacidad de los animales para recuperar la información sobre un aprendizaje espacial previamente consolidado. Este déficit se observa cuando se administra TTX antes de recuperar la información espacial previamente consolidada.

El diferente resultado obtenido en estos dos experimentos, podría atribuirse a las diferencias técnicas y de procedimiento que se dan entre ambos estudios. De este modo, el estudio de la memoria empleando lesiones irreversibles, como las electrolíticas practicadas en nuestro primer estudio, no permiten testar de forma directa la implicación de la SuMr en cada una de las fases temporales de la memoria. En este sentido, es interesante resaltar que los animales que recibieron lesiones permanentes aprendieron la tarea en ausencia de la SuMr, de modo que aunque en condiciones normales pudiera participar en la recuperación de la información espacial, es posible que en condiciones de lesión, pueden darse fenómenos compensatorios que no nos permitan observar el déficit (O'Keefe y Nadel, 1978; Whishaw y Mittleman, 1986). De forma contraria, durante el segundo experimento, el entrenamiento en la tarea de memoria espacial se ha producido en ausencia de alteraciones ni estructurales ni funcionales de la SuMr, lo que permite que los animales aprendan la tarea de memoria de referencia espacial con la SuMr relativamente intacta y funcional. De este modo, la inactivación funcional de la SuMr, empleada durante el segundo experimento, antes de que los animales tengan que recuperar la información espacial previamente consolidada, permite testar de forma más clara la relación de la SuMr con la recuperación de la memoria espacial, evitando la aparición de fenómenos compensatorios.

Otra posibilidad que podría, al menos parcialmente, explicar la diferencia entre ambos experimentos se relaciona con los cambios en el procedimiento experimental y protocolo empleados durante el segundo experimento. De este modo, el aumento del

tamaño del laberinto pero principalmente el incremento del número de reforzadores disponibles (7 vs 9), posiblemente conlleve un aumento en la dificultad de la tarea, ya que existen más posibilidades de confusión. Este aumento de la dificultad se puede observar durante el primer día del entrenamiento preoperatorio en la tarea de memoria de referencia espacial, ya que los animales cometen un mayor número de errores cuando disponen de mayor número de reforzadores. Sin embargo, postoperatoriamente no se observa un número de errores netamente diferente en ambos estudios (Figuras 19 y 26).

Hasta la fecha, los estudios que han analizado la participación de la SuMr en la memoria espacial, indican que esta estructura diencefálica se encuentra relacionada con la memoria espacial (Santín y cols, 2003; Vann y cols, 2000). No obstante estos estudios, al igual que el primer experimento de este capítulo, no se han ocupado de estudiar de forma directa la participación de la SuMr en las diferentes fases temporales de la memoria espacial. Hasta la fecha, parece claro que la SuMr no es importante para la adquisición de la información espacial como indican nuestros dos experimentos, así como el grupo de Shahidi y McNaughton (Shahidi y cols, 2004; Pan y McNaughton, 1997). En ambos trabajos, aún cuando mantienen diferencias en el protocolo empleado, se estudió la implicación directa de la SuMr en la memoria de referencia espacial en la piscina circular, mediante la microinyección de compuestos farmacológicos que reducen o impiden la actividad funcional de las neuronas de la SuMr (lidocaína (bloquea los canales de sodio) y clordiazepóxido (benzodiazepina) respectivamente). De forma coincidente, ambos estudios indican que la inactivación temporal de la SuMr no es suficiente para observar alteraciones en la adquisición de una tarea espacial para cuya solución se tiene que aplicar una regla de memoria de referencia. Un elemento novedoso de nuestro estudio y que amplía el conocimiento anterior al respecto, es la ausencia de participación de la SuMr en la adquisición de la memoria espacial en contextos familiares, frente al resto de estudios que hacen hincapié en la adquisición de esta memoria en condiciones de novedad.

Con respecto a la fase de consolidación, nuestros resultados indican que la SuMr no constituye un elemento clave para la consolidación de la información espacial, ya que en ninguno de los dos hemos obtenido datos que nos permitan sugerir esta relación. Sin embargo, un estudio previo sugiere que esta región es importante para observar una consolidación normal de la información espacial (Shahidi y cols, 2004). La divergencia entre nuestros resultados y los hallados por el grupo de Shahidi no se puede explicar de una forma clara. En principio las diferencias en el procedimiento, con componentes

aversivos (piscina circular (Shahidi y cols, 2004) y apetitivos (nuestro procedimiento)), pueden ser parcialmente responsables de la falta de concordancia entre ambos resultados. No obstante, la participación de la SuMr en la consolidación de la información espacial vinculada con los aspectos motivacionales de las tareas, constituye una hipótesis que merece ser abordada en detalle en trabajos posteriores. Por otro lado, la afectación diferencial de tractos o fibras de relevancia durante los fenómenos de consolidación como el fórnix, también constituye una posible explicación que bien podría dar cuenta de las diferencias observadas entre ambos estudios.

Por último, es importante resaltar que nuestro estudio constituye el primero que indica la importancia de la SuMr durante los procesos de recuperación de la información espacial. En este sentido, nuestros datos indican que el aumento de errores y paralelamente del tiempo que tardan en encontrar el reforzador, claramente sugiere esta participación. Es conveniente mencionar, que aunque una afectación de esta fase podría relacionarse con problemas de procesamiento de la información espacial, esta hipótesis no parece plausible en nuestro estudio, ya que no hemos observado ninguna alteración al inactivar la SuMr antes de la fase de adquisición. De este modo, la hipótesis más parsimoniosa para explicar nuestros datos es que la SuMr es una región nerviosa importante para recuperar información espacial previamente consolidada y aplicarla de modo eficaz en solución de un problema espacial. Complementariamente, esta capacidad se ve sensiblemente mermada cuando se inhibe funcionalmente la SuMr.

A pesar de que el nuestro constituye el único trabajo que ha observado este déficit en la fase de recuperación, el estudio realizado por Pan y McNaughton (1997) nos ofrece alguna información que podría ser interpretada en este sentido. En este trabajo, observaron que los animales entrenados en la piscina circular durante un único día, tardan más tiempo en encontrar la plataforma en presencia de una inhibición funcional de la SuMr (clordiacepóxido), pero sólo durante los últimos ensayos. Esta afectación diferencial de los últimos ensayos del entrenamiento en contraste con los primeros ensayos, bien pueden reflejar la importancia de la SuMr para recuperar la información espacial necesaria para realizar la tarea a corto plazo. De este modo, nuestros resultados en combinación con los de Pan y McNaughton (1997), sugieren la implicación de la SuMr en la recuperación de información espacial, tanto a corto plazo como en aquellas tareas que han sido almacenadas más a largo plazo.

# VI

## EXPERIMENTOS 4 y 5

### Memoria de trabajo espacial y región supramamilar



## INTRODUCCIÓN.

En el capítulo anterior, hemos demostrado la importancia de la región supramamilar del hipotálamo durante el recuerdo de la información espacial previamente aprendida, sin hallarse relacionada con las fases de adquisición ni consolidación de la misma.

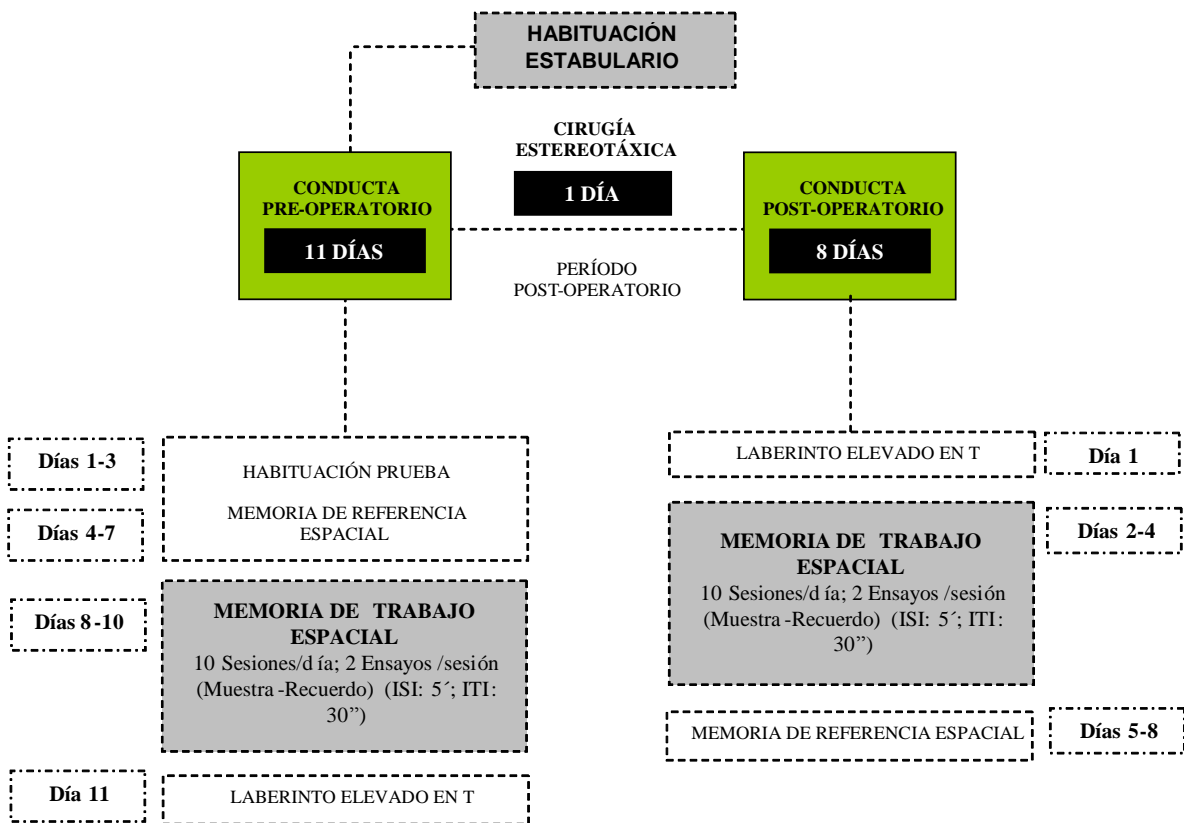
En este capítulo, nos proponemos estudiar si esta región diencefálica es importante para la memoria de trabajo cuando los sujetos han de solucionar problemas espaciales. Para ello, hemos diseñado dos experimentos independientes basados en el aprendizaje de una regla de emparejamiento demorado con un lugar (DMTP). En ambos estudios, con el fin de evitar la influencia de nuestros tratamientos experimentales sobre las cuestiones procedimentales de aprendizaje de la regla de DMTP, los animales fueron entrenados previamente en la tarea hasta que todos lograran un elevado grado de competencia en la ejecución de la misma. Los tratamientos, de este modo, nos informarán sobre la relación que la SuMr tiene con la memoria de trabajo, evitando la influencia de los elementos procedimentales.

Para estudiar esta relación, en un primer experimento de este capítulo se estudiará el efecto de una lesión permanente (electrolítica) sobre la memoria de trabajo espacial (experimento 4) y en un segundo experimento se estudiará el efecto de la inactivación temporal de la SuMr empleando TTX, sobre la memoria de trabajo espacial (experimento 5).

**EXPERIMENTO 4: EFECTOS DE LA LESIÓN ELECTROLÍTICA DE LA REGIÓN SUPRAMAMILAR EN UNA TAREA DE MEMORIA DE TRABAJO ESPACIAL.**

**1. INTRODUCCIÓN.**

El experimento 4 que se presenta en este capítulo, al igual que el presentado en el capítulo anterior, constituye parte de un trabajo más general en el que se estudiaron la memoria de referencia espacial, la memoria de trabajo espacial y la respuesta de ansiedad de animales con lesiones electrolíticas en la región supramamilar. En este sexto capítulo se presentarán sólo los resultados que tienen que ver con la memoria de trabajo espacial.



**Figura 27.** Representación esquemática del diseño experimental usado en el experimento 4. Todos los animales se entrenaron en la tarea de memoria de trabajo espacial antes y después de la intervención quirúrgica. Durante el periodo pre-operatorio, los animales fueron habituados al procedimiento experimental durante 3 días consecutivos y entrenados en una tarea de memoria de referencia espacial, seguida por una tarea de memoria de trabajo espacial (días 8-10) y el laberinto elevado en T. Post-operatoriamente y después del entrenamiento en el laberinto elevado en T, todos los animales pasaron nuevamente por la tarea de memoria de trabajo espacial (días 2-4), seguida por la tarea de memoria de referencia espacial.

En el desarrollo de este experimento, todos los animales se entrenaron preoperatoriamente en la tarea de memoria de trabajo con el fin de conseguir que todos los animales alcanzaran un buen grado de aprendizaje de la regla mnésica necesaria. A continuación los animales fueron intervenidos quirúrgicamente y de forma aleatoria un grupo recibió una lesión electrolítica en la región supramamilar, mientras que en otro grupo se simuló la misma. Postoperatoriamente, todos los animales volvieron a pasar por la misma tarea de memoria de trabajo espacial, permitiendo estudiar la ejecución de los animales que presentaban lesionada la SuMr y comparar su rendimiento con el mostrado por los animales que sólo habían pasado por el proceso quirúrgico (véase la figura 27, donde se muestra un esquema simplificado del procedimiento).

## **2. MATERIAL Y MÉTODOS.**

Los animales empleados en este experimento han sido los mismos que fueron usados en el experimento 2 del capítulo V de esta tesis doctoral. De este modo, en este apartado de material y métodos tan sólo se describirán las pruebas conductuales empleadas.

### **A. Procedimiento comportamental: memoria de trabajo espacial.**

Esta tarea, se realizó en el mismo laberinto ya descrito en el experimento 1 (véase el apartado 2º (B) del experimento 1, para una descripción pormenorizada del laberinto).

Como se ha descrito en el experimento 2 del capítulo V, preoperatoriamente todos los animales fueron habituados al laberinto y a las condiciones experimentales (días 1-3) y fueron entrenados sucesivamente en una tarea de memoria de referencia espacial (días 4-7), una tarea de memoria de trabajo espacial (días 8-10) y en el laberinto elevado en T (día 11). Postoperatoriamente se volvió a estudiar el efecto de la lesión de la SuMr en dichas tareas (laberinto elevado en T (día 1), memoria de trabajo espacial (días 2-4) y memoria de referencia espacial (días 5-8)) (Figura 27). Como hemos indicado previamente, el estudio de la memoria de referencia ha sido objeto de estudio en el capítulo V y la respuesta de miedo-ansiedad será tratada en el capítulo posterior (capítulo VII). De este modo, en el presente capítulo trataremos los resultados obtenidos en la tarea de memoria de trabajo.

Aprendizaje espacial con demandas de memoria de trabajo: Los animales fueron entrenados en una tarea de *emparejamiento demorado con un lugar* (DMTP). El aprendizaje de una regla de DMTP implica que los animales durante un primer ensayo (ensayo de muestra), han de localizar la posición de un reforzador en un lugar desconocido. Después de un intervalo de demora, se administra un segundo ensayo (ensayo de recuerdo) donde los animales han de buscar nuevamente el reforzador en el mismo lugar en el que se encontraba durante el primer ensayo. Durante este entrenamiento, los animales han de aprender que durante el ensayo de muestra tienen que identificar la ubicación del reforzador en el laberinto, y una vez que lo localizan tendrán que recordar la información espacial necesaria para identificar el lugar en el que se encontraba el reforzador. De este modo, una ejecución eficaz en este tipo de tarea, depende de la capacidad de los animales para integrar la información espacial que identifique correctamente la posición del reforzador junto con la capacidad de mantener activa esa información durante el intervalo de demora (Santín y cols, 1999).

El protocolo de entrenamiento empleado para obtener este aprendizaje, se administró durante 3 días consecutivos. Los animales dispusieron de 10 sesiones de entrenamiento y un intervalo entre las sesiones de 5 minutos. Cada una de las sesiones a su vez, disponía de dos ensayos (ensayo de muestra y ensayo de recuerdo) con un intervalo entre ambos de 30 segundos. Durante el ensayo de muestra se aleatorizó el lugar de partida y la localización del reforzador. Durante el ensayo de recuerdo estas dos posiciones se mantuvieron constantes. Sin embargo, la ubicación de éstas fue modificada aleatoriamente en cada una de las sesiones de entrenamiento. Esta tarea fue empleada tanto preoperatorio como postoperatoriamente, con la finalidad de conocer la importancia de la SuMr en la tarea de memoria de trabajo.

Las variables dependientes registradas fueron el tiempo que los animales tardaban en localizar el reforzador (tiempo de búsqueda) y el número de errores cometidos hasta localizar el recipiente que contenía el reforzador.

## **B. Diseño experimental y análisis de datos.**

El análisis estadístico se realizó empleando 9 ratas pseudolesionadas y 9 ratas lesionadas, que se seleccionaron después de observar la localización y el tamaño de la lesión (véase apartado 3° (A) del experimento 2, página 59 de este trabajo).

Se empleó un diseño factorial mixto 2 x 2 x 2 con una variable entresujetos “grupo” con dos niveles (grupo lesionado y grupo pseudolesionado), y dos variables

intrasujetos: “ejecución antes y después de la intervención quirúrgica”, con dos niveles (precirugía y postcirugía) y “tipo de ensayo” con dos niveles (ensayo de muestra y ensayo de recuerdo).

El análisis estadístico aplicado a los datos obtenidos fue un ANOVA de medidas repetidas después de la comprobación de los supuestos del modelo (homocedasticidad univariada (test de Levene), homocedasticidad multivariada (test de Box) y esfericidad (test de Mauchly)). A continuación se aplicaron pruebas de significación estadística a posteriori (diferencia honestamente significativa de Tukey (HSD)). Se realizó un análisis independiente para cada una de las variables dependientes registradas (nº de errores y tiempo de búsqueda).

Para conocer si la lesión electrolítica de la SuMr se relacionaba con el aumento de la interferencia proactiva (i.e. la información previamente aprendida interfiere con el recuerdo de información más reciente), se recodificaron los datos para poder estudiar este fenómeno. Se emplearon los datos directos obtenidos durante el ensayo de recuerdo y se agruparon de forma independiente los días de entrenamiento antes de la intervención quirúrgica (días 8-10) y los días de entrenamiento después de la intervención (días 2-4). Se calculó el valor medio del primer ensayo de recuerdo para los días antes de la intervención y para los días después de la intervención en cada animal. A continuación se procedió al cálculo del valor medio del segundo ensayo de recuerdo y así sucesivamente hasta obtener el cálculo de los 10 ensayos de recuerdo. Esta recodificación de los datos se realizó tanto con el número de errores como con el tiempo empleado para localizar el reforzador. De este modo, se obtuvieron 10 valores en cada animal durante los tres días de entrenamiento antes de la intervención quirúrgica y otros 10 valores durante los tres días de entrenamiento después de la intervención quirúrgica. Una vez finalizada esta recodificación, se dispuso de un diseño factorial mixto con una variable entre sujetos (grupo lesionado y grupo pseudolesionado) y dos variables intra sujetos (ensayos (10 niveles) y ejecución antes y después de la intervención quirúrgica (2 niveles: pre-lesión y post-lesión)).

Se aplicó un ANOVA de medidas repetidas para cada variable dependiente (nº de errores y tiempo de búsqueda) seguido de un análisis de tendencias. En todos los casos se comprobaron los supuestos de aplicación de la prueba estadística.

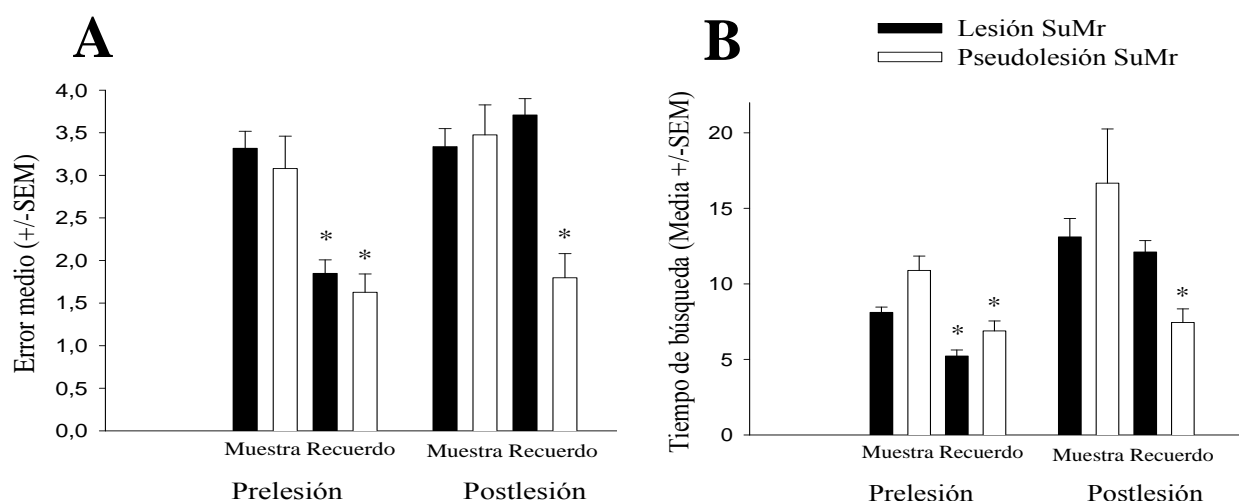
Todos los análisis estadísticos se realizaron usando el programa STATISTICA 7.0 para Windows (StatSoft, Inc).

### 3. RESULTADOS.

El análisis de los efectos principales reveló la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los registros pre y postoperatorios, tanto en el número de errores ( $F_{(1,16)} = 30.326$ ;  $p \leq 0.000$ ) como en el tiempo dedicado por los animales a la búsqueda del reforzador ( $F_{(1,16)} = 16.410$ ;  $p \leq 0.001$ ). Complementariamente, también se observaron diferencias significativas en ambas variables cuando se compararon el ensayo de muestra y el ensayo de recuerdo (nº de errores:  $F_{(1,16)} = 74.929$ ;  $p \leq 0.000$  ; tiempo de búsqueda:  $F_{(1,16)} = 17.33$ ;  $p \leq 0.001$ ). De forma similar, todas las interacciones de primer orden fueron estadísticamente significativas cuando se analizó el número de errores (grupo x ejecución pre y postcirugía:  $F_{(1,16)} = 8.777$ ;  $p \leq 0.009$ ; grupo x tipo de ensayo:  $F_{(1,16)} = 17.351$ ;  $p \leq 0.001$ ; ejecución pre y postcirugía x tipo de ensayo:  $F_{(1,16)} = 27.908$ ;  $p \leq 0.000$ ). Con respecto a la segunda variable dependiente, tiempo de búsqueda, tan sólo fue estadísticamente significativa la interacción de primer orden grupo x tipo de ensayo ( $F_{(1,16)} = 5.156$ ;  $p \leq 0.037$ ). Con respecto a la interacción de segundo orden (grupo x ejecución pre y postcirugía x tipo de ensayo), fue estadísticamente significativa tanto en el número de errores ( $F_{(1,16)} = 45.585$ ;  $p \leq 0.000$ ) como en el tiempo dedicado a la búsqueda del reforzador ( $F_{(1,16)} = 6.591$ ;  $p \leq 0.0215$ ).

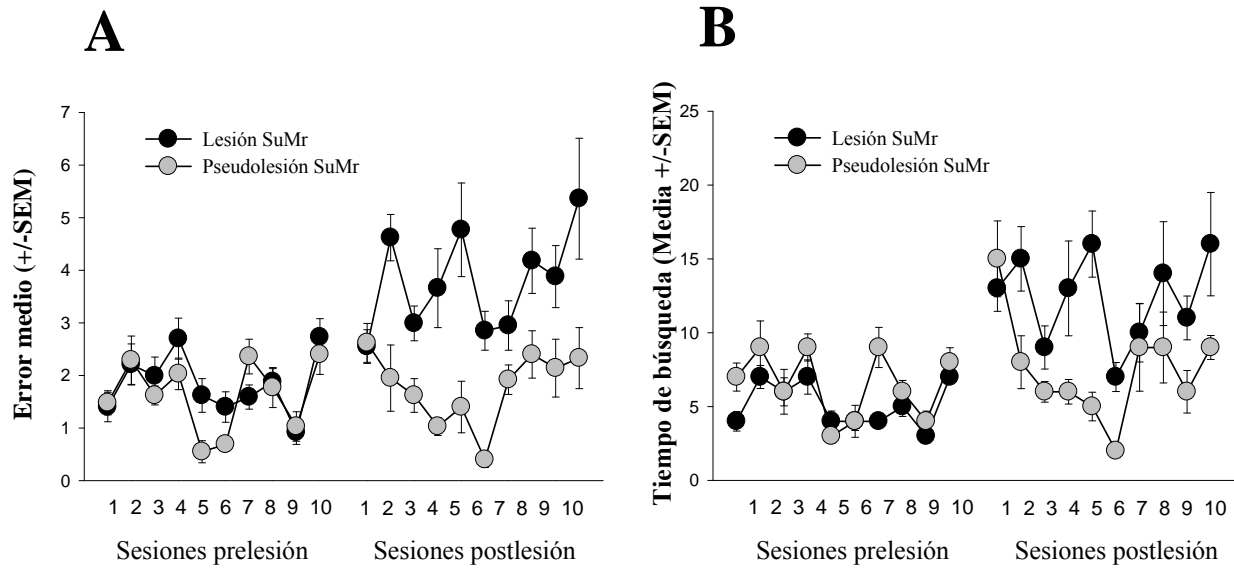
La aplicación de las pruebas de significación a posteriori mostraron que los animales de ambos grupos cometían un número similar de errores y exhibían tiempos de búsquedas del reforzador similares durante el ensayo de muestra, sin existir diferencias en este ensayo entre los registros pre y postoperatorios ( $p \geq 0.05$ ). Complementariamente, se observó una ejecución similar entre la ejecución pre y postoperatoria en cada uno de los dos grupos, tanto en el número de errores cometidos como en el tiempo dedicado a la búsqueda del reforzador ( $p \geq 0.05$ ). Con respecto al ensayo de recuerdo, los animales de ambos grupos cometieron un número similar de errores y mostraron tiempos de búsqueda comparables durante el registro preoperatorio ( $p \geq 0.05$ ). Sin embargo, postoperatoriamente se observaron diferencias entre los dos grupos tanto en el número de errores cometidos como en el tiempo que dedicaron a la búsqueda del reforzador ( $p \leq 0.05$ ). Más en concreto, los animales que presentaban la lesión electrolítica de la SuMr mostraron tiempos de búsqueda mayores ( $p \leq 0.05$ ) y cometieron más errores ( $p \leq 0.05$ ) que los animales pertenecientes al grupo control. Complementariamente, ambos grupos experimentales mostraron preoperatoriamente una reducción tanto en el número de errores como en el tiempo dedicado a la búsqueda

durante el ensayo de recuerdo comparado con el ensayo de muestra ( $p \leq 0.05$ ). No obstante, postoperatoriamente sólo se observó este patrón en los animales del grupo control ( $p \leq 0.05$ ), no hallándose diferencias estadísticamente significativas entre los dos ensayos en el grupo de animales que recibieron la lesión electrolítica ( $p \geq 0.05$ ). (Figura 28).



**Figura 28.** Representación gráfica que muestra los efectos de la lesión electrolítica de la SuMr sobre la memoria de trabajo espacial. Durante el entrenamiento preoperatorio se observa que los animales de ambos grupos reducen el número de errores (A) y el tiempo que emplearon en la búsqueda del reforzador (B) durante el ensayo de recuerdo en comparación con el ensayo de muestra. Con respecto al entrenamiento postoperatorio, los animales que recibieron la lesión electrolítica fueron incapaces de reducir ni los errores cometidos (A) ni el tiempo empleado para localizar el reforzador (B), de forma contraria a lo observado en aquellos animales pertenecientes al grupo control (pseudolesión SuMr). (\* $p \leq 0.05$ ).

Los resultados obtenidos después de analizar los datos recodificados del ensayo de recuerdo, para estudiar el fenómeno de interferencia proactiva, indicaron que los animales que recibieron la lesión electrolítica, cometían más errores y tardaban más tiempo en localizar el reforzador durante el registro postoperatorio ( $F_{(1,16)} = 36.87$ ;  $p \leq 0.000$  y  $F_{(1,16)} = 25.122$ ;  $p \leq 0.000$  respectivamente). Sin embargo, no se observó una tendencia lineal de tipo creciente, que justificara la presencia de interferencia proactiva, en ninguno de los dos grupos, ni durante la ejecución preoperatoria ni durante la ejecución postoperatoria ( $p \geq 0.05$ ) (Figura 29).



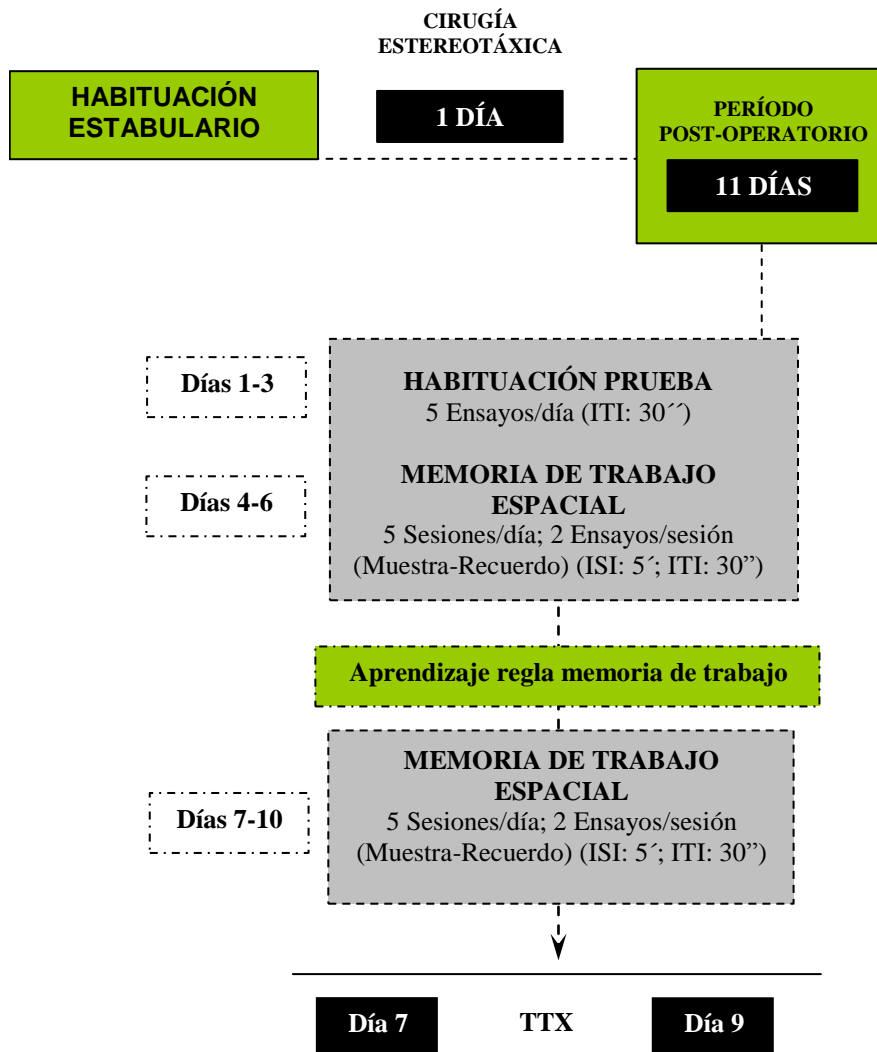
**Figura 29.** Representación gráfica de los resultados obtenidos en el experimento de memoria de trabajo espacial, para el estudio de la interferencia proactiva. Se representan los errores medios (A) y el tiempo de búsqueda (B) que reflejen la aparición de interferencia proactiva. No se observa un aumento progresivo en los errores (A) ni en el tiempo de búsqueda (B) que reflejen la aparición de interferencia proactiva. No obstante, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos en la ejecución después de la intervención quirúrgica. De este modo, los animales con lesión de la SuMr presentaron mayor número de errores (A) y dedicaron más tiempo a la búsqueda del reforzador (B) que los animales que no recibieron la lesión electrolítica.



**EXPERIMENTO 5: EFECTOS DE LA MICROINYECCIÓN DE TETRADOTOXINA EN LA REGIÓN SUPRAMAMILAR EN UNA TAREA DE MEMORIA DE TRABAJO ESPACIAL.**

**1. INTRODUCCIÓN.**

El experimento 5 se ha diseñado para estudiar el efecto de la inactivación funcional de la región del supramamilar (SuMr) en la memoria de trabajo espacial. Mediante la administración de tetradotoxina (TTX), que como hemos indicado previamente es un bloqueante de los canales de  $Na^{2+}$ , se puede estudiar la ejecución comportamental en ausencia de la región cerebral que se encuentra inactivada con TTX, presentada la ventaja que después de 24 horas se ha recuperado totalmente la actividad de la zona (Ambrogi y cols, 1997; Lehman y cols, 2003).



**Figura 30.** Representación esquemática del diseño experimental usado en el estudio de la memoria de trabajo espacial relacionado con la administración intra-SuMr de tetradotoxina (TTX). Después de un periodo postoperatorio de 11 días y tres días de habituación al laberinto (días 1-3), todos los animales fueron entrenados en una tarea de memoria de trabajo con demandas de emparejamiento demorado con un lugar (DMTP) a lo largo de 3 días (días 4-6). Los días 7 y 9 un grupo de animales recibió una microinyección de TTX en la SuMr, mientras que otro grupo recibió una microinyección de ClNa al 0,9%. Durante los días 8 y 10 los animales fueron testados en la misma tarea pero no recibieron ninguna microinyección.

En este experimento, una vez transcurridos los 11 días del postoperatorio y tres días de habituación (días 1-3), todos los animales fueron entrenados en una tarea de memoria de trabajo con el fin de conseguir que todos los animales alcanzaran un buen grado de aprendizaje de la regla de memoria de trabajo (días 4-6). A continuación, un grupo de animales recibió TTX en la SuMr, microinyectándole una solución salina (ClNa 0,9%) al otro grupo durante los días 7 y 9. Los días 8 y 10 los animales fueron entrenados en la prueba pero sin recibir ninguna microinyección. De este modo, este estudio nos permite comparar la ejecución de los animales en la tarea de memoria de trabajo espacial en presencia y ausencia de la inactivación de la SuMr (Figura 30).

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS.

Se emplearon un total de 22 ratas macho Sprague-Dawley (CRIFFA, Barcelona, España). Los pesos iniciales de los animales fueron de 250-340 grs. Las condiciones de estabulación y mantenimiento fueron las mismas que se han descrito previamente en el experimento 1 (véase apartado 2 (A), página 36 de esta tesis doctoral). La cirugía esterotáxica, microinyección de TTX, perfusión vascular y procesamiento histológico se realizaron del mismo modo al descrito en el experimento 3 del capítulo V.

### A. Procedimiento comportamental: memoria de trabajo espacial.

Esta tarea, se realizó en el mismo laberinto ya descrito en el experimento 3 (véase el apartado 2 (B) del experimento 3, para una descripción detallada del laberinto).

De modo similar a lo expuesto en el experimento previo, se hizo uso de un paradigma de emparejamiento demorado con un lugar (DMTP) con el fin de estudiar la memoria de trabajo espacial. Una vez transcurridos 11 días después de la intervención quirúrgica, en la que se implantaron las cánulas guía en la SuMr para posteriormente proceder a las microinyecciones, todos los animales fueron habituados a la situación experimental. El primer día los animales tuvieron que explorar libremente el laberinto

en ausencia de reforzadores, durante 5 minutos. A lo largo de los siguientes tres días, se situó el reforzador en cada uno de los recipientes del laberinto y los animales tenían que localizar e ingerir el reforzador del interior de cada uno de los recipientes. Se administraron 5 ensayos por día con una duración máxima de 5 minutos por ensayo y un intervalo entre los ensayos de 30 segundos.

Concluida esta fase de habituación los animales dispusieron de tres días de entrenamiento en una tarea de memoria de trabajo basada en el paradigma de DMTP. Durante estos tres días de entrenamiento los animales alcanzaron un buen conocimiento del entorno y de la regla de memoria de trabajo necesaria para solucionar eficazmente la tarea. El entrenamiento consistió en 5 sesiones diarias, con un intervalo entre las sesiones de 5 minutos. Cada sesión a su vez se dividió en dos ensayos: ensayo de muestra y ensayo de recuerdo con un intervalo entre los ensayos de 30 segundos. Durante el ensayo de muestra se aleatorizaba el lugar de salida de los animales y la localización del reforzador, posiciones que se mantenían durante el ensayo de recuerdo. La posición de salida de los animales así como la localización del reforzador era diferente en cada una de las sesiones de entrenamiento.

Al día siguiente, las ratas se dividieron en 2 grupos: grupo SAL (microinyección intra-SuM de 0.5µl de salino (N=9)) y, grupo TTX (microinyección intra-SuM de tetradotoxina (0.5 ng diluido en 0.5µl de solución salina) (N=10)). Este segundo entrenamiento se realizó durante 4 días consecutivos. Durante el primer y tercer día de entrenamiento en la tarea, los animales recibieron una microinyección (TTX o CINa) 30 minutos antes del registro comportamental. Durante los días segundo y cuarto los animales fueron entrenados sin recibir las microinyecciones.

Las variables dependientes registradas fueron el tiempo que los animales tardaban en localizar el reforzador (tiempo de búsqueda) y el número de errores cometidos hasta localizar el recipiente que contenía el reforzador.

## **B. Diseño experimental y análisis de datos.**

Se aplicó un diseño factorial mixto 2 x 3 x 2 para el estudio de los tres primeros días de entrenamiento, cuando los animales no habían recibido ninguna microinyección. Este diseño disponía de una variable entre sujetos con dos niveles (grupo pre-TTX y grupo pre-SAL) y dos variables intra sujetos (días de entrenamiento con tres niveles (días 1-3) y tipo de ensayo con dos niveles (ensayo de muestra y ensayo de recuerdo)).

Por otro lado, se aplicó un diseño factorial mixto  $2 \times 2 \times 4 \times 2$  para estudiar los cuatro días siguientes, en donde se analizaría el efecto de la microinyección de TTX en la SuMr sobre la memoria de trabajo espacial. Este diseño disponía de una variable entre sujetos con dos niveles (grupo TTX y grupo SAL) y tres variables intra sujeto (microinyección (microinyección y no microinyección), días de entrenamiento (días 1-4) y tipo de ensayo (ensayo de muestra y ensayo de recuerdo)).

Se realizaron análisis separados para cada una de las variables dependientes registradas (nº de errores y tiempo de búsqueda). Se aplicaron ANOVAs de medidas repetidas para el análisis estadístico. En todos los casos se comprobó la homocedasticidad univariada (test de Levene), homocedasticidad multivariada (test de Box) y esfericidad (test de Mauchly). A continuación se aplicaron pruebas de significación estadística a posteriori (diferencia mínimamente significativa de Fisher (LSD)).

Para determinar un posible aumento de la interferencia proactiva en los animales que recibieron las microinyecciones de TTX, se procedió a la recodificación de los datos así como a un nuevo análisis. Para ello, se emplearon los datos directos obtenidos durante el ensayo de recuerdo de los días 7-10. Se agruparon los días con microinyección (días 7 y 9) y los días sin microinyección (días 8 y 10). Se calculó el valor medio del primer ensayo de recuerdo para los días 7 y 9, y para los días 8 y 10 en cada animal. A continuación se procedió al cálculo del valor medio del segundo ensayo de recuerdo y así sucesivamente hasta obtener el cálculo de los 5 ensayos de recuerdo. Esta recodificación de los datos se realizó tanto con el número de errores como con el tiempo empleado para localizar el reforzador. De este modo, se obtuvieron 5 valores en cada animal durante los dos días de microinyección y otros 5 valores durante los dos días sin microinyecciones. Mediante esta nueva recodificación, se dispuso de un diseño factorial mixto con una variable entre sujetos (grupo TTX y grupo SAL) y dos variables intra sujetos (ensayos (5 niveles) y microinyección (2 niveles: microinyección y no microinyección)).

Se aplicó un ANOVA de medidas repetidas para cada variable dependiente (nº de errores y tiempo de búsqueda) seguido de un análisis de tendencias. En todos los casos se comprobaron los supuestos de aplicación de la prueba estadística.

Todos los análisis estadísticos se realizaron usando el programa STATISTICA 7.0 para Windows (StatSoft, Inc).

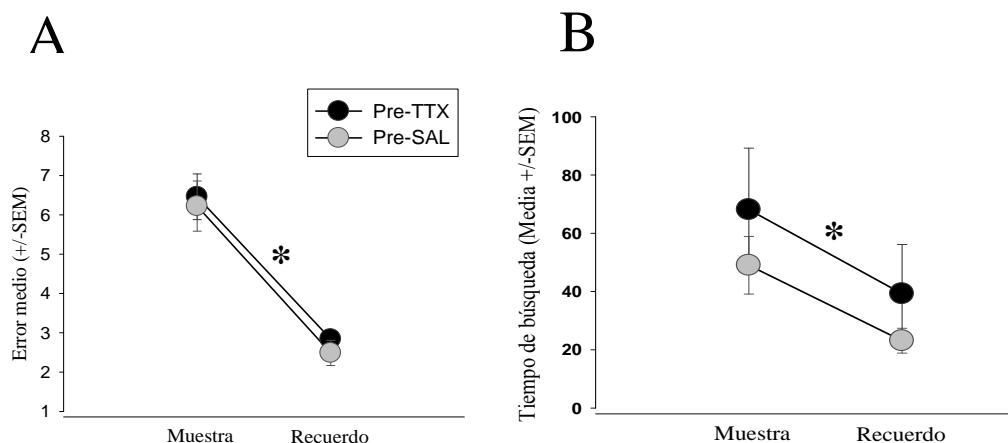
### 3. RESULTADOS.

#### A. Resultados histológicos.

Después del examen histológico, se eliminaron tres ratas ya que la cánula de microinyección se encontraba alejada más de 0.5 mm del SuM. De ese modo, se emplearon un total de 19 animales para proceder con el análisis conductual, de los cuales 10 animales recibieron microinyecciones de TTX y 9 recibieron microinyecciones de CINA.

#### B. Resultados comportamentales

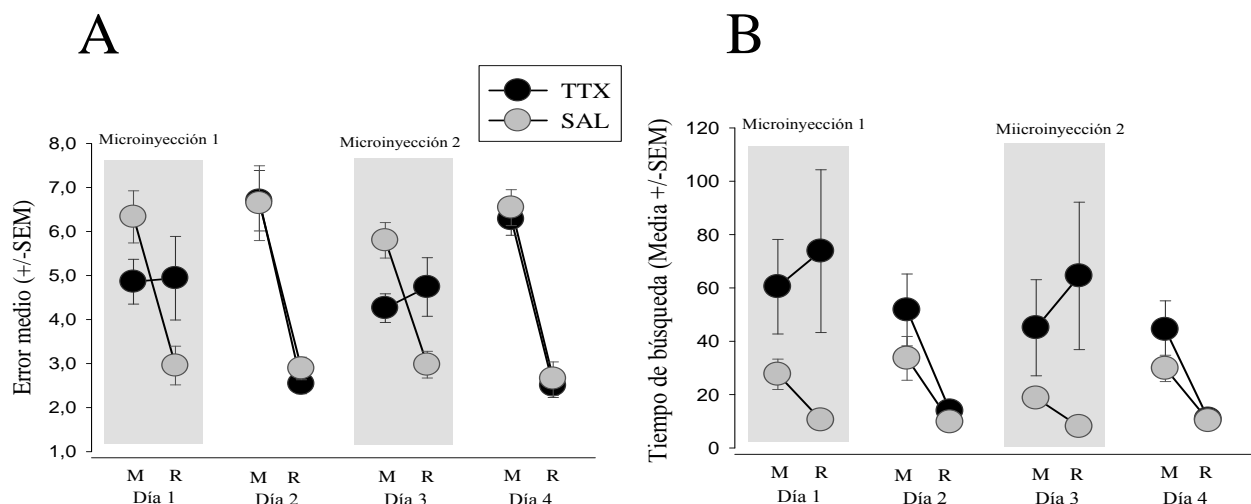
Durante el entrenamiento pre-microinyección (días 4-6) no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos, ni en el número de errores cometidos ( $F_{(1,17)} = 0.392$ ;  $p > 0.005$ ) ni en el tiempo dedicado a la búsqueda del reforzador ( $F_{(1,17)} = 0.79$ ;  $p > 0.005$ ) (Figura 31). Sin embargo, todas las ratas disminuyeron significativamente el número de errores ( $F_{(1,17)} = 60.918$ ;  $p < 0.001$ ) y tiempo empleado para localizar el reforzador ( $F_{(1,17)} = 10.499$ ;  $p < 0.01$ ) en el ensayo de retención en comparación con el ensayo de muestra (Figura 31).



**Figura 31.** Representación gráfica de la ejecución de animales experimentales y controles durante el entrenamiento en la tarea de memoria de trabajo espacial previo a la administración de los tratamientos. Se observa una disminución estadísticamente significativa en el n° medio de errores (A) y en el tiempo medio de búsqueda (B) durante el ensayo de retención con respecto al ensayo de adquisición en los dos grupos. (\* $p \leq 0.05$ ) (pre-TTX= Tetradotoxina; pre-SAL= Solución Salina).

Durante el entrenamiento realizado entre los días 7-10, en donde se estudió el efecto de la microinyección de TTX en la SuMr, se observó la presencia de una

interacción de segundo orden estadísticamente significativa (microinyección x tipo de ensayo x grupo) tanto en el número de errores cometidos ( $F_{(1,17)} = 29.531$ ;  $p < 0.001$ ) como en el tiempo empleado para localizar el reforzador ( $F_{(1,17)} = 6.362$ ;  $p < 0.05$ ) (Figura 32). Sin embargo, la interacción de tercer orden (microinyección x días de entrenamiento x ensayo x grupo) no resultó estadísticamente significativa ni en el número de errores cometidos ( $F_{(1,17)} = 0.1467$ ;  $p > 0.05$ ) ni en el tiempo empleado para localizar el reforzador ( $F_{(1,17)} = 0.000$ ;  $p > 0.05$ ). El análisis de la interacción de segundo orden (microinyección x tipo de ensayo x grupo) reveló que durante los días en que no se administró ninguna microinyección (días 8 y 10), todos los animales mostraron la misma conducta, con una reducción del número de errores y del tiempo empleado para localizar el reforzador durante el ensayo de recuerdo comparado con el ensayo de muestra ( $p \leq 0.05$ ). Este conducta fue similar en ambos grupos de animales ( $p \geq 0.05$ ) (Figura 32).

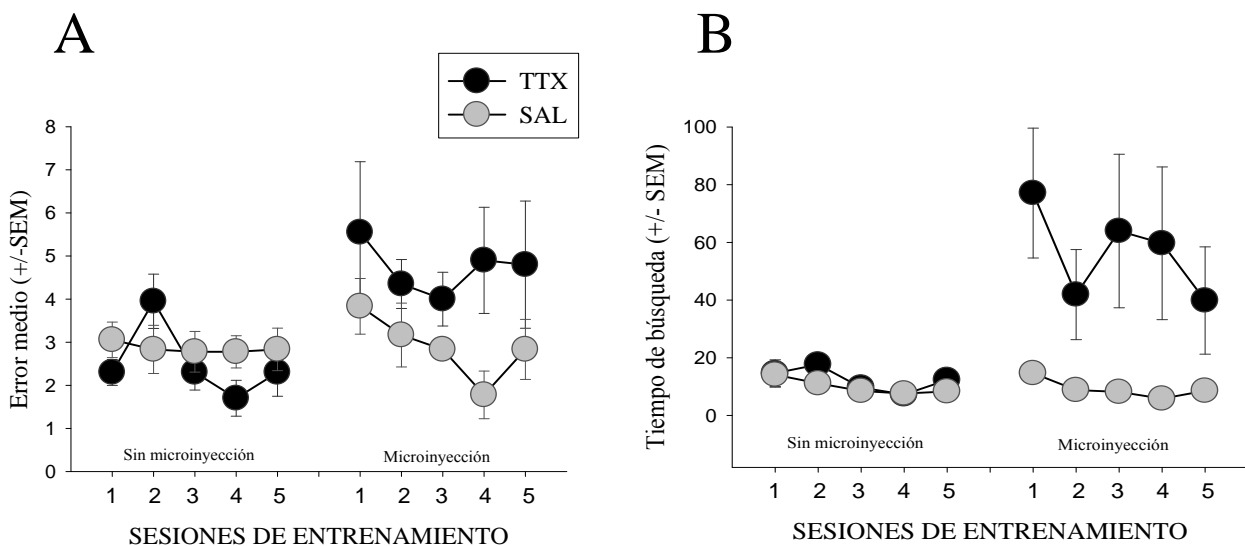


**Figura 32.** Representación gráfica que muestra la afectación de la memoria de trabajo espacial en animales con inactivación temporal de la región SuMr. (A). El grupo control (SAL) disminuyó significativamente el n° medio de errores en el ensayo de retención con respecto al ensayo de adquisición a lo largo de todo el entrenamiento (días 1-4). De forma contraria, aquellos animales a los que se les inactivó la SuMr (días 1 y 3), no mostraron una reducción del número de errores durante el ensayo de recuerdo en comparación con el ensayo de muestra. Sin embargo, en ausencia de TTX estos animales disminuyeron significativamente el número de errores (días 2 y 4). (B). Con respecto al tiempo que los animales de ambos grupos dedicaron a la búsqueda del reforzador, se observó que los animales pertenecientes al grupo control (SAL) reducían el tiempo de búsqueda en el ensayo de recuerdo, mientras que los animales del grupo experimental (TTX) sólo disminuyeron significativamente el tiempo de búsqueda los días que no se procedió con la microinyección de TTX (días 2 y 4), no observándose esta reducción cuando se administró TTX (días 1 y 3) (B). (TTX= Tetradotoxina; SAL=Solución Salina)

Contrariamente, los días en que los animales recibieron las microinyecciones en la SuMr (días 7 y 9), sólo el grupo al que se le microinyectó CINa mostró una clara

reducción durante el ensayo de recuerdo, en el número de errores y en el tiempo empleado para localizar el reforzador ( $p \leq 0.05$ ). Complementariamente, se observó que los dos grupos sólo difieren en la ejecución (número de errores y tiempo de búsqueda) mostrada durante el ensayo de recuerdo ( $p \leq 0.05$ ), pero no durante el ensayo de muestra ( $p \geq 0.05$ ) (Figura 32).

Por último, los resultados obtenidos al analizar los datos recodificados para estudiar el fenómeno de la interferencia proactiva durante el ensayo de recuerdo, se observó una interacción (grupo x tratamiento (microinyección y no microinyección)) tanto en el número de errores cometidos ( $F_{(1,17)} = 8.10$ ;  $p < 0.01$ ), como en el tiempo empleado para localizar el reforzador ( $F_{(1,17)} = 5.068$ ;  $p < 0.05$ ) (Figura 33).



**Figura 33.** Representación gráfica en donde se muestran los resultados obtenidos en el estudio de la interferencia proactiva. Los datos indican que no se produce un aumento progresivo del número de errores (A) ni del tiempo de búsqueda (B) relacionados con la administración de TTX en la SuMr. De este modo, se descarta que la inactivación de la SuMr se asocie con un aumento de la interferencia proactiva y por tanto descarta que este fenómeno sea el responsable del déficit de memoria de trabajo espacial observado (TTX= Tetradotoxina; SAL= Solución Salina).

Las comparaciones a posteriori indicaron que el grupo que recibió las microinyecciones de TTX cometía más errores y tardaba más tiempo en localizar el reforzador ( $p \leq 0.05$ ) (comparado con el grupo SAL y consigo mismo en condiciones de no administración de TTX). El análisis de tendencias no mostró la existencia de una tendencia lineal de tipo creciente en ninguno de los dos grupos, ni durante la microinyección ni durante la ausencia de la misma ( $p \geq 0.05$ ). De este modo, estos resultados indican que el deterioro observado después de la inactivación temporal de la

SuMr en la tarea de memoria de trabajo espacial, no está asociado con el incremento de la interferencia proactiva (Figura 33).

#### 4. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en estos dos experimentos, indican claramente que la región supramamilar del hipotálamo (SuMr) se relaciona con la capacidad de los roedores para solucionar tareas espaciales que requieran la aplicación de una regla de memoria de trabajo. En ambos experimentos hemos hecho uso de una tarea de memoria de trabajo en la que los animales han de aplicar una regla de emparejamiento demorado con un lugar (DMTP). Estas tareas implican demandas representacionales a corto plazo, ya que los sujetos tienen que mantener activa, en su memoria de trabajo, la información que indica la posición del reforzador durante un intervalo breve (30 segundos en nuestros dos experimentos). En esta tarea, la posición del reforzador no se modifica durante una misma sesión, es decir, permanece constante durante el ensayo de muestra y el ensayo de recuerdo. Sin embargo, éste cambia entre las diferentes sesiones en que se organiza el entrenamiento. De este modo, la ejecución de los animales durante el ensayo de recuerdo depende, al menos en parte, de su capacidad para mantener activa la información espacial necesaria para localizar más eficazmente el reforzador en un lugar concreto (en aquel lugar donde se encontraba durante el ensayo de muestra).

Los resultados obtenidos en ambos experimentos son coincidentes, de modo que tanto la lesión electrolítica de la SuMr como la inactivación temporal de la misma, alteran gravemente la capacidad de los animales para recordar la posición del reforzador que previamente se les había mostrado durante el ensayo de muestra (Figuras 28 y 32). De este modo, el déficit observado en ausencia de una SuMr funcional se caracteriza por el aumento del número de errores cometidos así como por el incremento del tiempo que tardan en localizar el reforzador durante el ensayo de recuerdo. Complementariamente, la lesión electrolítica y la inactivación temporal de la SuMr, provoca que tanto el número de errores como el tiempo empleado para la localización del reforzador sean equiparables a los mostrados por los animales durante el ensayo de muestra, momento en el que no disponen de información relevante para poder identificar eficazmente la posición del reforzador en el laberinto. Nuestros resultados son coincidentes con el único trabajo disponible que relaciona la SuMr con la memoria de trabajo (Shahidi y cols, 2004). No obstante, nuestro trabajo amplía los resultados disponibles a tareas secuenciales y administradas en contextos espaciales familiares para los sujetos



experimentales, no hallándose estos resultados influenciados por posibles alteraciones en cuestiones procedimentales (aprendizaje de la regla, componentes motivacionales etc...).

Al menos, existen tres hipótesis que intentan explicar cual es el mecanismo psicológico que subyace al déficit observado en la tarea de memoria de trabajo. Una primera hipótesis sostiene que un aumento de la interferencia proactiva sería la causa de este déficit (Jaffard y cols, 1991; Aggleton y cols, 1995). Una segunda hipótesis, argumenta que el aumento de la tasa de olvido es el mecanismo que podría subyacer a este déficit en la tarea de memoria de trabajo (Beracochea y Jaffard, 1987; Saravis y cols, 1990). Y por último, una tercera hipótesis apoya que la alteración en la codificación de nueva información espacial sería el motivo más probable para observarse esta alteración (Vann y Aggleton, 2003). Nuestro trabajo se ha diseñado principalmente para estudiar la interferencia proactiva como posible mecanismo implicado en el déficit de memoria de trabajo descrito. El tipo de tarea empleada en ambos experimentos es una tarea con una organización secuencial de las sesiones y ensayos de entrenamiento, razón por la cual la información espacial empleada para localizar el reforzador en las sesiones iniciales podría afectar al recuerdo en las sesiones más recientes (interferencia proactiva) (Dunnett, 1990; Santín y cols, 2000). Son numerosos los estudios que sugieren que la región mamilar (en especial los cuerpos mamilares y el núcleo supramamilar), son importantes para mantener diferenciados los episodios temporales (Beracochea y Jaffard, 1987). De acuerdo con esta hipótesis, la lesión permanente o temporal de la SuMr podría resultar en un aumento de la interferencia proactiva y consecuentemente se observaría una grave alteración en la ejecución de tareas de memoria secuenciales, como la empleada en nuestro trabajo. No obstante, algunos estudios indican que no es necesaria la aparición de la interferencia proactiva para que se observen alteraciones amnésicas en sujetos con lesiones de los cuerpos mamilares que engloban la región supramamilar (Santín y cols, 1999; Vann y Aggleton, 2004). De forma similar, los resultados obtenidos en los experimentos 4 y 5 de esta tesis doctoral, indican que las alteraciones observadas en la tarea de memoria de trabajo espacial empleada, no puede explicarse por el aumento de la interferencia proactiva, al menos cuando se usan intervalos cortos entre las sesiones (5 minutos) (Figuras 29 y 33). De este modo, nuestros resultados indican que los déficits observados en la tarea de memoria de trabajo no se deben a la incapacidad de los animales para distinguir entre episodios espaciales diferenciados temporalmente, ya que la interferencia proactiva esperable no se observó.

A pesar de que las otras dos hipótesis (aumento de la tasa de olvido y codificación de nueva información espacial como posibles mecanismos relacionados con la SuMr), no han sido sometidas a comprobación experimental en nuestro trabajo, algunos resultados obtenidos en otros estudios nos permiten discutir brevemente este aspecto. Con respecto a la hipótesis que predice que la memoria de trabajo puede estar influenciada por el aumento de la tasa de olvido de la información espacial, algunos experimentos muestran que ni la inactivación temporal de la zona ventral de la región mamilar ni su lesión permanente, alteran la memoria de trabajo espacial a través de este mecanismo (Shahidi y cols, 2004; Santín y cols, 1999). Por último, a pesar que la tarea de DMTP empleada en nuestro trabajo no requiere el uso de nueva información espacial en cada una de las sesiones de entrenamiento, sí implica la modificación constante de la información espacial disponible para solucionar eficazmente la tarea. De este modo, debido a que la localización del reforzador cambia en cada sesión, una ejecución eficaz en esta tarea requiere que los animales reorganicen continuamente la información espacial durante cada sesión. Es posible que la SuMr resulte necesaria cuando las tareas de memoria de trabajo requieren de una reorganización temporal de la información espacial. Aún cuando esta hipótesis no se ha sometido a contrastación experimental, es posible que nuestros resultados se relacionen con la importancia de esta región diencefálica en este proceso de recodificación y reorganización de la información espacial. En este sentido, Vann y Aggleton (2003) han demostrado la importancia de los cuerpos mamilares para la codificación de la información espacial. No obstante se requieren más estudios que aborden en detalle esta cuestión.

Un aspecto final que debe ser tenido en cuenta, es que a pesar de que nuestro trabajo muestra la importancia de la SuMr en la memoria de trabajo espacial, estos resultados podrían ponerse en tela de juicio debido a la inespecificidad de los tratamientos experimentales empleados. En este sentido, aún cuando la SuMr ha sido objeto de lesión electrolítica y de microinyección de TTX, podría pensarse que la afectación de otros núcleos colindantes o de fibras de paso podría explicar, al menos en parte, los resultados obtenidos en nuestro estudio. De este modo, Santín y cols (1999) y Vann y Aggleton (2003) han demostrado la importancia de la región ventral a la SuMr (los cuerpos mamilares) en la memoria de trabajo espacial, hecho que nos podría hacer pensar en que nuestros resultados se podrían explicar por la alteración de los cuerpos mamilares o del tracto mamilotalámico, y no tanto por la afectación de la SuMr. No obstante, el experimento 4 en el que realizamos lesiones electrolíticas, en ninguno de los

animales se lesionaron los cuerpos mamilares y no se observaron alteraciones del tracto mamilotalámico. Además, debido a la posición de la cánula de administración en el experimento 5, junto con la escasa difusión de los 0.5  $\mu$ l administrados de TTX (500  $\mu$ m) (Woodnorth y McNaughton, 2002), no parece probable que la inactivación inducida por TTX afectara de manera importante a los cuerpos mamilares. De este modo, parece claro que alteraciones similares pueden aparecer con la alteración de los cuerpos mamilares y de la SuMr. Es posible que ambas regiones hipotalámicas contribuyan coordinadamente al mismo tipo de memoria. De hecho, las conexiones neuroanatómicas entre ambos núcleos así como su integración en un sistema más general que incluiría el septum y el hipocampo apoyan esta hipótesis. No obstante, la inclusión de la SuMr en un sistema de memoria más general será tratada en detalle en el último capítulo de esta tesis doctoral.

# VII

## EXPERIMENTO 6

### Respuesta de ansiedad y región supramamilar

## 1. INTRODUCCIÓN.

La ansiedad como reacción emocional ante la percepción de una amenaza o peligro está presente a lo largo de toda la vida, es una reacción normal frente a muchas situaciones estresantes. De hecho, la ansiedad nos hace estar alerta y preparados para enfrentarnos a cualquier situación considerada como aversiva, y en ocasiones nos sirve como protección ante posibles peligros. Sin embargo, este tipo de ansiedad, considerada adaptativa y necesaria para la supervivencia, es muy diferente al miedo y terror intenso que se experimenta cuando se está preso de una crisis de angustia (Carlson, 2002).

Las conductas de miedo/ansiedad parecen tener un carácter general, al menos en la mayoría de los mamíferos, observándose numerosos cambios autonómicos, inmovilidad, conductas evitativas, aumento de respuestas reflejas ante la presentación de estímulos sensoriales (reflejo de sobresalto), hipoalgesia y aumento en la tasa de orina y defecación entre otros (Hurlé, 1997; Rosen y Schulkin, 1998).

Estas reacciones aparecen como resultado de la presentación de diferentes tipos de estímulos, entre los que cabe señalar los estímulos de carácter punitivo, las señales carentes de imagen gratificante, los estímulos novedosos que originan perplejidad, recelo, duda y los estímulos novedosos que producen miedo de forma innata (Graeff y cols, 1996; Ruis y cols, 1999). Sin embargo, no podemos obviar que, junto a los estímulos externos es importante el procesamiento cerebral y cognitivo que se hace de los mismos y que resulta fundamental para dotarlos de contenido emocional (LeDoux, 1999).

Por otro lado, el sistema o sistemas cerebrales que subyacen a la conducta emocional, continúa siendo en la actualidad objeto de intensa investigación. Quizás las regiones cerebrales integrantes del sistema límbico, constituyen las más exhaustivamente estudiadas en este ámbito (Pan y McNaughton, 2004). Entre estas regiones, la región mamilar ha sido menos estudiada que otras como la amígdala o el hipocampo, pero se ha reconocido su participación como parte fundamental del sustrato cerebral de la emoción (Beracochea y Krazem, 1991; Kataoka y cols, 1982). A pesar de esta implicación en las respuestas emocionales, la región mamilar del hipotálamo ha sido tratada preferentemente como una entidad unitaria, existiendo muy pocos trabajos centrados en estudiar la participación de los diferentes subnúcleos de esta región. Además, la mayor parte de trabajos, sobre todo aquellos que optan por el empleo de lesiones permanentes y poco selectivas, tienen la dificultad para establecer una

implicación regional clara en el procesamiento emocional (Célérier y cols, 2004). Algunos estudios más recientes, parecen indicar que la región supramamilar constituye un componente importante en el procesamiento de información con elevado contenido emocional. De este modo, Pan y McNaughton (2002) han sido los primeros en estudiar de forma directa la participación de la región supramamilar en el comportamiento emocional. Así, los animales que presentaban lesiones restringidas de la región SuM, sin afectar a los cuerpos mamilares, mostraron un descenso significativo del miedo contextual, aumento de la exploración de la zona central de un campo abierto así como un incremento de la inhibición conductual en la caja de condicionamiento de tipo skinneriana. Estos resultados indican claramente la importancia de la región SuM en la conducta emocional.

Nuestro trabajo se ha centrado en estudiar el papel de la región supramamilar en la respuesta condicionada e incondicionada de miedo. Para ello, se diseñó un estudio en el que se evaluaron las respuestas de evitación pasiva y de escape, antes y después de la inducción de una lesión electrolítica de la región supramamilar.

## **2. MATERIAL Y MÉTODOS.**

Los animales empleados en este experimento han sido los mismos empleados en el experimento 2 de esta tesis doctoral. De este modo, en este apartado de material y métodos tan sólo se describirán los elementos característicos de este sexto experimento.

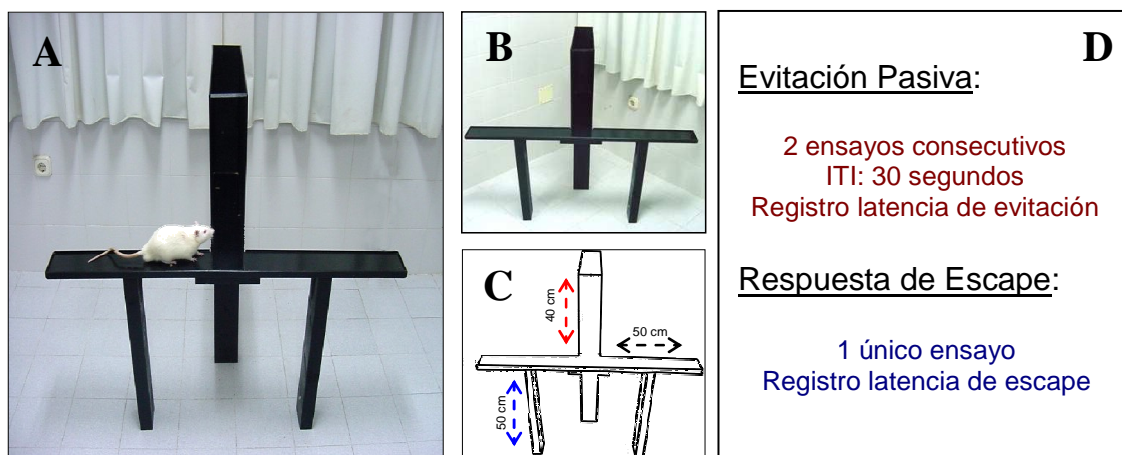
### **A. Aparatos.**

#### *Laberinto elevado en T*

El estudio comportamental se realizó haciendo uso del laberinto elevado en T (Figura 34). Esta prueba constituye una adaptación del laberinto elevado en cruz (Lister, 1987), en el que se ha sellado la entrada a uno de los brazos cerrados. Diseñado por Graeff y cols (1993), es un modelo pensado para medir simultáneamente, pero de forma independiente, la ansiedad incondicionada y condicionada en roedores. Esta prueba se ha empleado para estudiar tanto el efecto diferencial sobre ambas respuestas de algunos psicofármacos, como las bases neuroanatómicas y neuroquímicas de ambas formas de ansiedad (Graeff y cols, 1993; Bueno y cols, 2005).

El laberinto elevado en T fue construido de madera y pintado de color negro, disponiendo de 3 brazos con las siguientes dimensiones: 50 cm de largo y 10 cm. de ancho (50 X 10 cm). El laberinto se encontraba elevado 50 cm sobre el suelo. Uno de

estos brazos estaba delimitado por paredes laterales (40 cm de altura) y se encontraba situado perpendicularmente a los dos brazos abiertos (Figura 34). Los brazos abiertos presentaban un reborde o resalte en su perímetro para evitar que los animales cayeran al suelo si perdían el equilibrio. Las mediciones conductuales se realizaron entre las 17:30 y 18:00.



**Figura 34.** Fotografía que muestra el laberinto elevado en T empleado para el registro de ansiedad condicionada e incondicionada. En A y B se muestra el laberinto empleado, en donde se pueden observar los dos brazos abiertos (1 y 2) y el brazo cerrado (3). En C se muestran las medidas del laberinto y en D se presenta un resumen del protocolo de registro empleado.

## B. Pruebas conductuales.

En una sesión experimental, cada uno de los animales fue expuesto a dos tareas presentadas de forma consecutiva: “tarea de evitación pasiva” y “tarea de escape”. La evitación pasiva constituye una medida del miedo condicionado. Los animales son entrenados en la tarea durante dos ensayos, disponiendo de un intervalo entre los dos ensayos de 30 segundos. Durante el primer ensayo, los animales son depositados en el extremo interno del brazo cerrado y se registra el tiempo que tarda en abandonar el brazo y exponerse a los brazos abiertos (latencia de evitación). Una vez que el animal abandona el brazo cerrado y se encuentra con las cuatro patas en uno de los brazos abiertos (o permanece alojado en el brazo cerrado durante 120 segundos), es recogido por el experimentador y depositado en su jaula. Transcurridos 30 segundos, el animal se sitúa nuevamente en el extremo interno del brazo cerrado y se evalúa el tiempo que tarda en abandonar el brazo cerrado. La ejecución de los roedores durante el segundo ensayo depende de la experiencia previa durante el primer ensayo, de modo que una

valoración negativa de la situación provocará un aumento de la conducta de evitación pasiva durante la segunda exposición a la tarea, constituyendo una medida de miedo condicionado (Graeff y cols, 1998; Rioja y cols, 2004; 2006).

Una vez que habían transcurrido 30 segundos después del último ensayo de evitación pasiva, el animal se introducía de nuevo en el laberinto pero esta vez se situaba en el extremo distal de uno de los dos brazos abiertos, registrándose el tiempo que el animal tardaba en entrar con las cuatro patas en el brazo cerrado (latencia de escape) o había permanecido explorando el brazo abierto durante 120 segundos. Esta tarea constituye una medida del miedo incondicionado de los roedores (Graeff y cols, 1998).

### C. Diseño experimental y análisis de datos.

La conducta de evitación pasiva y la de escape se analizaron de forma independiente. Con respecto a la conducta de evitación pasiva, se empleó un diseño factorial mixto 2 x 2 x 2 con una variable entresujetos “grupo” con dos niveles (grupo lesionado y grupo pseudolesionado), y dos variables intrasujetos: “ejecución antes y después de la intervención quirúrgica”, con dos niveles (precirugía y postcirugía) y “tipo de ensayo” con dos niveles (primer y segundo ensayo de evitación). El análisis estadístico aplicado a los datos obtenidos fue un ANOVA de medidas repetidas y pruebas de significación estadística a posteriori (diferencia mínimamente significativa de Fisher (LSD)).

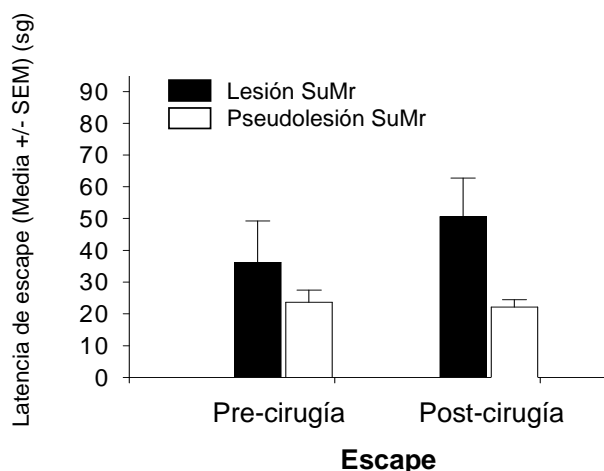
Con respecto a la conducta de escape, se empleó un diseño factorial mixto 2 x 2 con una variable entresujetos “grupo” con dos niveles (grupo lesionado y grupo pseudolesionado), y una variable intrasujetos: “ejecución antes y después de la intervención quirúrgica”, con dos niveles (precirugía y postcirugía). El análisis estadístico aplicado a los datos obtenidos fue un ANOVA de medidas repetidas.

## 3. RESULTADOS

El análisis estadístico realizado en la tarea de escape reveló que los animales del grupo con lesión de la SuMr mostraban latencias de escape mayores que los animales del grupo con pseudolesión ( $F_{(1,16)} = 4.879$ ;  $p \leq 0.042$ ), sin observarse diferencias entre la ejecución mostrada pre y post operatoriamente ( $F_{(1,16)} = 0.713$ ;  $p \geq 0.401$ ). Asimismo,

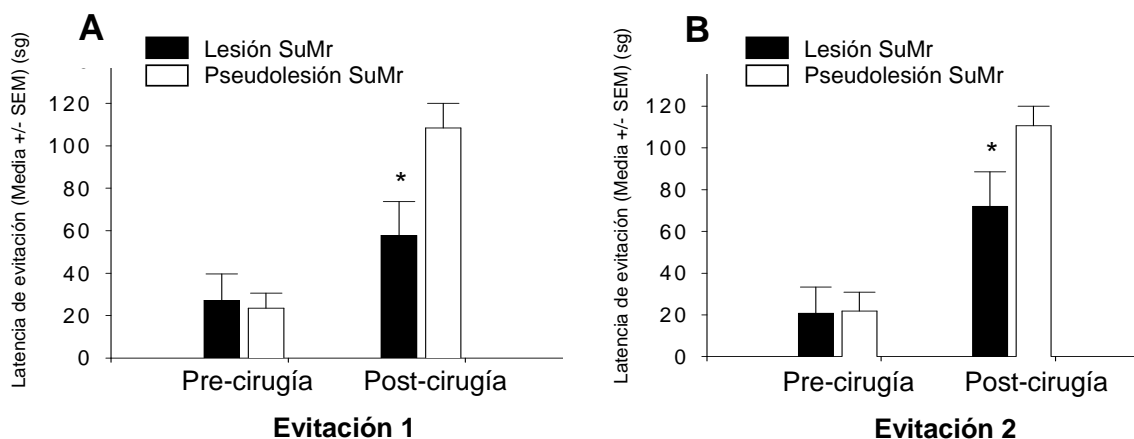


no se observó una interacción estadísticamente significativa entre ambas variables ( $p \geq 0.05$ ) (Figura 35).



**Figura 35.** Representación gráfica de la ejecución de los dos grupos durante el ensayo de escape en el laberinto elevado en T. Los resultados muestran que los animales del grupo pseudolesionado tardan menos que los animales del grupo con lesión en escapar del brazo abierto. No obstante, esta ejecución diferencial se mantiene constante en ambos ensayo ya que no se observaron diferencias en la ejecución pre y post-operatoria.

En relación a la conducta de evitación pasiva, los resultados mostraron que los dos grupos tuvieron un comportamiento diferente en la realización de la tarea ( $F_{(1,16)} = 7.559$ ;  $p \leq 0.014$ ). Además, los animales de ambos grupos, presentaban una ejecución diferente antes y después de la intervención quirúrgica, observándose un aumento del tiempo que tardaron en abandonar el brazo cerrado ( $F_{(1,16)} = 58.612$ ;  $p \leq 0.000$ ). Las comparaciones post-hoc indicaron que el grupo de animales que recibieron la lesión en la SuMr pasaban menos tiempo después de la cirugía en el interior del brazo cerrado, que los animales del grupo control durante los dos ensayos de evitación ( $p \leq 0.05$ ), efecto no observado antes de la intervención quirúrgica ( $p \geq 0.05$ ). (Figura 36).



**Figura 36.** Representación gráfica en donde se muestra la ejecución de los dos grupos de animales empleados en nuestro estudio, durante la tarea de evitación pasiva en el laberinto elevado en T. Antes de la intervención quirúrgica todos los animales experimentales tardaban el mismo tiempo en abandonar el brazo cerrado. Sin embargo, después de la intervención quirúrgica, los animales con lesiones de la SuMr tardaron menos tiempo en abandonar el brazo cerrado, indicando que éstos se encontraban menos ansiosos que los animales del grupo control. Este efecto fue observado tanto durante el primer ensayo de evitación (A) como durante el segundo ensayo (B). (\*  $p < 0.05$ ).

#### 4. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo indican que la intervención quirúrgica practicada en los animales provoca un aumento del comportamiento ansiogénico en el laberinto elevado en T, y que la lesión de la SuMr reduce parcialmente este incremento de la ansiedad (Figura 36). El laberinto elevado en T, constituye un modelo animal de ansiedad en el que se pueden disociar dos tipos de conductas de ansiedad: la evitación pasiva y la respuesta de escape (Graeff y cols, 1998; Phineiro y cols, 2007). La conducta de escape en este laberinto indica el grado de exploración del brazo abierto de los animales, y dependiendo del grado de ansiedad de éstos explorarán más este brazo o escaparán para alojarse en el brazo cerrado. No obstante, el empleo de diferentes agentes farmacológicos con propiedades ansiolíticas, no han sido capaces de alterar esta conducta, indicando la elevada resistencia de la respuesta de escape a los tratamientos psicofarmacológicos con propiedades ansiolíticas (Graeff y cols, 1998; Viana y cols, 1994; Bueno y cols, 2005). La tarea de evitación pasiva, evalúa el grado de evitación del brazo abierto y el tiempo que los animales permanecen en el brazo cerrado. Esta conducta depende del grado de ansiedad de los animales, de tal modo que un aumento de la ansiedad incrementa la conducta evitativa

mientras que una reducción de la ansiedad se relaciona con una reducción de la conducta evitativa (Viana y cols, 1994; Zangrossi y Graeff, 1997).

En nuestro estudio, tan sólo la tarea de evitación pasiva refleja que la lesión de la SuMr facilita la aparición de conductas relacionadas con una disminución de la ansiedad. De este modo, aunque durante la tarea de escape se observa una diferencia estadísticamente significativa entre los dos grupos, estas diferencias son pre y postoperatorias, indicando que la diferente respuesta de escape a nivel preoperatorio, podría explicar la diferencia observada postoperatoriamente (Figura 35). No obstante, es conveniente mencionar que la lesión electrolítica practicada no afectó a la actividad locomotora, ya que no se observaron diferencias significativas entre los registros pre y postoperatorios. Sin embargo, la lesión de la SuMr reduce parcialmente el incremento del tiempo que los animales pasan en el brazo cerrado (evitación pasiva), indicando que esta región se relaciona claramente con el control de la respuesta de evitación, pero no es la única región importante en su regulación, ya que de otro modo, su lesión hubiera impedido el incremento de la evitación pasiva inducida por el proceso operatorio (Figura 36). Es conveniente mencionar, que en nuestro estudio no observamos una afectación diferencial de los dos ensayos de evitación, indicando que la SuMr modula de forma general la conducta de evitación pasiva, independientemente de los elementos asociativos de la misma, presentes sólo en el segundo ensayo de evitación (Viana y cols, 1994; Graeff y cols, 1998; Bueno y cols, 2005).

En general, nuestros resultados indican que la SuMr desempeña un papel importante en la regulación de la conducta emocional. En la actualidad, aún se desconoce el papel preciso que la SuMr tiene en la emoción, no obstante nuestros datos parecen indicar que la lesión de la SuMr podría afectar a la valencia emocional que tienen los estímulos ambientales, provocando una reducción de las latencias para abandonar el brazo cerrado (reducción del tiempo o latencia de evitación) (Figura 36). No obstante, nuestros resultados también pueden deberse a una disminución de la inhibición conductual o a un aumento de la hiperactividad inducida por la lesión de la SuMr. En apoyo a esta teoría, se ha descrito que la lesión de la SuMr (Pan y McNaughton, 2002) y la administración de clordiacepóxido (agonista de los receptores GABAa) (Woodnorth y McNaughton, 2002) provocan hiperactividad en tareas operantes, aumentando la tasa de presión de palanca. Además, la lesión de núcleos y tractos cercanos a la región SuMr se han asociado con la aparición de hiperactividad

(Santacana y cols, 1972; Field y cols, 1977). Nuestro experimento no se encuentra diseñado para estudiar este fenómeno y por tanto no podemos garantizar que nuestros resultados no se encuentren relacionados con un incremento de la actividad motora o con la reducción de la ansiedad en la tarea de evitación pasiva. No obstante, parece lógico pensar que si el aumento de la actividad locomotora fuera la causa de la disminución de la evitación pasiva, también debería de haberse observado un aumento de la exploración del brazo abierto, efecto no observado en nuestro trabajo. Además, los resultados obtenidos en los experimentos de memoria de referencia y de trabajo espacial también sugieren que la afectación de la respuesta de evitación no se atribuye a la hiperactividad. En este sentido, las latencias de escape registradas postoperatoriamente en ambas tareas de memoria no se vieron alteradas diferencialmente por la lesión de la SuMr.

Por otro lado, algunos estudios indican la relevancia de esta región diencefálica en el procesamiento de la información emocional. De este modo, se ha observado un aumento en la inmunorreactividad de la proteína c-Fos en el núcleo SuM cuando los animales son expuestos a tareas de miedo incondicionado (Silveira y cols, 1993; Wirstshafter y cols, 1998) y miedo condicionado (Beck y Fibiger, 1995). Más recientemente, Pan y McNaughton (2002) observaron que la lesión neurotóxica del SuM y regiones circundantes reduce la aparición de conductas indicativas de ansiedad en el campo abierto y en tareas en condicionamiento de miedo. Basándose en la información disponible, Pan y McNaughton (2002) han propuesto una hipótesis que puede ayudarnos a explicar cuál es el mecanismo neurofisiológico que subyace al deterioro de la evitación pasiva después de la lesión de la SuMr observada en el laberinto elevado en T. De este modo, sugieren que el SuM constituye un puente funcional entre el hipocampo y la amígdala creando un camino de interacción cognitivo-emocional, siendo la región septal un elemento importante en esta regulación. En el próximo capítulo, se abordará en mayor detalle esta cuestión.

# VIII

## EXPERIMENTO 7

**Expresión de la proteína c-Fos asociada a la  
inactivación temporal de la región supramamilar**

## 1. INTRODUCCIÓN.

En los capítulos anteriores de esta tesis doctoral, hemos demostrado la importancia de la región supramamilar del hipotálamo en la memoria espacial y en la expresión de conductas emocionales, como la respuesta de evitación pasiva. No obstante, nada hemos dicho acerca de los mecanismos moduladores del núcleo supramamilar en la memoria espacial y la respuesta de ansiedad, siendo un aspecto que abordaremos a lo largo de este experimento. Teniendo en cuenta la conectividad que mantiene este núcleo con otras regiones cerebrales (Figura 3, capítulo 2), se podría sugerir que el SuM modula la memoria espacial y la respuesta de ansiedad a través de la densa red de conexiones que mantiene con regiones como el septum y el hipocampo. Las fibras eferentes del SuM se originan principalmente en las porciones laterales del núcleo y se distribuyen densamente hacia el septum medial y la banda diagonal de Broca (MS/DB). El SuM establece sinapsis excitatorias tanto con neuronas GABAérgicas como colinérgicas en la MS/DB, siendo glutamatérgicas un subconjunto importante de estas proyecciones excitatorias (Leranth y Kiss, 1996; Borhegyi y Freund, 1998; Gonzalo-Ruiz y cols, 1999). Estas sinapsis excitatorias se localizan en aquellas neuronas septales que a su vez proyectan al hipocampo (Kiss y cols, 2000). Las proyecciones desde MS/DB al SuM proceden de un conjunto de neuronas localizadas lateralmente a la línea media (Leranth y cols, 1999).

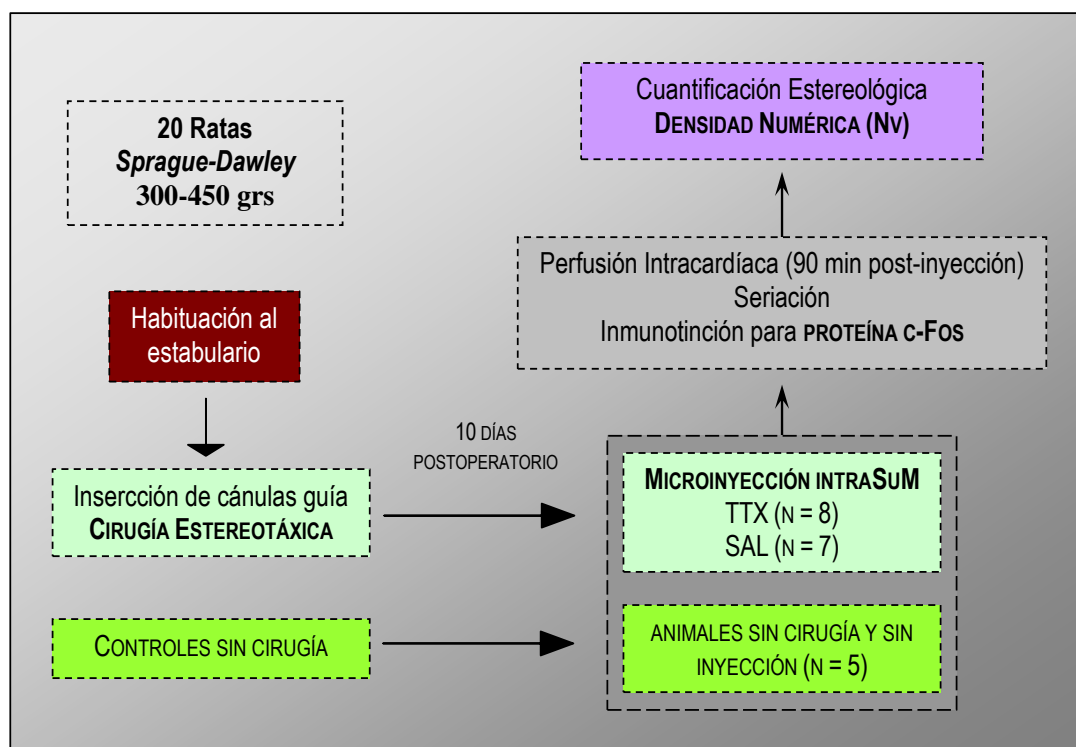
Por otro lado, las proyecciones del SuM hacia el hipocampo se originan principalmente en los dos tercios laterales del SuM (Vertes y kocsis, 1997) innervando el giro dentado y la región CA<sub>2</sub>/CA<sub>3</sub> del cuerno de Ammón en el hipocampo dorsal (Haglund y cols, 1984; Nitsch y Leranth, 1994). En concreto, estas proyecciones hipocampales del SuM finalizan en la capa granular del giro dentado y en el stratum oriens y piramidal de la región CA<sub>2</sub>/CA<sub>3</sub>, tanto en células principales (granulares y piramidales) como GABAérgicas (Kiss y cols, 2000). Estas proyecciones directas de las neuronas del SuM, son de tipo excitatorio, siendo el glutamato el neurotransmisor mayoritariamente empleado en esta vía (Kiss y cols, 2000). Además, el SuM recibe aferencias del hipocampo, aunque son de menor importancia (Pan y McNaughton, 2004). De este modo, el patrón de proyecciones que presenta el SuM, permite pensar que pueda modular la función hipocampal de dos modos: de forma directa a través de sus proyecciones hipocampales y de forma indirecta, a través del área septal medial/DB (Kiss y cols, 2002). En este sentido, Vertes y McKenna (2000) han demostrado la

existencia de un subconjunto de neuronas SuM con proyecciones colaterales al septum medial y al hipocampo, lo que indica la capacidad de estas neuronas para modular funcionalmente ambas regiones al mismo tiempo.

No sólo la existencia de estas conexiones indica que el SuM puede influir sobre la memoria espacial y la conducta emocional modulando la actividad funcional de estas regiones. Es más, hay evidencia que indica que la alteración funcional del SuM afecta a las propiedades neurofisiológicas del hipocampo. Es ampliamente conocido que una de las propiedades neurofisiológicas de las neuronas hipocampales es la presencia del ritmo theta, una banda de frecuencia que oscila entre los 4 y los 8 Hz (Pan y McNaughton, 2004). Este ritmo theta no es una propiedad intrínseca de las neuronas hipocampales, sino que se encuentra bajo el control de un marcapasos, localizado en el área septal medial (Pan y McNaughton, 2004). En los últimos años, junto con la importancia del septum medial, se ha observado que el SuM constituye un eslabón crucial en la modulación/generación de este ritmo en el hipocampo, probablemente modulando la actividad del septum medial (Vertes y Kocsis, 1997; Kirk, 1998).

De este modo, en este último capítulo nos planteamos estudiar como afecta la inactivación, mediante TTX, de la región supramamilar del hipotálamo en la actividad funcional del septum medial/DB y de la región CA<sub>3</sub> del hipocampo. Para ello, hemos diseñado un experimento en el que se estudia la inmunorreactividad de la proteína c-Fos en el área septal medial y en la región CA<sub>3</sub> del hipocampo (que recibe proyecciones tanto directas del SuM como indirectas a través del septum medial/DB). Esta proteína es el producto del gen de expresión inmediata denominado *c-fos*. Este gen es estimulado por numerosos eventos como es el aumento del calcio intracelular, la activación celular a través de numerosos neurotransmisores como los aminoácidos excitatorios (glutamato/aspartato), estimulación eléctrica, la conducta, etc... (Rose, 1991; Nicolaev y cols, 1992) y constituye una medida bien validada de actividad celular (kaczmarek, 1993; Santín y cols, 2003). En nuestro trabajo, hemos seleccionado la determinación por inmunohistoquímica del producto proteínico del gen *c-fos*, denominado proteína c-Fos, cuyo pico de acumulación en el núcleo celular se produce entre los 60 y los 120 minutos después de la estimulación (Silveira y cols, 1993, Wirtshafter y cols, 1998; Santín y cols, 2003). Además, la cuantificación de la inmunorreactividad de la proteína c-Fos en el septum medial/DB y en la región CA<sub>3</sub> del hipocampo se realizó empleando una aproximación estereológica. La cuantificación estereológica permite obtener estimaciones insesgadas de parámetros cuantitativos, como la densidad numérica (Nv)

que emplearemos en este último estudio (véase la Figura 37 en donde aparece un esquema del diseño experimental empleado).



**Figura 37.** Esquema que representa el diseño experimental empleado para estudiar la actividad del núcleo septal medial y la región CA<sub>3</sub> del hipocampo en condiciones de inactivación funcional de la región supramamilar.

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS.

### A. Animales.

Para desarrollar este estudio se usaron 20 ratas macho *Sprague-Dawley*, con pesos iniciales de 300-450 grs. Todos los animales fueron suministrados por el centro de cría de animales de experimentación CRIFFA S.A. (Barcelona, España).

Las condiciones de estabulación y mantenimiento de los animales experimentales fueron las mismas que las empleadas para el desarrollo del experimento 1 (véase apartado 2º (A), página 36 de este trabajo).

Los animales se dividieron aleatoriamente en tres grupos:

1. Grupo control (n = 5): los animales pertenecientes a este grupo no fueron sometidos a ningún tipo de tratamiento, permaneciendo en sus jaulas hasta el momento de la perfusión vascular.



2. Grupo Salino (SAL) (n = 7): los animales de este grupo fueron sometidos a un proceso quirúrgico con implantación de cánulas guía a nivel de la SuMr y posteriormente se les administró 0,5 µl de solución salina al 0,9%.
3. Grupo Tetradoxina (TTX) (n = 8): los animales se sometieron a la implantación estereotáxica de cánulas guía en la SuMr y posteriormente se les administró TTX (5 ng en 0,5 µl de solución salina al 0,9%).

### **B. Cirugía estereotáxica y Microinyecciones de TTX.**

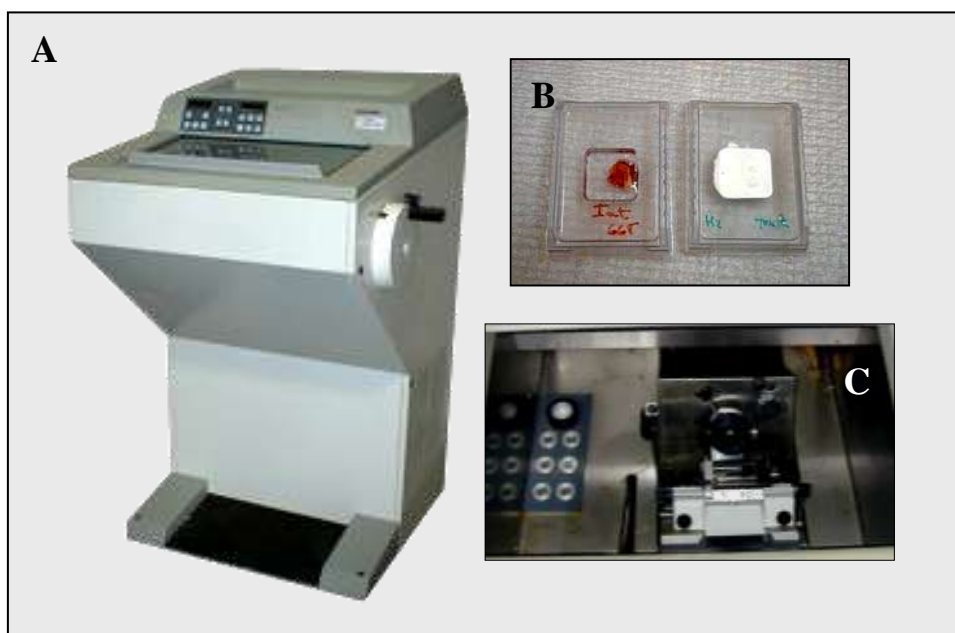
La cirugía estereotáxica y la microinyección de TTX se realizaron del mismo modo al descrito en el experimento 3 del capítulo V.

### **C. Perfusión vascular, seriación del tejido y tinción inmunohistoquímica.**

Todos los animales fueron anestesiados (equitexina 3-4 ml/kg i.p.) 90 minutos después de finalizar la microinyección de TTX o solución salina. A continuación, se procedió con la perfusión de los animales a través de la arteria aorta, primero, con una solución de lavado (tampón fosfato salino (PBS) 0,1 M, pH 7,4) durante 10 minutos y después, con una solución fijadora (paraformaldehído al 4% en PBS 0,1 M, pH 7,4) durante 15 minutos (Figura 39). El bombeo del tampón de lavado y la solución fijadora se realizó a través de cánulas conectadas a una bomba de perfusión (S2-MINI-ALITEA, AB, Suecia). Transcurrido el tiempo de fijación, se extrajo el cerebro y se postfijó durante 24 h en el mismo fijador que se había utilizado previamente para la perfusión. Una vez transcurrido este tiempo, los cerebros se sumergieron en una solución de sacarosa (Panreac Química, S.A., Madrid, España) al 30% en PBS 0,1 M, pH 7,4, para proteger el tejido durante la congelación. Se realizaron 3 cambios de la solución durante tres días consecutivos, manteniéndose a una temperatura constante de 4 °C. La inclusión se realizó colocando la pieza de tejido sobre la placa de corte y cubriéndola poco a poco con una solución viscosa crioprotectora (Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound; Sakura Finetek Japan Co., Japón) (Figura 38, B). A continuación se prosiguió con la congelación en isopentano enfriado con hielo seco. Este tejido permaneció almacenado a una temperatura de -70 °C hasta su seriación. La obtención de secciones histológicas se realizó en un criostato (Microm HM 500. Walldorf. Alemania) (Figura 38A), mediante el que se obtuvieron cortes de 30 µm de grosor, que fueron depositados en eppendorfs con solución de *Hoffman* (Figura 39) y se mantuvieron almacenados a -20 °C hasta que se emplearon para la inmunotinción. Se obtuvieron cuatro series de tejido,

encontrándose representada en cada una de las series, el total del área septal y del hipocampo dorsal (distancia entre secciones en cada una de las series 180  $\mu\text{m}$ ) y obteniéndose un número aproximado de 5-6 secciones conteniendo el área septal medial y de 8-10 secciones que contenían el hipocampo dorsal. El primer corte se realizó de forma aleatoria, y a partir de éste se tomaron cortes cada 180 micrómetros empleando un muestreo sistemático.

Una de las series se usó para la inmunotinción y otra se empleó para realizar una tinción clásica, azul de toluidina (véase el apartado 2º (D) del experimento 2 del capítulo V, página 57 de este trabajo) con el fin de localizar la posición de la cánula.



**Figura 38.** Fotografías que muestran el criostato empleado para realizar la seriación del tejido cerebral (A), el uso de OCT para crioproteger el tejido (B) y la cámara fría del criostato donde se obtuvieron los cortes seriados del área septal y del hipocampo.

La inmunotinción de las secciones obtenidas en cada uno de los animales, se realizó en flotación aplicando el siguiente protocolo:

- Tres lavados de las secciones en PBS 0,01 M, pH 7,4 (Figura 39) durante 10 minutos en agitación y temperatura ambiente.
- Desactivación de la peroxidasa endógena con una solución de PBS 0,01 M, pH 7.4 que contenía peróxido de hidrógeno al 0,6%, durante 30 minutos en oscuridad.
- Lavado (tres pasos de 10 minutos) en PBS 0,01 M, pH 7,4.

- Lavado de las secciones durante 10 minutos en una solución que contenía PBS 0,01 M, pH 7,4, suero normal de carnero al 1% para bloquear uniones inespecíficas y Tritón X-100 al 0.3% para permeabilizar las membranas celulares y facilitar la penetración del anticuerpo (solución de incubación).
- Incubación con el anticuerpo primario (anti-c-Fos (Santa Cruz biotechnology Inc., CL, USA; 1/5000)) diluido en la solución de incubación, durante 12-18 h en nevera a 4 °C. Éste es un anticuerpo policlonal obtenido en conejo y que reconoce los aminoácidos 3-16 de la región N-Terminal de la proteína c-Fos humana p62.
- Lavado (tres pasos de 10 minutos) en PBS 0,01 M, pH 7,4.
- Lavado en solución de incubación (1 lavado de 10 minutos)
- Incubación con el anticuerpo secundario conjugado con biotina (anti IgG de conejo a dilución 1/200), diluido en la solución de incubación durante 1 h a temperatura ambiente.
- Lavado (tres pasos de 10 minutos) en PBS 0,01 M, pH 7,4.
- Lavado en solución de incubación (1 lavado de 10 minutos)
- Incubación con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (sistema ABC, Vector Laboratorios), diluido en la solución de incubación durante 1 hora, a temperatura ambiente.
- Lavado (tres pasos de 10 minutos) en PBS 0,01 M pH 7,4.
- Revelado con tetrahidrocloruro de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) (Sigma-Aldrich, Madrid, España) al 0,05 %, en PBS 0,01 M, pH 7,4 y NiCl<sub>2</sub> al 0,04% (Sigma-Aldrich, Madrid, España) durante 5 minutos aproximadamente, en oscuridad.
- Lavado exhaustivo en agua destilada.
- Contraintinción con rojo neutro (Figura 39).
- Lavado en abundante agua destilada.
- Deshidratación de los cortes y aclarado por inmersión en pasos sucesivos de alcoholes, de gradación creciente [70 % (v/v), 5 minutos; 96 % (v/v), 2 x 5 minutos; 100 % (v/v), 2 x 10 minutos] y xileno (2 x 10 minutos).
- Montaje con DPX (Sigma-Aldrich).

Durante el procedimiento inmunohistoquímico se emplearon 2 secciones en las que no se añadió el anticuerpo primario, y que nos sirvieron de control de la especificidad del anticuerpo empleado.

Las secciones empleadas para localizar la posición de la cánula se trataron del mismo modo al descrito en el apartado 2(E) del experimento 3 del capítulo V, página 69 de este trabajo.

**(A) TAMPÓN FOSFATO 0,4 M Ph 7.4**

1. Hacer solución B: 0.4M, pH 7.4 ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 48gr/L)
2. Hacer solución A: 0.4 M, pH 7.4 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 35,6 gr/L)
3. Mezclar solución A sobre solución B hasta alcanzar pH 7.4 .
4. Añadir ázida sódica al 0.02%.

**PBS 0,1 M Ph 7.4 (para perfusión)**

250 ml de PB 0,4 M, pH 7,4  
9 gr NaCl  
Llevar hasta 1 Litro con  $\text{H}_2\text{O}$  destilada

**PBS 0,1 M Ph 7.4 (para inmuno)**

25 ml de PB 0,4 M, pH 7,4  
9 gr NaCl  
Llevar hasta 1 Litro con  $\text{H}_2\text{O}$  destilada

**(B) PARAFORMALDEHÍDO AL 4%**

Paraformaldehído (Merck)	4 g
Tampón PB 0,2 M, pH 7,4	50 ml
Agua destilada	hasta 100 ml

**(C) SOLUCIÓN HOFFMAN**

250 ml PB 0,4M  
300 ml Etilenglicol  
300 gr Sacarosa  
10 gr Polivinilpirrolidona  
9 gr ClNa  
Llevar hasta 1 L con  $\text{H}_2\text{O}$  destilada

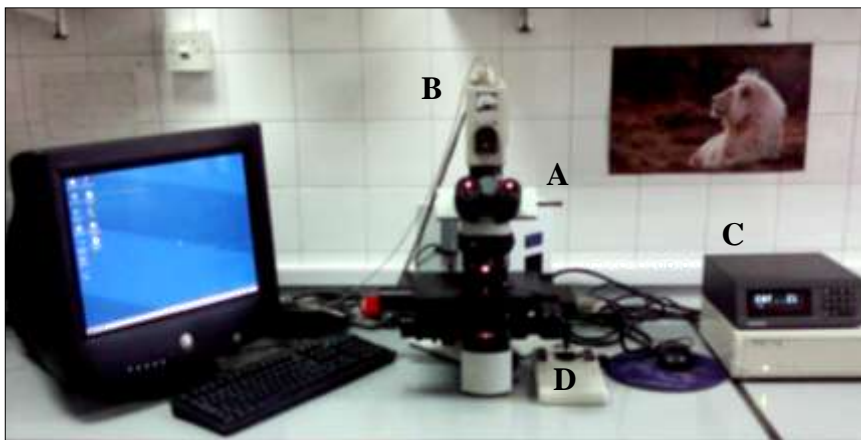
**Figura 39.** Esquemas que indican la preparación de PBS (A), solución fijadora con paraformaldehído (B) y solución de Hoffman (C).

#### D. Cuantificación estereológica.

Para estimar el número de núcleos neuronales c-Fos positivos en el MS/DB y la región CA<sub>3</sub> del hipocampo, se recurrió a la aplicación de procedimientos estereológicos. La estereología como disciplina, está conformada por un conjunto de métodos útiles

para obtener información cuantitativa de carácter geométrico-estadístico de un objeto de interés, a partir de secciones del objeto (Haug, 1986; Cruz-Orive y Weibel, 1990).

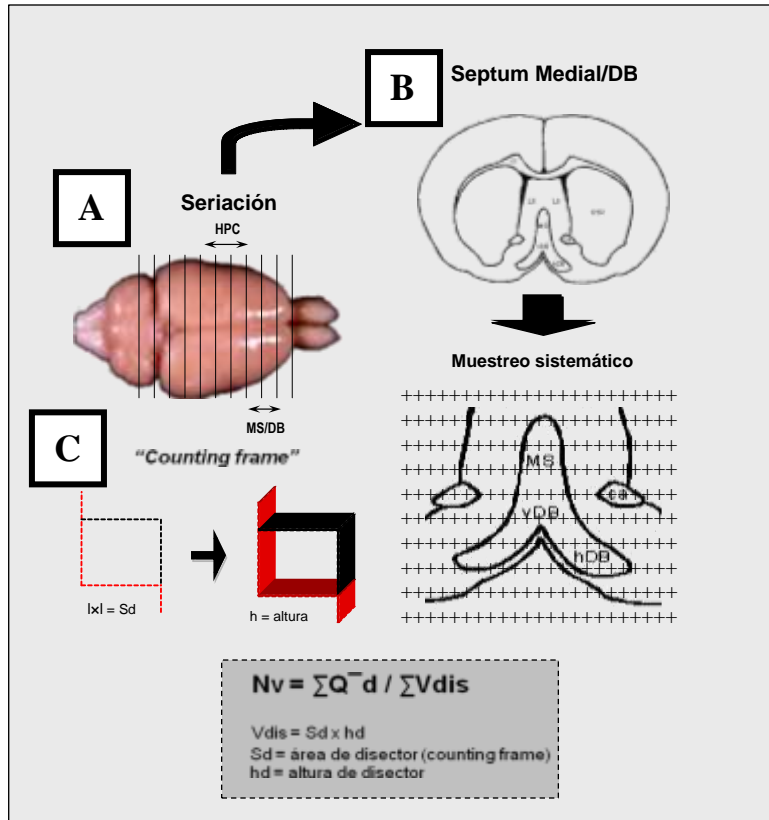
Una vez obtenidas las preparaciones objeto de estudio, se procedió con la cuantificación utilizando un microscopio Olympus BX-51 con pletina monitorizada y conectado a un interfaz computerizado, que controla un microcator MT12 (sensor electrónico de posición en Z de alta sensibilidad y precisión para sistema CAST), que dirige los movimientos en el eje Z. El software de análisis (CAST GRID. Olympus. Dinamarca) nos permitió realizar un muestreo aleatorio dentro de cada área seleccionada mediante disectores de  $1885 \mu\text{m}^2$  y  $20 \mu\text{m}$  de grosor. De este modo, multiplicando el área del disector por su altura, obtenemos el volumen de cada disector. Multiplicando este volumen por el número de disectores empleados, se obtuvo el volumen de referencia. Una vez que se disponía del volumen de referencia, el número total de núcleos neuronales c-Fos positivos contados en todos los disectores, se dividió entre el volumen total de referencia, obteniendo de este modo el número de células c-Fos positivas por unidad de volumen ( $N_v$ ) (Figura 41).



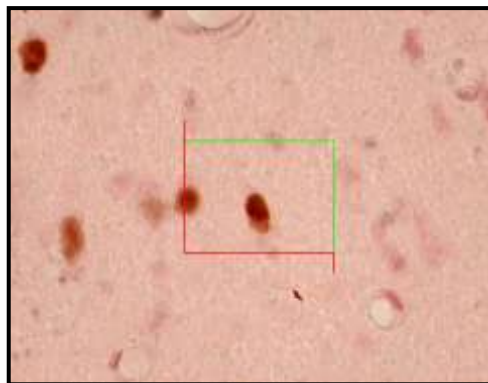
**Figura 40.** Equipo empleado para la cuantificación estereológica. (A) Microscopio Olympus BX-51. (B) Cámara de vídeo con conexión a un PC que dispone del sistema informático CAST GRID (Olympus) para cuantificación estereológica. (C) Microcator MT12 para monitorizar el eje "z". (D) Pletina monitorizada y unidad de control de la misma.

Para llevar a cabo la cuantificación, se delineó la región MS/DB y la capa CA<sub>3</sub> del hipocampo dorsal usando el objetivo de 4x/10x (siguiendo las coordenadas del atlas de Paxinos y Watson, 1998 (desde 1.20 mm hasta 0,20 mm para MS/DB y desde -1,6 mm a -3,3 mm para CA<sub>3</sub>)). Dentro de la región seleccionada, usando el objetivo de inmersión de 100x, el programa informático creó de forma aleatoria los disectores de muestreo, sobre los que se contó el número de núcleos neuronales inmunorreactivos

para la proteína c-Fos. La cuantificación en cada uno de los disectores se realizó contando únicamente los núcleos c-Fos positivos que caían dentro del disector o tocaban la línea superior y lateral derecha, descartándose aquellos núcleos que se encontraban fuera del disector o tocaban la línea inferior y lateral izquierda (línea maldita) (Figura 41).



**Figura 41.** Esquema que muestra el proceso de cuantificación estereológica empleado para la cuantificación de los núcleos neuronales c-Fos positivos. En la figura A aparece una vista dorsal del cerebro de rata, en el que se superponen una serie de líneas perpendiculares a la línea media y que representan la seriación sistemática. En la figura B, se muestra un esquema del área septal medial/DB en posición coronal, así como la superposición de los disectores de muestreo en los que se realizaría la cuantificación estereológica en área delimitada. En la figura C se muestra la forma de un disector o ventana de cuantificación representada tridimensionalmente (nótese la presencia del eje z (h en la imagen)). El disector dispone de una línea roja, denominada línea maldita, y que cualquier partícula que impacte con ella no será tomada en cuenta en la estimación. Sin embargo, aquellas que aún no estando dentro del disector, impacten con la línea negra, serán tomadas en cuenta. En la parte inferior, se muestra la fórmula empleada para la obtención del número de núcleos c-Fos positivos por unidad de volumen ( $N_v$ ).



**Figura 42.** La figura muestra un campo seleccionado para realizar la disección óptica. El procedimiento comienza con la localización del primer plano de enfoque y a continuación se procede con la localización del primer plano focal en el que se realizará la cuantificación. En la imagen se representan 6 planos de enfoque consecutivos contenido por debajo de la superficie superior y la inferior. La distancia entre los planos de enfoque es de  $2\ \mu\text{m}$  en una sección cuyo grosor total es de  $15\ \mu\text{m}$ . Entre  $-5\ \mu\text{m}$  y  $-15\ \mu\text{m}$ , se superpone un "counting frame" al campo observado al microscopio óptico. Este "counting frame" se empleará para contar el número de núcleos c-Fos positivos a través de  $10\ \mu\text{m}$  (h). Se contarán aquellos núcleos c-Fos positivos que se encuentren dentro del "counting frame" y/o que impacte con la línea verde. Sin embargo aquellos núcleos c-Fos positivos que se encuentren fuera del "counting frame" y/o impacten con la línea roja (línea maldita) se excluyen del conteo (Barra =  $40\ \mu\text{m}$ ).

### E. Análisis de datos.

En este último experimento empleamos un diseño completamente aleatorizado, con asignación de cada una de las unidades experimentales al azar a tres grupos de tratamiento (grupo control, grupo con administración de solución salina (SAL) y grupo con administración de TTX (grupo TTX)).

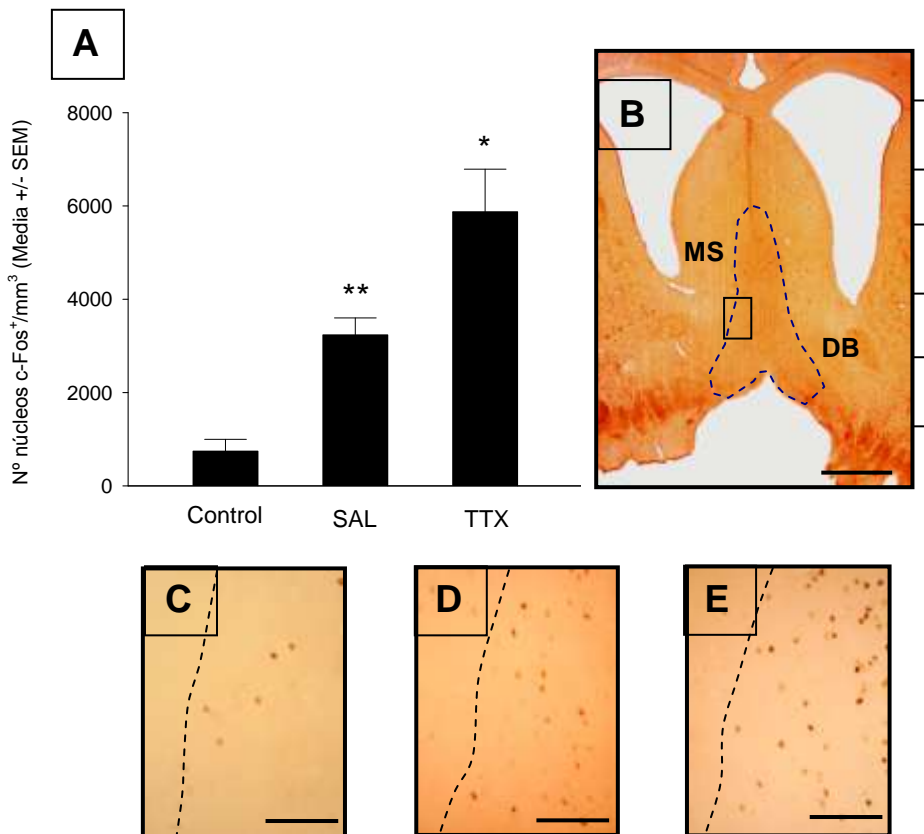
El número de núcleos neuronales c-Fos inmunorreactivos estimados en la MS/DB y en la región CA<sub>3</sub> del hipocampo se analizaron mediante un análisis de la varianza (ANOVA) de una vía, seguido de una prueba de significación estadística a posteriori (diferencia honestamente significativa para grupos desiguales (HSD)). Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa STATISTICA versión 7.0.

### 3. RESULTADOS.

El estudio de las preparaciones histológicas, mostró que uno de los animales que recibieron microinyecciones de la solución salina y 2 animales que había sido microinyectados con TTX, la cánula se encontraba alejada más de  $500\ \mu\text{m}$  de la región supramamilar. Para los análisis sobre los efectos de la inactivación de la SuMr sobre la inmunorreactividad c-Fos en la MS/DB y en la región CA<sub>3</sub> del hipocampo dorsal, se

emplearon un total de 5 ratas controles, 6 ratas microinyectadas con una solución salina y 6 ratas microinyectadas con TTX.

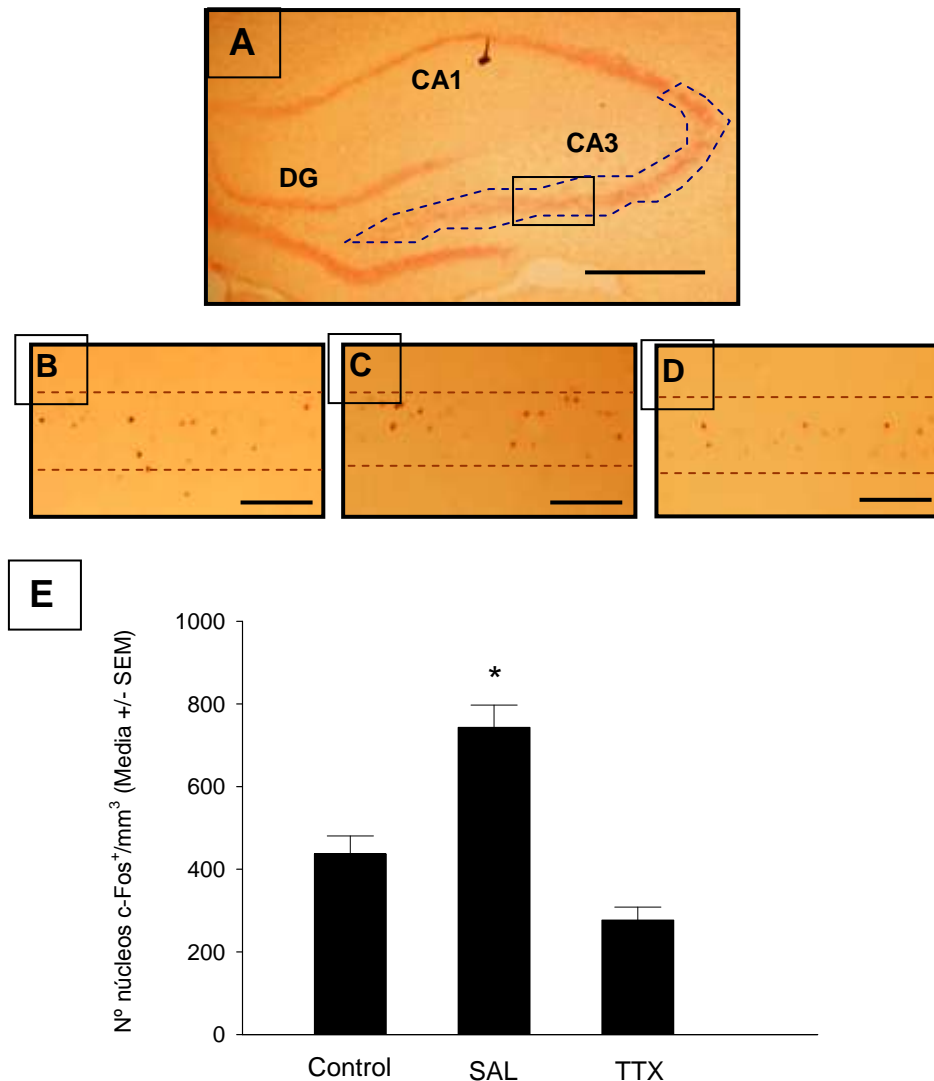
Los resultados obtenidos indicaron que la mera microinyección de una solución salina en la SuMr era capaz de inducir un aumento de la expresión de la proteína c-Fos en la región MS/DB. No obstante, la inactivación de la SuMr mediante la microinyección de TTX, provoca aumento significativo del número de núcleos neuronales que expresan la proteína c-Fos cuando se compara tanto con el grupo control como con el grupo que recibió una microinyección intra-SuMr de una solución salina ( $F_{2,14} = 16.76$ ;  $p < 0.00019$ ; HSD: Control vs SAL; SAL vs TTX ( $p < 0.05$ )). (Figura 43).



**Figura 43.** (A) Representación gráfica en la que se observa el incremento de núcleos neuronales inmunorreactivos a la proteína c-Fos en el MS/DB, en las ratas sometidas a microinfusión de una solución salina en la región supramamilar. Este incremento de inmunorreactividad c-Fos es mayor aún en el grupo de animales que recibieron una microinyección de tetradotoxina en la SuMr (\*  $p < 0.05$ , TTX vs Control y SAL; \*\* SAL vs Control y TTX). (B) Microfotografía que muestra la localización de la región MS/DB en un corte coronal de cerebro de rata, inmunoteñido para la proteína c-Fos. (C, D y E) Microfotografías a nivel del SM donde se muestra la inmunorreactividad de un animal control, microinyectado con solución salina (0,9%) y con tetradotoxina (TTX; 5 ng) en la región supramamilar. Escalas: B: 1000  $\mu$ m.; C, D y E: 100  $\mu$ m.



Con respecto a los resultados obtenidos en la región CA<sub>3</sub> del hipocampo dorsal, nuestros resultados muestran que la microinyección de una solución salina en la SuMr provoca un aumento de la inmunorreactividad c-Fos. No obstante, este efecto de la microinyección se elimina mediante la inactivación de la región SuMr (microinyección de TTX) ( $F_{2,14} = 7.076$ ;  $p < 0.001$ ; HSD: SAL vs Control y TTX ( $p < 0.05$ )). (Figura 44).



**Figura 44.** (A) Microfotografía que muestra la localización de la región CA<sub>3</sub> en hipocampo dorsal izquierdo, en un corte coronal del cerebro de una rata e inmunoteñido para la proteína c-Fos. (B, C y D) Microfotografías a nivel de la región CA<sub>3</sub> mostrando la inmunorreactividad c-Fos en un animal control, microinyectado con solución salina (0,9%) y con tetradotoxina (TTX; 5 ng) en la región supramamilar. Escalas: B: 375  $\mu$ m.; C, D y E: 100  $\mu$ m. (E) Representación gráfica que muestra la reducción de la inmunorreactividad c-Fos en la región CA<sub>3</sub> del hipocampo dorsal en ratas sometidas a microinfusión de TTX en la SuMr, cuando se compara con la microinyección de la solución salina (0,9%) en la misma región (\*  $p < 0.05$ , SAL vs Control y TTX).

#### 4. DISCUSIÓN.

Nuestro estudio muestra que la inactivación de la región supramamilar (SuMr) provoca una drástica hipofunción en la región CA<sub>3</sub> del hipocampo dorsal (Figura 44) y de forma contraria, un aumento de la actividad de la región MS/DB (Figura 43). En este experimento, hemos estudiado la expresión de la proteína c-Fos en estas dos regiones de proyección de la SuMr, cuando ésta se encontraba inactivada funcionalmente mediante microinyecciones de TTX. Es bien conocido que la lesión o alteración funcional del hipocampo provoca importantes déficit en la ejecución de tareas de aprendizaje espacial y emocional (Morris, 1978; Morris y cols, 1982; Gray, 1982; Gray y McNaughton, 2000), conllevando la aparición de cuadros amnésicos en humanos (Meador y cols, 1991; Kahana y cols, 1999). De este modo, la hipofuncionalidad c-Fos hipocampal observada como consecuencia de la lesión temporal de la SuMr, puede constituir el evento crítico que explique los déficit comportamentales observados a lo largo de los experimentos anteriores de esta tesis doctoral. Siendo así, esta hipoactividad permite sostener, o al menos hipotetizar, que las proyecciones de la SuMr hacia el hipocampo, transfieren información relevante que permite que éste desarrolle con normalidad las funciones mnésicas y emocionales en la que está implicado.

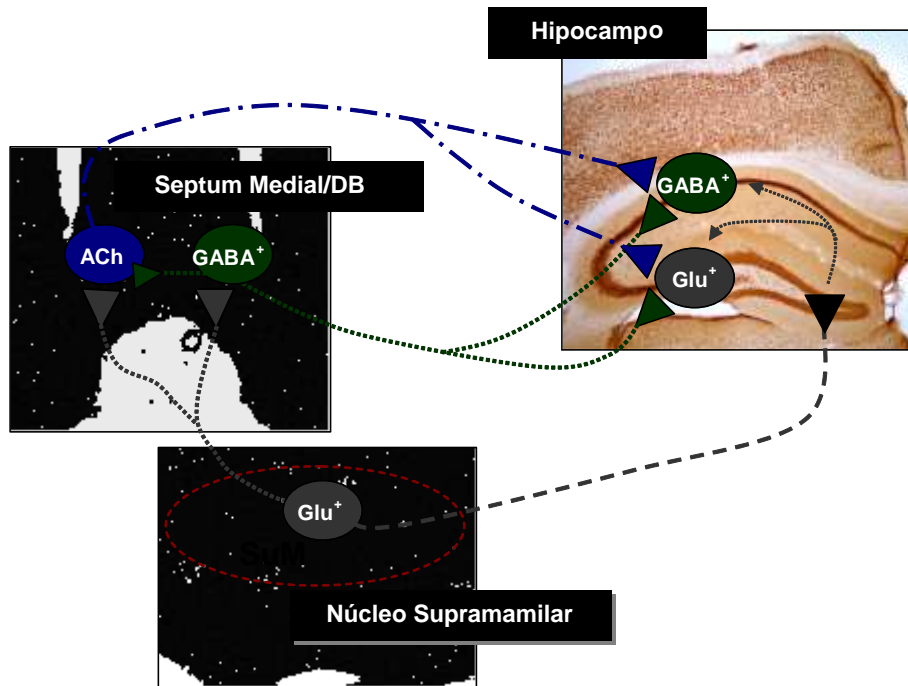
La vía a través de la que la lesión de la SuMr es capaz de alterar la función hipocampal puede ser de dos modos: directa (proyecciones (Vertes y McKenna 2000; Kiss y cols, 2000)) o indirecta (vía MS/DB (Gonzalo-Ruiz y cols, 1999; Kiss y cols, 2000)). Numerosos resultados indican que la modulación de la actividad hipocampal a través del MS/DB es crucial para el correcto funcionamiento de éste. En este sentido, los estudios electrofisiológicos desarrollados por el grupo de McNaughton, indican que se produce una clara reducción en la frecuencia del ritmo theta del hipocampo en animales que presentan lesiones neuroquímicas y/o lesiones temporales del núcleo SuM (Kirk y McNaughton, 1991; 1993; Kocsis y Vertes, 1994). Esta reducción de la frecuencia del ritmo theta, a su vez se relaciona con alteraciones en la respuesta emocional y en el aprendizaje de tareas de memoria dependientes del hipocampo (Pan y McNaughton, 1997). Aún cuando se considera de gran importancia la mediación del MS/DB, en la modulación funcional de la SuMr, no podemos descartar que la proyección directa de la SuMr al hipocampo dorsal pueda contribuir a los resultados comportamentales observados en esta tesis doctoral.

Teniendo en cuenta esta posibilidad, el estudio realizado sobre la inmunorreactividad c-Fos en la región MS/DB parece indicar que, al menos, esta

proyección constituye un importante vehículo para transferir al hipocampo la información que proviene de la SuMr (Figura 45). De hecho, nuestros resultados muestran que la inactivación temporal de la SuMr provoca un aumento significativo e importante de la inmunorreactividad c-Fos en el MS/DB. Si bien es cierto que este estudio, no nos indica cuál es el tipo celular que presenta este aumento de inmunorreactividad c-Fos, si combinamos la información disponible publicada con la hipofunción en CA<sub>3</sub> obtenida en nuestro trabajo, podemos al menos sugerir un mecanismo de acción.

De este modo, el MS/DB contiene dos poblaciones de neuronas bien caracterizadas neuroquímicamente, una de ellas GABAérgica y la otra colinérgica (Wainer y cols, 1985) (Figura 45). La interacción entre ambas poblaciones neuronales en el MS/DB regula la función del hipocampo, así como las funciones comportamentales asociadas al mismo. De este modo, estudios electrofisiológicos muestran que la activación de los aferentes colinérgicos hipocampales provoca una desinhibición de las células piramidales en esta región temporal (Bernardo y Prince, 1984; Bland y cols, 1996). Asimismo, la administración intraseptal de un agonista GABAérgico (muscimol) que reduce la actividad funcional de las células del septum medial, reduce significativamente los niveles de Ach en el hipocampo, efecto atribuido a la inhibición GABAérgica de las células de proyección septo-hipocampales (Allen y Crawford, 1984; Word y cols, 1979). Más recientemente, estudios *in vitro* han demostrado que la estimulación de la región septal reduce la actividad de las interneuronas GABAérgicas del hipocampo, aumentando la actividad general de las neuronas piramidales (Alreja y cols, 2000).

Por otro lado, la actividad de las neuronas colinérgicas del MS/DB, que contienen receptores GABA<sub>A</sub>, está modulada por interneuronas GABAérgicas. El bloqueo farmacológico de estos receptores GABA<sub>A</sub> mediante el uso de antagonistas, aumenta la liberación de Ach en el hipocampo, mientras que su estimulación con agonistas ejerce un efecto contrario, reduciendo la liberación de Ach en el hipocampo (Moor y cols, 1998a, b). También se ha constatado la importancia de este control en la regulación de la conducta, de modo que la coadministración de un agonista (muscimol) con un antagonista (bicuculina) GABA<sub>A</sub>, reduce el deterioro de memoria que se produce normalmente por la microinfusión intraseptal de agonistas del receptor GABA<sub>A</sub> (Krebs-Kraft y cols, 2007).



**Figura 45.** Esquema que muestra las conexiones entre el núcleo supramamilar, el septum medial y el hipocampo. Nótese que la vía que parte del SuM es de carácter excitatorio y proyecta sobre neuronas GABAérgicas y colinérgicas en el septum medial y sobre neuronas glutamatérgicas y GABAérgicas en el hipocampo, indicando su capacidad para modular la función de estas regiones de modos diversos.

En función de lo expuesto en los párrafos anteriores, los resultados obtenidos en nuestro estudio nos permiten sugerir que la hipofunción de la región CA<sub>3</sub> del hipocampo, observada en nuestro estudio (reducción de la inmunorreactividad c-Fos), como consecuencia de la inactivación de la SuMr, se podría deber a un aumento de la actividad funcional de las interneuronas GABAérgicas del MS/DB. Esta mayor actividad GABAérgica en el MS/DB inhibiría las neuronas colinérgicas que proyectan hacia el hipocampo, provocando la hipofunción observada (Figura 45). No obstante, no podemos descartar que un aumento de la activación de las neuronas GABAérgicas de proyección hacia el hipocampo, así como la inhibición de un conjunto de neuronas glutamatérgicas de proyección recientemente descritas (Manseau y cols, 2005), puedan contribuir a la hipofuncionalidad descrita en CA<sub>3</sub>. Asimismo, la eliminación temporal de la proyección directa de la SuMr hacia el hipocampo, reduciendo la estimulación de las neuronas piramidales glutamatérgicas, también podría contribuir a los resultados observados.

Por último, nuestros resultados son consistentes con los resultados obtenidos en modelos de amnesia diencefálica (deficiencia de tiamina inducida por piritiamina (PTD)), en el que se ha descrito una severa alteración en la disponibilidad de Ach en el

hipocampo y en la corteza (Savage y cols, 2003; Pires y cols, 2005; Roland y Savage, 2007). En este modelo animal, además se ha observado una reducción entre el 25%-30% de neuronas positivas a la acetilcolintransferasa (AChT) en el MS/DB, indicando una pérdida en la producción de Ach, hecho que está correlacionado con una peor ejecución en tareas de aprendizaje y memoria (Roland y Savage, 2007; Savage y cols, 2007). Recientemente, Vann y cols, 2009 han sugerido que la alteración colinérgica en este modelo podría ser el resultado de la pérdida de eferencias de los cuerpos mamilares. En este sentido, el grupo de Beracochea (Beracochea y cols, 1995) demostró la importancia de la región mamilar en el control de las proyecciones colinérgicas hacia el hipocampo y la corteza. La lesión de esta región produce, globalmente, un importante descenso de la captación de colina de alta afinidad dependiente de sodio (SDHACU) en el hipocampo y en la corteza cerebral, indicando una pérdida de inputs colinérgicos en estas regiones. Reinterpretando estos experimentos, en los que se lesiona, al menos parcialmente la SuMr, no resulta extraño que esta región contribuya a la alteración colinérgica observada en pacientes que padecen el síndrome de Wernicke-Korsakoff así como en modelos animales de encefalopatía alcohólica, y que los déficit cognitivos y emocionales observados en animales con alteraciones funcionales de la SuMr, pudieran explicarse por esta pérdida de la modulación colinérgica de la función hipocampal.

# IX

## CONCLUSIONES

1. En el laberinto empleado, las ratas utilizan un procesamiento aloéctrico para formar una representación del entorno y solucionar tareas espaciales con demandas de memoria de referencia y de trabajo.
2. La lesión permanente de la región supramamilar no afecta a la adquisición ni a la consolidación y recuerdo de un aprendizaje espacial con demandas de memoria de referencia. Sin embargo, la inactivación temporal de esta región perjudica el recuerdo de un aprendizaje espacial previamente consolidado.
3. La lesión permanente y temporal de la región supramamilar, altera gravemente la capacidad para solucionar eficazmente tareas espaciales con demandas de memoria de trabajo. Este déficit no se encuentra relacionado con un aumento de la interferencia proactiva, relacionándose posiblemente con la incapacidad de los animales para reorganizar temporalmente la información espacial.
4. La lesión permanente de la región supramamilar reduce parcialmente el incremento de la evitación pasiva inducida por la intervención quirúrgica, indicando su papel regulador en la respuesta de evitación inducida por estrés, perjudica gravemente la ejecución en tareas de evitación pasiva en ratas, indicando la relevancia de esta región diencefálica en el procesamiento de la información emocional en una tarea de condicionamiento de miedo.
5. La inactivación funcional de la región supramamilar disminuye significativamente la expresión de la proteína c-Fos en la región CA<sub>3</sub> del hipocampo dorsal, incrementándola en la región MS/DB. Esta modulación funcional de las regiones CA<sub>3</sub> y de MS/DB posiblemente sea un evento relevante en los resultados comportamentales observados en nuestros estudios.

---

**BIBLIOGRAFÍA**

Adams, R.D. y Victor, M. (1993). Principles of Neurology. 5 Ed. New York. **McGraw-Hill**.

Aggleton, J.P., Hunt, P.R. y Shaw, C. (1990). The effects of mammillary body and combined amigdalas-fornix lesions on test of delayed non-matching to sample in rat. **Behavioural Brain Research**, 40, 145-157.

Aggleton, J.P., Keith, A.B. y Shagal, A. (1991). Both fornix and anterior thalamic but not mammillary lesions disrupt delayed non-matching to position memory in rats. **Behavioural Brain Research**, 44, 151-161.

Aggleton, J.P., Keith, A.B., Rawlins, J.N.P., Hunt, P.R., Sahgal, A. (1992). Removal of the hippocampus and transections of the fornix produce comparable deficit on delayed non-matching to position by rats. **Behavioural Brain Research**, 5, 61-71.

Aggleton, J.P. y Shagal, A. (1993). The contribution of the anterior thalamic nuclei to anterograde memory. **Neuropsychologia**, 31, 1001-1019.

Aggleton, J.P., Neave, N., Nagle, S. y Hunt, P.R. (1995). A comparison of the effects of anterior thalamic, mammillary body and fornix lesions on reinforced spatial alternation. **Behavioural Brain Research**, 68, 91-101.

Aguado-Aguilar, L. (2001). Aprendizaje y Memoria. **Revista de Neurología**, 3, 373-381.

Alkon, D.L., Amaral, D.G., Bear, M.F., Black, J., Carrew, T.J., Cohen, N.J., Disterfoft, J.F., Eichenbaum, H., Golski, S., Gorman, L.K., Lynch, G., McNaughton, B.L., Mishkin, M., Moyer, J.R., Olds, J.L., Olton, D., Squire, L.R., Staubli, U., Thompson, L.T. y Wible, C. (1991). Learning and memory. **Brain Research Review**, 16, 193-220.



---

Allen, G.V. y Hopkins, D. (1988). Mammillary body in rat: a cytoarchitectonic, Golgi and ultrastructural study. **Journal of Comparative Neurology**, 275, 39-64.

Allen, G.V. y Hopkins, D. (1989). Mammillary body in the rat: topography and synaptology of projections from the subicular complex, prefrontal cortex and midbrain tegmentum. **Journal of Comparative Neurology**, 286, 311-356.

Allen, C.N. y Crawford, I.L. (1984). GABAergic agents in the medial septal nucleus affect hippocampal theta rhythm and acetyl choline utilization. **Brain Research**, 322, 261-267.

Alreja, M., Wu, M., Liu, W., Atkins, J.B., Leranth, C. y Shanabrough, M. (2006). Muscarinic tone sustains impulse flow in the septohippocampal GABA but not cholinergic pathway: implications for learning and memory. **Journal of Neuroscience**, 26, 8103-8110.

Alyan, S.H. y Jander, R. (1994). Short-range homing in the house mouse (*Mus musculus*): stages in the learning of directions. **Animal Behavior**, 48, 285-298.

Ambrogio Lorenzini, C.G., Baldi, E., Bucherelli, C., Sacchetti, B. y Tassoni, G. (1997). Role of ventral hippocampus in acquisition, consolidation and retrieval of rat's passive avoidance response memory trace. **Brain Research**, 768, 242-248.

Aranda, L., Santín, L.J., Begega, A., Aguirre, J.A. y Arias, J.L. (2006). Supramammillary and adjacent nuclei lesions impair spatial working memory and induce anxiolytic-like behavior. **Behavioural Brain Research**, 167, 156-164.

Baddeley, A. (1992). Working memory. **Science**, 255, 556-559.

Beck, C.H. y Fibiger, H.C. (1995). Conditioned fear-induced changes in behavior and in the expression of the immediate early gene *c-fos*: with and without diazepam pretreatment. **Journal of Neuroscience**, 15, 709-720.

---

Beracochea, D. J. y Jaffard, R. (1987). Impairment of spontaneous alternation behavior in sequential test procedures following mammillary body lesions in mice: evidence for time-dependent interferente-related memory deficits. **Behavioural Neuroscience**, 101, 187-197.

Beracochea, D.J., Aloui-Bouarraqui, F. y Jaffard, R. (1989). Impairment of memory in a delayed non-matching to place task following mammillary body lesions in mice. **Behavioural Brain Research**, 34, 147-154.

Beracochea, D.J. y Jaffard, R. (1990). Effects of ibotenic lesions of mammillary bodies on spontaneous and rewarded spatial alternation in mice. **Journal of Cognitive Neuroscience**, 2, 133-140.

Beracochea, D.J. y Krazem, A. (1991). Effects of mammillary body and mediodorsal thalamic lesions on elevated plus maze exploration. **NeuroReport**, 2, 793-796.

Beracochea, D.J. y Jaffard, R. (1995). The effects of mammillary body lesions on delayed matching and delayed non-matching to place task in the mice. **Behavioural Brain Research**, 68: 45-52.

Beracochea, D.J., Micheau, J. y Jaffard, R. (1995). Alteration of cortical and hippocampal cholinergic activities following lesion of the mammillary bodies in mice. **Brain Research**, 670, 53-58.

Berger, T.W., Rinaldi, P.C., Weisz, D.J. y Thompson, R.F. (1983). Single-unit analysis of different hippocampal cell types during classical conditioning of rabbit nictitating membrane response. **Journal of Neurophysiology**, 50, 1197-1219.

Bernardo, L.S. y Prince, D.A. (1982). Cholinergic pharmacology of mammalian hippocampal pyramidal cells. **Neuroscience**, 7, 1703-1712.

Bland, B.H., Oddie, S.D, Colom, L.V. y Vertes, R.P. (1994). The extrinsic modulation of medial septal cell discharges by the ascending brainstem hippocampal synchronizing pathway. **Hippocampus**, 4, 649-660.

---

Bland, B.H., Treper, Ch., Oddie, S.D. y Kirk, I. (1996). Intraseptal microinfusion of muscimol: effects on hippocampal formation theta field theta-activity and phasic theta on cell discharges. **Experimental Neurology**, 138, 286-297.

Bliss, T.V.P. y Collingridge, G.L. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. **Nature**, 361, 31-39.

Borhegyi, Z. y Leranth, C. (1997). Distinct substance P- and calretinin-containing projections from the supramammillary area to the hippocampus in rats: a species difference between rats and monkeys. **Experimental Brain Research**, 115, 369-374.

Borhegyi, Z. y Freund, T.F. (1998). Dual projection from the medial septum to the supramammillary nucleus in the rat. **Brain Research Bulletin**, 15, 46 (5), 453-459.

Brandeis, R., Brandys, Y. y Yehuda, S. (1989). The use of the Morris watermaze in the study of memory and learning. **International Journal of Neuroscience**, 48, 26-69.

Bueno, C.H.; Zangrossi-jr, H. y Viana, M.B. (2005). The inactivation of the basolateral nucleus of the rat amygdala has an anxiolytic effect in the elevated T-maze and light/dark transition tests. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 38, 1697-1701.

Campos-Castelló, J. (2000). Bases neurobiológicas de los trastornos del aprendizaje. **Revista de Neurología**, 1, 55-61.

Carlson, N.R. (1996). Fisiología de la conducta. Barcelona. **Ariel**, 492-583.

Carlson, N.R. (2002). Fisiología de la conducta. Barcelona. **Ariel Neurociencia**, 704.

Célérier, A.; Pierard, C. y Beracochea, D. (2004). Effects of ibotenic acid lesions of the dorsal hippocampus on contextual fear conditioning in mice: comparison with mammillary body lesions. **Behavioural Brain Research**, 151(1-2), 65-72.

---

Chamizo, V.D. y Mackintosh, N.J. (1989). Latent learning and latent inhibition in maze discriminations. **The Experimental Psychology Society**, 21-31.

Chamizo, V.D. (1990). Ratas en el laberinto: memoria espacial y mapas cognitivos. En L. Aguado (Comp.). **Cognición comparada. Estudios experimentales sobre la mente animal**. Madrid. Alianza.

Cimadevilla, J.M., Miranda, R., López, L. y Arias J.L. (2005). Partial unilateral inactivation of the dorsal hippocampus impairs spatial memory in the MWM. **Brain Research Cognition**, 25 (3), 741-746.

Cohen, N.J. y Squire, L.R. (1980). Preserved learning and retention of pattern analyzing skill in amnesia: dissociation of knowing how and knowing that. **Science**, 210, 207-210.

Courtney, S. M., Petit, L., Maisog, J. M., Ungerleider, L. G., y Haxby, J. V. (1998). An area specialized for spatial working memory in human frontal cortex. **Science**, 279 (5355), 1347- 1351.

Cruce, J.A. (1977). An autoradiographic study of the descending connections of the mammillary nuclei of the rat. **Journal of Comparative Neurology**, 15, 176 (4), 631-644.

Cruz-Orive, L.M. y Weibel, E.R. (1990). Recent stereological methods for cell biology: a brief survey. **American Journal Physiology**, 258, 148-156.

Degroot, A. y Treit, D. (2004). Anxiety functionally segregated within the septo-hippocampal system. **Brain Research**, 1001, 60-71.

Delatour, B., & Gisquet-Verrier, P. (2000). Functional role of rat prelimbic-infralimbic cortices in spatial memory: evidence for their involvement in attention and behavioural flexibility. **Behavioural Brain Research**, 109(1), 113-128.

---

Delatour, B., & Gisquet-Verrier, P. (2001). Involvement of the dorsal anterior cingulate cortex in temporal behavioral sequencing: subregional analysis of the medial prefrontal cortex in rat. **Behavioural Brain Research**, 126(1-2), 105-114.

Diamond, D.M., Bennet, M.C., Stevens, K.E., Wilson, R.L. y Rose, G.M. (1990). Exposure to a novel environment interferes with the induction of hippocampal primed burst potentiation in the behaving rat. **Psychobiology**, 18, 273-281.

Dollerman – Van der Weel, M.J. y Witter, M.P. (1996). Projections from the nucleus reunions thalamic to the entorhinal cortex , hippocampal field CA<sub>1</sub>, and the subiculum in the rat arise from different populations of neurons. **Journal of Comparative Neurology**, 346, 637-650.

Dudchenko, P. A. (2004). An overview of the tasks used to test working memory in rodents. **Neuroscience Biobehavioural Review**, 28 (7), 699-709.

Dunnet, S.B. (1990). Role of the prefrontal cortex and striatal output systems in short-term memory deficits associated with ageing, basal forebrain lesions and cholinergic-rich grafts. **Canadian Journal of Psychology**, 44, 210-232.

Dusoir, H., Kapur, N. McKinsty, S. y Hoare, R.D. (1990). The role of diencephalic pathology in human memory disorder. **Brain**, 113, 1695-1700.

Eichenbaum, H., Kuperstein, M., Fagan, A. y Nagode, J. (1987). Cue sampling and goal-approach correlates of hippocampal unit activity in rats performing an odour-discrimination task. **Journal of Neuroscience**, 7, 716-732.

Eichenbaum, H. (1997). Declarative memory: insights from cognitive neurobiology. **Annual Review of Psychology**, 48, 547-572.

Eichenbaum, H. (2003a). The hippocampus, episodic memory, declarative memory, Spatial memory... where does it all come together? **International Congress Series**, 1250, 235-244.

---

Field, T.D., Rosenstock, J., King, E.C. y Greene, E. (1977). Behavioral role of the mammillary efferent system. **Brain Research Bulletin**, 3, 451-456.

Fletcher, P.C. y Henson, R.N.A. (2001). Frontal lobes and human memory: Insights from functional neuroimaging. **Brain**, 124 (5): 849-881.

Foreman, N. y Stevens, R. (1987). Relationships between the superior colliculus and hippocampus: neural and behavioral considerations. **Behavioural and Brain Sciences**, 10, 101-152.

Frick K.M., Baxter M.G., Markowska A.L., Olton D.S. y Price D.L. (1995) Aged-related spatial reference and working memory deficits assessed in the water maze. **Neurobiology Aging**, 16 (2), 149-160.

Fuster, J.M. y Alexander, G.E. (1971). Neuron activity related to short-term memory. **Science**, 173 (997), 652-654.

Fuster J.M. (1995). Memory in the cerebral cortex: an empirical approach to neural networks in the human and nonhuman primate. **Cambridge**.

Goldman-Rakic, P. (1992). La memoria funcional y la mente. **Investigación y ciencia**, 69-75.

Gonzalo-Ruiz, A.; Morte, L.; Flecha, J.M y Sanz, J.M (1999). Neurotransmitter characteristics of neurons projecting to the supramammillary nucleus of the rat. **Anatomy and Embriology**, 200, 377-392.

Gothard, K.M., Skaggs, W.E., Moore, K.M. y McNaghton, B.L. (1996). Binding of hippocampal CA<sub>1</sub> neural activity to multiple reference frames in a landmark-based navigation task. **Journal of Neuroscience**, 16, 823-835.

Graeff, F.G., Viana, M.B. y Tomaz, C. (1993). The elevated T maze, a new experimental model of anxiety and memory: effect of diazepam. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 26, 67-70.

---

Graeff, F.G.; Viana, M.B. y Mora, P.O. (1996). Opposed regulation by dorsal raphe nucleus 5-HT pathways of two types of fear in the elevated T-maze. **Pharmacology, Biochemistry Behavior**, 53, 171-177.

Graeff, F.G., Netto, C.F. y Zangrossi Jr H. (1998). The elevated T-maze as an experimental model of anxiety. **Neuroscience Biobehavioural Review**, 23, 237-246.

Gray, J.A. (1982). The neuropsychology of anxiety. **Oxford university press, Oxford.**

Gray, J.A. Y McNaughton, N. (2000). The neuropsychology of anxiety: an enquiry into the functions of the septo-hippocampal system. **Oxford university press, Oxford.**

Gudden, H. (1896). Klinische und anatomische beiträge zur kenntnis der multiplen Alkoholneuritis nebst bemerkungen über die Regenerationsvorgänge in peripheren Nervensystem. **Archiv für psychiatrie und Nervenkrankheiten**, 28, 643-741.

Haglund L., Swanson L.W. y Kohler C. (1984). The projections of the supammillary nucleus to the hippocampal formation: an immunohistochemical and anterograde transport study with the lectin PHA-L in the rat. **Journal of Comparative Neurology**, 229, 171-185.

Harper, D.N., McLean, A.P. y Dalrymple-Alford, J.C. (1994). Forgetting in rats following medial septum or mammillary body damage. **Behavioural Neuroscience**, 108, 691-702.

Harper C (2009). The neuropathology of alcohol-related brain research. **Alcohol Alcohol**, 44(2), 136-140.

Hasselmo, M., Cannon, N.C. y Koene, R. (2002). The parahippocampal region (ed. **Witter, M., Wouterlood, F.**) 139-161 (Oxford University. Press, Oxford, 2002).

---

Haug, H. (1986). History of neuromorphometry. **Journal of Neuroscience Methods**, 8(1-2), 1-17.

Hayakawa, T. y Zyo, K. (1991). Quantitative and structural study of ascending projections to the medial mammillary nucleus in the rat. **Anatomy and Embriology**, 184, 611-622.

Heindel, W.C., Butters, N. y Salmon, D.P. (1988). Impaired learning of a motor skill in patients with Huntington´s disease. **Behavioural Neuroscience**, 102, 141-147.

Herkenham, M. (1978). The connections of the nucleus reunions thalamic: evidence for a direct thalamo-hippocampal pathway in the rat. **Journal of Comparative Neurology**, 177, 589-610.

Hildebrandt, H., Muller, S., Bussman-Mork, B., Goebel, S. y Eilers, N. (2001). Are some memory deficits unique to lesions of the mammillary bodies? **Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology**, 23, 490-501.

Holdstock, J.S., Shaww, C. y Aggleton, J.P. (1995). The performance of amnesic subjects on test of delayed matching-to-sample and delayed matching-to-position. **Neuropsychologia**, 33, 1583-1596.

Holmes, E.J., Jacobson, S., Stein, B.M. y Butters, N. (1983a). Ablations of the mammillary nuclei in monkeys: effects on postoperative memory. **Experimental Neurology**, 81, 97-113.

Holmes, E.J., Butters, N., Jacobson, S. y Stein, B.M. (1983b). An examination of the effects of mammillary body lesions on reversal learning sets in monkeys. **Physiological Psychology**, 11, 159-165.

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



---

Hurlé, M.A. (1997). Fármacos ansiolíticos y sedantes. Farmacología humana. **Flórez (editor), Massan**, capítulo 26, 453.

Huxter, J., Burgess, N. y O'Keefe, J. (2003). Independent rate and temporal coding in hippocampal pyramidal cells. **Nature**, 425, 828-832.

Hyman, J.M, Wible, B.P., Goyal, V., Rossi, C.A. y Hasselmo, M.E. (2003). Stimulation in hippocampal region CA1 in behaving rats yields long-term potentiation when delivered to the peak of theta and long-term depression when delivered to the trough. **Journal of Neuroscience**, 23, 11725-11731.

Jaffard, R., Beracochea, D. y Cho Y. (1991). The hippocampal-mammillary system anterograde and retrograde amnesia. **Hippocampus**, 3, 275-278.

Kaneto, H. (1997). Learning/memory processes under stress conditions. **Behavioural Brain Research**, 83, 71-74.

Kacsmarek, L. (1993). Molecular biology of vertebrate learning: is c-fos a new beginning? **Journal of Neuroscience Research**, 34, (4), 377-381.

Kahana, M.J., Sekuler, R., Caplan, J.B., Kirschen, M. y Madsen, J.R. (1999). Human theta oscillations exhibit task dependence during virtual maze navigation. **Nature**, 399, 781-784.

Kataoka, Y.; Shibata, K.; Gomita, Y. y Ueki, S. (1982). The mammillary body is a potential site of anti-anxiety action of benzodiazepines. **Brain Research**, 241(2), 374-377.

Kessels, R.P.C., de Haan, E.H.F., Kappelle, L.J. y Postma, A. (2001). Varieties of human spatial memory: a meta-analysis of the effects of hippocampal lesions. **Brain Research Reviews**, 35, 295-303.

---

King, J.A.; Burgess, N., Hartley, T., Vargha-Khadem, F. y O'Keefe, J. (2002). Human hippocampus and viewpoint dependence in spatial memory. **Hippocampus**, 12 (6), 811-820.

Kirk, I.J. y McNaughton, N. (1991). Supramammillary cell firing and hippocampal rhythmical slow activity. **NeuroReport**, 2, 723-725.

Kirk, I.J. y McNaughton, N. (1993). Mapping the differential effects of procaine on frequency and amplitude of reticularly elicited hippocampal rhythmical slow activity. **Hippocampus**, 3, 517-529.

Kirk, I. (1998). Frequency modulation of hippocampal theta by the supramammillary nucleus, and other hypothalamo-hippocampal interactions: mechanisms and functional implications. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, 22, (2), 291-302.

Kiss, J., Csáki, A., Bokor, H., Shanabrough y Leranth, C. (2000). The supramammillo-hippocampal and supramammillo-septal glutamatergic/aspartatergic projections in the rat: a combined [<sup>3</sup>H] D-aspartate autoradiographic and immunohistochemical study. **Neuroscience**, 97, 657-669.

Kiss, J., Csaki, A., Bokor, H., Kocsis, K. y Kocsis, B. (2002). Possible glutamatergic/aspartatergic projections to the supramammillary nucleus and their origins in the rat studied by selective [<sup>3</sup>H] D-aspartate labelling and immunocytochemistry. **Neuroscience**, 111, 671-691.

Kocsis, B. y Vertes, R.P. (1994). Characterization of neurons of the supramammillary nucleus and mammillary body that discharge rhythmically with the hippocampal theta rhythm in the rat. **Journal of Neuroscience**, 14, 7040-7052.

Kolb, B. y Wishaw, I.Q. (1986). Fundamentos de neuropsicología humana. **Ed. Labor, 1ª Ed. Barcelona.**

Kolb, B. y Wishaw, I.Q. (1993). Neuropsychology, **Heidelberg: Spektrum**

---

Kopelman, M.D. y Stanhope, N. (1998). Recall and recognition memory in patients with focal frontal, temporal lobe and diencephalic lesions. **Neuropsychologia**, 36, 785-796.

Krazem, A., Beracochea, D. y Jaffard, R. (1995). Effects of mammillary bodies and mediodorsal thalamic lesions on the acquisition and retention of a learning set in mice: paradoxical effect of the intersession interval. **Behavioural Brain Research**, 98, 51-58.

Krebs-Kraft, D.L., Wheeler, M.G. y Prent, M.B. (2007). The memory-impairing effects of septal GABA receptor activation involve GABAergic septo-hippocampal projection neurons. **Learning and Memory**, 14, 833-841.

Kubie, J.L. y Ranck, J.B. (1984). Hippocampal neuronal firing, context and learning. En: Squire, L.R. y Butters, N. (Eds). **Neuropsychology of memory**. The Guildford Press, Nueva Cork, 417-423.

LeDoux, J.E. (1992). Brain mechanisms of emotion and emotional learning. **Current Opinion in Neurobiology**, 2(2), 191-197.

LeDoux, J.E. (1999). El cerebro emocional. **Ariel**. Barcelona.

Lehmann, H., Treit, D. y Parent, M.B. (2003). Spared anterograde memory for shock-probe fear conditioning after inactivation of the amygdale. **Research**, 10, 261-269.

Leonard, B. y McNaughton, B.L. (1990). Spatial representation in the rat: conceptual, behavioural and neurophysiological perspectives. En R.P. Kesner y D.S. Olton (eds). **Neurobiology of comparative cognition**. Hillsdale. Erlbaum.

Leranth, C. y Kiss, J. (1996). A population of supramammillary area calretinin neurons terminating on medial septal area cholinergic and lateral septal area calbindin-containing cells are aspartate/glutamatergic. **Journal of Neuroscience**, 16, 7699-7710.

---

Leranth, C.; Carpi, D.; Buzsaki, G. y Kiss, J. (1999). The entorhino-septo-supramammillary nucleus connection in the rat: morphological basis of a feedback mechanism regulating hippocampal theta rhythm. **Neuroscience**, 88, 701-718.

Levy, R., & Goldman-Rakic, P. S. (1999). Association of storage and processing functions in the dorsolateral prefrontal cortex of the nonhuman primate. **Journal of Neuroscience**, 19 (12), 5149-5158.

Lister, R.G. (1987). The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, 92, 180-185.

Loesch, D.V. Gilman, S., Del Doto, J. y Rosenblum, A.L. (1995). Cavernous malformation of the mammillary bodies: neuropsychological implications. Case report. **Journal Neurosurgery**, 83, 354-358.

Mair, W.P.C.; Warrington, E.K. y Weiskrantz, L. (1979). Memory disorder in korsakoff's psychosis: a neurological and neuropsychological investigation of two cases. **Brain**, 102, 749-783.

Mair, R.G. y Lacourse, D.M. (1992). Radio frequency lesions of the thalamus produce delayed non-matching to sample impairments comparable to pyridoxamine induced encephalopathy in rats. **Behavioral Neuroscience**, 106, 634-845.

Manseau, F., Danik, M. y Williams, S. (2005). A functional glutamatergic neurone network in the medial septum and diagonal band area. **Journal Physiology**, 566, 865-884.

Markou, A. y Koob, G.F. (1993). Intracranial self-stimulation thresholds as measure of reward. En Sahgal, A., (ed). **Behavioural Neuroscience: a practical approach (vol. II)**. Oxford, R.L.N Press, 93-115.

---

Markowska, A. y Lukaszewska, I. (1981). Response to stimulus change following observation or exploration by the rat: differential effects of hippocampal damages. **Acta Neurobiologiae Experimentalis**, 41, 325-338.

Martin, S.J. y Morris, R.G. (2002). New life in an old idea: the synaptic plasticity and memory hypothesis revisited. **Hippocampus**, 12, 609-636.

Mayes, A.R.; Mendell, P.R.; Mann, D. y Pickering, A. (1988). Location of lesions in Korsakoff's syndrome: neuropsychological and neuropathological data on two patients. **Cortex**, 24, 367-388.

Mayes, A.R. (1995). Memory and amnesias. **Behavioural Brain Research**, 66, 29-36.

McNaughton, N., Richardson, J. y Gore, C. (1986). Reticular elicitation of hippocampal slow waves: common effects of some anxiolytic drugs. **Neuroscience**, 19, 899-903.

McNaughton, B.L., Leonard, B. y Chen, L.L. (1989). Cortical-hippocampal interactions and cognitive mapping: a hypothesis based on reintegration of the parietal and inferotemporal pathways for visual processing. **Psychobiology**, 17, 236-246.

Meador, K.J., Thompson, J.L., Loring, D.W., Murro, A.M., King, D.W., Gallagher, B.B., Lee, G.P., Smitch, J.R. y Flanigin, H.F. (1991). Behavioral state-specific changes in human hippocampal theta activity. **Neurology**, 41, 869-872.

Menard, J. y Treit, D. (1999). Effects of centrally administered anxiolytic compounds in animal models of anxiety. **Neuroscience and Biobehavioural Reviews**, 23, 591-613.

Moor, E., DeBoer, P. y Westerink, B.H.C. (1998a). GABA receptors and benzodiazepine binding sites modulate hippocampal acetylcholine release in vivo. **European Journal Pharmacology**, 359, 119-126.

---

Moor, E., Schirm, E., Jacso, J. y Westerink, B.H.C. (1998b). Involvement of medial septal glutamate and GABA receptors in behaviour-induced acetylcholine release in the hippocampus: a dual probe microdialysis study. **Brain Research**, 789, 1-8.

Morgado, I. (2005). Psicobiología del aprendizaje y la memoria. **CIC (Cuadernos de Información y Comunicación)**, 10, 221-233.

Morris, R.G.M. (1981). Spatial localization does not require the presence of local cues. **Learning and Motivation**, 12, 239-260.

Morris R.G.M., Garrud J., Rawlins J. y O'Keefe J. (1982). Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. **Nature**, 297, 681-683.

Morris, R.G.M., Schenk, F.M., Tweedie, F. y Jarrad, L.E. (1990). Ibotenate lesions of hippocampus and/or subiculum: dissociating components of allocentric spatial learning. **European Journal of Neuroscience**, 2, 1016-1028.

Muller, R.U. y Kubie, J.L. (1989). The firing of hippocampal place cells predicts the future position of freely moving rats. **Journal of Neuroscience**, 9, 4101-4110.

Muller, R.U., Kubie, J.L., Bostock, E.M., Taube, J.S. y Quirk, G.J. (1991). Spatial firing correlates of neuron in the hippocampal formation of freely moving rats. En J. Paillaerd (ed). **Brain and Space**. London Oxford University Press, 269-333.

Nadel, L. (1991). The hippocampus and space revisited. **Hippocampus**, 1, 221-229.

Nadel, L., Samsonovich, A., Ryan, L. Moscovich, M. (2000). Multiple trace theory of human memory: computational, neuroimaging, and neuropsychological results. **Hippocampus**, 10, 352-368.

Nakanishi, K., Saito, H. y Abe, K. (2001). The supramammillary nucleus contribuyes to associative EPSP-Spike potentiation in the rat dentate gyrus in vivo. **European Journal of Neuroscience**, 13, 793-800.

---

Narahashi, T. (1972). Mechanism of action of tetrodotoxin and saxitoxin on excitable membranes. **Federation Proceedings**, 31, 1124-1132.

Neave N., Nagle S. y Aggleton, J.P. (1997). Evidence for the involvement of the mammillary bodies and cingulum bundle in allocentric spatial processing by rats. **European Journal of Neuroscience**, 9, 941-955.

Nicolaev, E.; Kaminska, B., Tischmeyer, W., Matthies, H. y Kaczmarek, L. (1992). Induction of expression of genes encoding transcription factors in rat brain elicited by behavioral. **Brain Research Bulletin**, 128, 479-484.

Nitsch, R. y Leranth, C. (1994). Sprouting of intrinsic substance P-immunoreactive fibers in the monkey dentate gyrus following denervation from its substance P-containing hypothalamic afferents. **Experimental Brain Research**, 100, 522-526.

O'Keefe, J. y Dovstrovsky, J. (1971). The hippocampus as a spatial map: preliminary evidence from unit activity in the freely moving rat. **Brain Research**, 34, 171-175.

O'Keefe, J. y Nadel, L. (1978). The hippocampus as a cognitive map. **Oxford: Clarendon Press**.

O'Keefe, J. y Speakman, A. (1987). Single unit activity in the rat hippocampus during a spatial memory task. **Experimental Brain Research**, 68, 1-27.

Olton, D. S. (1977). Memoria espacial. **Investigación y Ciencia**, 11, 70-81.

Olton, D.S. (1978). The function of septo-hippocampal connections in spatially organized behaviour. En K. Elliot y J. Whelan (eds). Functions of the septo-hippocampal system. **Amsterdam. Elsevier**, 327-349.

Olton, D.S, Becker, J.T. y Handelman, G.E. (1979). Hippocampus, space and memory. **Behavioural Brain Science**, 2, 313-365.

---

Olton, D.S. y Papas B.C. (1979). Spatial memory and hippocampal function. **Neuropsychology**, 17, 669-682.

Olvera-Cortes, E., Guevara, M.A. y Gonzalez-Burgos, I. (2004). Increase of the hippocampal theta activity in the Morris water maze reflects learning rather than motor activity. **Brain Research Bulletin**, 62, 379-384.

Otto, T. y Eichenbaum, H. (1992). Neuronal activity in the hippocampus during delayed non-match to sample performance in rats: evidence for hippocampal processing in recognition memory. **Hippocampus**, 2, 323-334.

Pan, W-X y McNaughton, N. (1997). The medial supramammillary nucleus, spatial learning and the frequency of hippocampal theta activity. **Brain Research**, 764, 101-108.

Pan, W.X y McNaughton, N. (2002). The role of the medial supramammillary nucleus in the control of hippocampal theta activity and behaviour in rats. **European Journal of Neuroscience**, 16, 1797-1809.

Pan, W.-X. y McNaughton, N. (2004). The supramammillary area: its organization, functions and relationship to the hippocampus. **Progress in neurobiology**, 74, 127-166.

Paxinos, G. y Watson, C. (1998). The rat brain in stereotaxic coordinates. **Academic Press**. Sydney.

Phineiro, S.H.; Zangrossi-Jr, H., Del-Ben, C.M. y Graeff, F.G. (2007). Elevated mazes as animal models of anxiety: effects of serotonergic agents. **Annais da Academia Brasileira de Ciências**, 79(1), 71-85.

Pires, R.G.W., Pereira, S.R.C., Oliveria-Silva, I.F., Franco, G.C. y Ribeiro, A. M. (2005). Cholinergic parameters and the retrieval of learned and relearned spatial information: a study using a model of Wernicke-Korsakoff Syndrome. **Behavioural Brain Research**, 162 (1), 11-21.



---

Poucet, B., Herrman, T. y Bubot, M.C. (1991). Effects of short-lasting inactivations of the ventral hippocampus and medial septum on long-term and short-term acquisition of spatial information in rats. **Behavioural Brain Research**, 44, 53-65.

Poucet, B. (1993). Spatial cognitive maps in animals: new hypotheses on their structure and neural mechanisms. **Psychological Review**, 100 (2), 163-182.

Quirk, G.J., Muller, R.U. y Kubie, J.L. (1990). The firing of hippocampal place cells in the dark depends on the rats recent experience. **Journal of Neuroscience**, 10, 2008-2017.

Ragozzino, M. E., & Kesner, R. P. (1998). The effects of muscarinic cholinergic receptor blockade in the rat anterior cingulate and Prelimbic/Infralimbic cortices on spatial working memory. **Neurobiologiae Learning and Memory**, 69(3), 241-257.

Ragozzino, M. E., Detrick, S., & Kesner, R. P. (1999). Involvement of the prelimbic infralimbic areas of the rodent prefrontal cortex in behavioural flexibility for place and response learning. **Journal of Neuroscience**, 19(11), 4585-4594.

Ragozzino, M. E., Wilcox, C., Raso, M., & Kesner, R. P. (1999). Involvement of rodent prefrontal cortex subregions in strategy switching. **Behavioural Neuroscience**, 113(1), 32-41.

Ragozzino, M. E., Kim, J., Hassert, D., Minniti, N., & Kiang, C. (2003). The contribution of the rat prelimbic-infralimbic areas to different forms of task switching. **Behavioural Neuroscience**, 117(5), 1054-1065.

Raisman, G., Cowan, W.M., Powell, T.P.S. (1966). An experimental analysis of the efferent projections of the hippocampus. **Brain**, 89, 83-108.

Ramos, J.M.J. (1998). Retrograde amnesia for spatial information: a dissociation between intra and extra-maze cues following hippocampus lesions in rats. **European Journal Neuroscience**, 10, 3295-3301.

---

Rank, J.B. (1984). Head-direction cells in the deep layers of dorsal presubiculum in freely moving rats. **Society for Neuroscience Abstracts**, 10, 599.

Reading, P.J., Dunnett, S.B. y Robbins, T.W. (1991). Dissociable roles of the ventral, medial and lateral striatum on the acquisition and performance of a complex visual stimulus-response habit. **Behavioural Brain Research**, 45, 147-161.

Rioja, J.; Santín, L.J.; García, M.; Doña, A.; De Pablos, L.; Cuadrado, M.J.; Alcalde, FJ; González-Barón, S. y Aguirre, JA. (2004). 5-HT<sub>1A</sub> receptor activation before acute stress counteracted the induced long-term. **Behavioural Effects**. Annals of the New York Academy of Sciences, 1018, 333-338-

Rioja, J.; Santín, L.J.; Doña, A.; De Pablos, L., Miñano, F.J.; González-Barón, S. y Aguirre, J.A (2006). 5-HT<sub>1A</sub> receptor activation counteracts c-Fos immunoreactivity induced in serotonin neurons of the raphe nuclei after immobilization stress in the male rat. **Neuroscience Letters**, 397, 190-195

Roland, J.J. y Savage, L.M. (2007). Blunted hippocampal, but not striatal, acetylcholine efflux parallels learning impairments in diencephalic-lesioned rats. **Neurobiologiae Learning and Memory**, 87, 123-132.

Rose, S.P. (1991). How chicks make memories: the cellular cascade from c-fos to dendritic remodelling. **Trends in Neuroscience**, 14 (9), 390-397.

Rosen, J.B. y Schulkin, J. (1998). From normal fear to pathological anxiety. **Psychological Review**, 105, 325-350.

Rothfeld, J.M, Harlan, R.E., Shivers, B.D. y Pfaff, D.W. (1986). Reversible disruption of lordosis via midbrain infusions of procaine and tetrodotoxin. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 25, 857-863.

---

Ruis, M.A.; Brake, J.H.; Buwalda, B.; De Boer, S.F.; Meerlo, P.; Korte, S.M.; Blokhuis, H.J. y Koolhaas, J.M. (1999). Housing familiar male wild-type rats together reduces the long-term adverse behavioural and physiological effects of social defeat. **Psychoneuroendocrinol**, 24, 285-300.

Sainsbury, R.S. (1998). Hippocampal theta: a sensory-inhibition theory of function. **Neuroscience Biobehavioural Review**, 22, 237-241.

Saint-Cyr, J.A, Taylor, A.E. y Lang, A.E. (1988). Procedural learning and neostriatal dysfunction in man. **Brain**, 111, 941-959.

Santacana, M.P., Peláez, R.A. y Tejedor, P. (1972). Effect of the lesion of the mammillary bodies on the performance in the open field. **Psychology and Behavior**, 9, 501-504.

Santín J.L., Rubio S., Begega A. y Arias J.L. (1999). Effects of mammillary body lesions on spatial reference and working memory tasks. **Behavioural Brain Research**, 102, 137-150.

Santín, L.J., Rubio, S., Begega, A., Miranda, R. y Arias, J.L. (2000). Aprendizaje espacial e hipocampo. **Revista de Neurología**, 31, 1-8.

Santín, L.J., Aguirre, J.A., Rubio, S., Miranda, R. y Arias, J.L. (2003). c-Fos expression in supramammillary and medial mammillary nuclei following spatial reference and working memory task. **Physiology and Behavior**, 78, 733-739.

Saravis, S., Sziklas, V., Petrides, m. (1990). Memory for places and the region of the mammillary bodies in rats. **European Journal of Neuroscience**, 2, 556-564.

Savage, L.M., Chang, Q. y Gold, P.E. (2003). Diencephalic damage decrease hippocampal acetylcholine release during spontaneous alternation testing. **Learning and Memory**, 10, 242-246.

---

Savage, L.M., Roland, J.J. y Klintsova, A.Y. (2007). Selective septohippocampal but not forebrain amygdalar-cholinergic dysfunction in diencephalic amnesia. **Brain Research**, 1139, 210-219.

Scoville, W. B. y Milner, B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, 20, 11-21.

Seki, M. y Zyo, K. (1989). Anterior thalamic afferents from the mammillary body and the limbic cortex in the rat. **Journal of Comparative Neurology**, 229, 242-256.

Shahidi, S., Motamedi, F., Bakeshloo, S.A. y Taleghani, B.K. (2004). The effect of reversible inactivation of the supramammillary nucleus on passive avoidance learning in rats. **Behavioural Brain Research**, 152, 81-87.

Shibata, H. (1987). Ascending projections to the mammillary nuclei in the rat: a study using retrograde and anterograde transport of wheat germ agglutinin conjugated to horseradish peroxidase. **Journal of Comparative Neurology**, 264, 205-215.

Silveira, M.C.L., Sandner, G. y Graeff, F.G. (1993). Induction of c-Fos immunoreactivity in the brain by exposure to the elevated plus-maze. **Behavioural Brain Research**, 56, 115-118.

Smith, D.M. y Mizumori, S.J. (2006). Hippocampal place cells, context, and episodic memory. **Hippocampus**, 9, 716-729.

Squire, L.R., Zola-Morgan, S., Cave, C.B., Haist, F., Musen, G. y Suzuki, N.A. (1990). Memory: organization of brain systems and cognition. **Cord. Spring. Harbor. Symp. Quart. Biol.**, 55, 1007-1023.

Squire, L.R., Knowlton, B. y Musen, G. (1993). The structure and organization of memory. **Annual Review of Psychology**, 44, 453-495.

Stewart, C.A. y Morris, G.M. (1993). The water maze. En: Sahgal, A. Ed. **Behavioural Neuroscience II**. Oxford University Press.

Su, H.-S. y Bentivoglio, M. (1990). Thalamic midline cell populations projecting to the nucleus accumbens, amygdala and hippocampus in the rat. **Journal of Comparative Neurology**, 297, 582-593.

Sutherland, R.J. y Rodríguez, A.J. (1989). The role of the fimbria and some related subcortical structures in place learning and memory. **Behavioural Brain Research**, 32: 265-277.

Sutherland, R.J. y Rudy, J.W. (1989). Configurational associative theory: the role of the hippocampal formation in learning, memory and amnesia. **Psychobiology**, 17, 129-144.

Sziklas, V. y Petrides, M. (1993). Memory impairments following lesions to the mammillary region of the rats. **European Journal of Neuroscience**, 5, 525-540

Sziklas, V., Petrides, M. y Leri, F. (1996). The effects of lesions to the mammillary region and the hippocampus on conditional associative learning by rats. **European Journal of Neuroscience**, 8, 106-115.

Sziklas, V. y Petrides, M. (1998). Memory and the region of the mammillary bodies. **Progression in Neurobiology**, 54, 55-70.

Tanaka, Y., Miiyazawa, Y., Akaoka, F. y Yamada, T. (1997). Amnesia following damage to the mammillary bodies. **Neurology**, 48, 160-165.

Tarpy, R.M. (1988). Aprendizaje y motivación. **Ed. Debate**. Madrid.

Taube, J.S, Muller, R.U. y Ranck, J.B. (1990). Head-direction cells recorded from the post-subiculum in freely moving rats. I. Description and quantitative analysis. **Journal of Neuroscience**, 10, 420-435.

Taube, J.S., Goodridge, J.P., Golob, E.J., Dudchenko, P.A. y Stackman, R.W. (1996). Processing the head direction cell signal: a review and commentary. **Brain Research Bulletin**, 40 (5/6), 477-486.

---

Thompson, R., Langer, S.K. y Rich, I. (1964). Lesions of the limbic system and short-term memory in albino rats. **Brain**, 87, 537-542.

Tobias, B., Wei-Ning, Z. y Feldon, J. (2001). The ventral hippocampus and fear conditioning in rats. **Experimental Brain Research**, 139, 39-52.

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

Tonkiss, J. y Rawlins, J.N.P. (1992). Mammillary body lesions and restricted subicular output lesions produce long-lasting DRL performance impairments in rats. **Experimental Brain Research**, 90, 572-582.

Treit, D. y Menard, J. (1997). Dissociations among the anxiolytic effects of septal, hippocampal, and amygdaloid lesions. **Behavioural Neuroscience**, 111, 653-658.

Vann, S.D.; Brown, M.W. Erichsen, J.T. y Aggleton, J.P. (2000). Using fos imaging in the rat to reveal the anatomical extent of the disruptive effects of fornix lesions. **Journal of Neuroscience**, 20, 8144-8152.

Vann, S.D y Aggleton, J.P. (2003). Evidence of a spatial encoding deficit in rats with lesions of the mammillary bodies or mammillothalamic tract. **Journal of Neuroscience**, 23 (8), 3506-3514.

Vann, S.D. y Aggleton, J.P. (2004). The mammillary bodies: two memory systems in one? **Nature Reviews**, 5, 1-11.

Vann, S.D. (2009). Re-evaluating the role of the mammillary bodies in memory. **Neuropsicología** (en prensa).

Vargha-Khadem, F., Gadian, D.G., Watkins, K.E., Connolly, A., Van Paesschen, W. y Mishkin, M. (1997). Differential effects of early hippocampal pathology on episodic and semantic memory. **Science**, 277, 376-380.

Vertes, R.P., (1981). An analysis of ascending brain stem systems involved in hippocampal synchronization and desynchronization. **Journal Neurophysiology**, 50, 48-58.

Vertes, R.P. (1988). Brainstem afferents to the basal forebrain in the rat. **Neuroscience**, 24, 907-935.

Vertes, R.P. (1992). PHA-L analysis of projections from the supramammillary nucleus in the rat. **Journal of Comparative Neurology**, 326, 595-622.

Vertes, R.P. y Kocsis, B. (1997). Brainstem-diencephalo-septohippocampal systems controlling the theta rhythm of the hippocampus. **Neuroscience**, 81 (4), 893-926.

Vertes, R.P y McKenna, J.T. (2000). Collateral projections from the supramammillary nucleus to the medial septum and hippocampus. **Synapse**, 38, 281-293.

Viana, M.B., Tomaz, C. y Graeff, F.G. (1994). The elevated T-maze: a new animal model of anxiety and memory. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 49, 549-554.

Vicens, P., Redolat, R. y Carrasco, M.C. (2003). Aprendizaje espacial y laberinto de agua: metodología y aplicaciones. **Psicothema**, 15, 539-544.

Victor, M., Adams, R.D. y Collins, G.H. (1971). The Wernicke-Korsakoff Syndrome. **Oxford: Blackwell.**

Wainer, B.H., Levey, A.I., Rye, D.B., Mensulam, M.M. y Mufson, E.J. (1985). Cholinergic and non-cholinergic septohippocampal pathways. **Neuroscience Letter**, 54, 45-52.

Waynfrth, H.B. y Flecknell, P.A. (1992). Experimental and surgical technique in the rat. **Ed. Academic Press.** Londres.

---

Weiss, C., Kronforst-Collins, M.A. y Diesterhoft, J.F. (1996). Activity of hippocampal pyramidal neurons during trace eyeblink conditioning. **Hippocampus**, 6, 192-209.

Wernicke, C. (1881). Lehr del Gerhirnkrankheiten. **Vol. II. Berlin: Thefore Fischer**, 411-428.

Whishaw I.Q. (1998). Place learning in hippocampal rats and the path integration hypothesis. **Neuroscience Biobehavioural Review**, 22, 209-220.

Wiebe, S.P. y Staubli, U.V. (2001). Recognition memory correlates of hippocampal theta cells. **Journal of Neuroscience**, 21, 3955-3967.

Whishaw, I.Q. y Mittleman, G. (1986). Visits to starts, routes and places by rats (*Rattus norvegicus*) in swimming pool navigation tasks. **Journal of Comparative Psychology**, 100, 422-431.

Wirstshafter, D., Stratford, T.R y Shim, I. (1998). Placement in a novel environment induces Fos-like immunoreactivity in supramammillary cells projections to the hippocampus and midbrain. **Brain Research**, 789, 331-334.

Wood, P.L., Cheney, D.L. y Costa, E. (1979). An investigation of whether septal gamma-aminobutyrate-containing interneurons are involved in the reduction in the turnover rate of acetylcholine elicited by substance P and beta-endorphin in the hippocampus. **Neuroscience**, 4, 1479-1484.

Wood, E.R., Dudchenko, P.A. y Eichenbaum, H. (1999). The global record of memory in hippocampal neuronal activity. **Nature**, 397, 613-616.

Woodnorth, M.-A. y McNaughton, N. (2002a). Benzodiazepine receptors in the medial-posterior hypothalamus mediate the reduction of hippocampal theta frequency by chlordiazepoxide. **Brain Research**, 954, 194-201.

Woodnorth, M.-A. y McNaughton, N. (2002b). Similar effects of medial supramammillary or systemic injections of chlordiazepoxide on both theta frequency



---

and fixed-interval responding. **Cognitive, Affective and Behavioral Neuroscience**, 2, 76-83.

Wouterlood F.G., Salada E. y Witter M.P. (1990). Projection from the nucleus reunions thalamic to the hippocampal region: light and electron microscopic tracing study in the rat with the anterograde tracer phaseolus vulgaris-leucoagglutinin. **Journal of Comparative Neurology**, 296, 179-203.

Xu, L., Anwyl, R. y Rowan, M.J. (1997). Behavioural stress facilitates the induction of long-term depression in the hippocampus. **Nature**, 387, 497-500.

Yanagihara, M., Niimi, K. y Ono, K. (1987). Thalamic projections to the hippocampal and entorhinal areas in the cat. **Journal of Comparative Neurology**, 266, 122-141.

Yoshida, K. y Oka, H. (1990). Topographical distribution of septohippocampal projections demonstrated by the PHA-L immunohistochemical method in rats. **Letter to Neuroscience**, 113, 247-252.

Young, B.J., Fox, G.D. y Eichenbaum, H. (1994). Correlates of hippocampal complex-spike cell activity in rats performing a non spatial radial maze task. **Journal of Neuroscience**, 14, 6553-6563.

Young, H.L., Stevens, A.A., Converse, E. y Mair, R.G. (1996). A comparison of temporal decay in place memory tasks in rats (*rattus norvegicus*) with lesions affecting thalamus, frontal cortex or the hippocampal system. **Behavioural Neuroscience**, 110 (6), 1244-1260.

Zangrossi-jr, H. y Graeff, F.G. (1997). Behavioral validation of the elevated T-maze, a new animal model of anxiety. **Brain Research Bulletin**, 44, 1-5.

Zhuravin, I.A. y Bures, J. (1991). Extent of the tetrodotoxin induced blockade examined by papillary paralysis elicited by intracerebral injection of the drug. **Experimental Brain Research**, 83, 687-690.

Zola –Morgan, S., Squire, L.R. y Amaral, D.G. (1989). Lesions of the hippocampal formation but not lesions of the fornix or the mammillary nuclei produce long-lasting memory impairment in monkeys. **Journal of Neuroscience**, 9, 898-913.

## AGRADECIMIENTOS

*En primer lugar, y de forma muy especial, quiero que estos agradecimientos sean para mis padres, porque en la vida todo se lo debo a ellos. No existen palabras que puedan explicar mi agradecimiento y lo que siento por ellos.*

*Gracias a mis hermanos, Jose M<sup>a</sup> y Agustín por el afecto, comprensión y apoyo incondicional que me dan en todo lo que hago en la vida.*

*A Abdel que siempre está a mi lado cuando más le necesito. Gracias por todo.*

*A mis cuñadas M<sup>a</sup> Teresa e Isabel y a mis sobrinos Jose M<sup>a</sup> y Daniel, que siempre me dan ánimo en todo.*

*A Luis Javier Santín por su confianza en mí y la dedicación prestada a este trabajo. Sin él ni hubiera aprendido nada del mundo de la investigación ni este trabajo se hubiera podido realizar, pero si se aprende con él por su indudable valía como profesional más te puede enseñar como persona.*

*Agradecer a Azucena su trabajo desde la distancia en esta investigación.*

*Dar las gracias a J. A. Aguirre por su colaboración.*

*Agradecer a Estrella, Eduardo y Jorge su paciencia conmigo; siempre compartimos las penas y alegrías del mundo de la psicología y de la investigación. Gracias por ser los mejores compañeros.*

*A todos mis amigos que tantos fines de semana han aguantado estoicamente mis charlas científicas sin enterarse de nada.*

*Gracias a todos los profesores y alumnos del departamento, porque siempre me han ayudado en este trabajo, y desde que comencé todos me han animado a seguir hacia delante.*