




VNIVERSITAT Q D VALÈNCIA

BID. T 6278

	UNIVERSITAT DE VALÈNCIA REGISTRE GENERAL ENTRADA
8 MAYO 2005	
N.º	61951
HORA	
OFICINA AUXILIAR NÚM. 4	

FACULTAT DE PSICOLOGIA
DEPARTAMENT DE PSICOBIOLOGIA

**AISLAMIENTO SOCIAL Y
APRENDIZAJE EN RATONES**
**NMRI: EFECTOS DE LA
ADMINISTRACIÓN DE
NICOTINA**

TESIS DOCTORAL

Presentada por

Inés Moragrega Vergara

Dirigida por

Dra. Rosa Redolat Iborra

Dra. Carmen Carrasco Pozo

2005

UMI Number: U607532

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U607532

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



ProQuest LLC
789 East Eisenhower Parkway
P.O. Box 1346
Ann Arbor, MI 48106-1346

CB 0661904054

1 19703673

9 17153414

A mi madre
A mi padre 'in memoriam'

A Jose

AGRADECIMIENTOS

Durante todo este tiempo he tenido la suerte de compartir momentos muy especiales con todas aquellas personas que han estado cerca en los años de realización de esta tesis y a las que deseo transmitir desde estas líneas mi más sincero agradecimiento.

En primer lugar me gustaría agradecer a mis tutoras, Rosa Redolat y Carmen Carrasco el gran apoyo, esfuerzo, paciencia y disponibilidad que me han demostrado en cada momento, además de su gran capacidad de trabajo sin la cual esta investigación no habría sido posible.

A mis compañeros de equipo, a los que todavía están y a los que ya se fueron por diversos motivos y a todos los que de una u otra manera han ayudado en los experimentos de esta Tesis Doctoral: Paloma, Chelo, Juan, Carmen Oterino, Carmen Gómez, Jose, Iris, Eugenia, Regise... fue un placer trabajar con ellos en el laboratorio, gracias.

A los profesores del Departamento de Psicobiología por sus enseñanzas, consejos, amistad y ánimo. A Ferran, que además de cuidar a los ratones, siempre nos cuida y enseña a todos. A mis compañeros de Doctorado por su amistad, charlas en los pasillos y alguna que otra salidilla nocturna (pocas, la verdad): Juan, Chus, Carmen Oterino, Chelo, Paloma, Miguel Ángel, Raquel, Estrella, Ana Martos, Ana Casinos, José Luis Payá, Marigel, Maribel...

Muchas gracias al profesor José Manuel Tomás por haberme prestado una valiosa y desinteresada ayuda en algunos de los análisis estadísticos de los experimentos que componen este trabajo.

A Chelo por darme la mano en mis primeros pasos en el laboratorio, por interesarse siempre en cómo iba todo, por ayudar en una y mil cosas, porque aunque ya no la tengo justo al lado y ahora es una madre ocupada, sé que puedo contar con ella.

A Sonia por su inmenso apoyo, ánimo y tremenda generosidad, gracias de corazón.

A Paloma por todos los años de amistad compartidos, por estar ahí siempre, por ayudarme y animarme en todo sin desfallecer y para que no desfalleciera yo, por ser un gran referente para mí en un amplio sentido, personal y profesionalmente. Me sobran los motivos...

A mis compañeros y amigos de trabajo: Rosario, Sacra, Pili, Jose, Pepe, Felipe, Cristina, Albert, Paqui...porque constantemente me han dado su apoyo, ánimo y amistad. Gracias. A Juan por apagar todos los fuegos que conseguían asustarme y poner soluciones, además de aguantarme en los malos momentos y ser un gran compañero con el que los silencios jamás molestan. Especialmente a M^a José, la generosidad en persona, por poner siempre por delante mis intereses, por su apoyo, paciencia, comprensión, cariño y fuerza. Dudo que sin ella este trabajo hubiera sido posible. Me faltan las palabras para agradecerle todo lo que ha hecho por mí, aún así, sirvan estas líneas para recordárselo.

A mis amigos, porque tengo la inmensa suerte de contar con unas personas que me animan y apoyan constantemente, y a las que últimamente el poco tiempo disponible me hace tener algo descuidadas, circunstancia que espero cambiar pronto: a Chus, Juan, Paloma Álvarez, Henar, Mario, Mamen, Francis, Carlos, Alfredo, Cristina, Julia... A *los de siempre*, mis amigos de Tortosa, con quienes la distancia no consigue hacer desaparecer el gran cariño que nos tenemos: Fede, Míriam, Núria, Xavi, Carlos, Elito, David, Cris, Paco, Núria, Jordi... También a Laura por su gran cariño, amistad y ejemplo y porque aún estando, jamás la siento lejos.

A mis primas, mujeres valientes y perseverantes donde las haya, por su ejemplo, cariño y ánimo siempre. A mi tía Alicia por ser ejemplo de lucha y de confianza.

A Rosita y José Antonio por su inmenso cariño, por haberme dado siempre palabras de aliento y haber creído en mí. A Eva, Rosana, Javi y Juanma, por ser personas magníficas, fáciles de querer, por acogerme siempre y ayudarme en todo. A

Javier, el peque, por hacerme pasar los momentos más divertidos durante este tiempo, por ser la alegría de la casa, que se vaya preparando que va a tener tía hasta en la sopa...

A mi hermano Juanan, que donde vaya sepa que la mejor carta de presentación es ser buena gente, como él.

A mi hermano David, porque con esfuerzo va a lograr todo lo que se proponga y porque siempre estaremos ahí, pase lo que pase.

A mi padre, porque pese a no entender mucho de qué iba esto que hacía su hija en el laboratorio, siempre tenía la pregunta en la boca *¿Com van els ratolins?* y porque sé que estaba orgulloso.

A mi madre, a quien le debo tanto, por su ejemplo de fortaleza y capacidad para salir adelante, por sacrificarse siempre y anteponer *mis cosas* aún en los momentos en que hubiera necesitado tenerme más cerca, gracias de corazón.

A Jose, mi otra parte, por todo.

**Esta tesis ha recibido la financiación de los
proyectos de investigación BSO2000-1194 y
BSN2003-02780 dirigidos por la Dra. Rosa
Redolat y financiados por el Ministerio de Ciencia
y Tecnología y Fondos FEDER**

I.- PRESENTACIÓN	17
II.- MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES EXPERIMENTALES	
1.- AISLAMIENTO SOCIAL EN ROEDORES	
1.1.-Consecuencias neurobiológicas del aislamiento	23
1.2.- Consecuencias conductuales del aislamiento	36
2.- NICOTINA	
2.1.- Farmacología de la nicotina	47
2.2.- Efectos neurobiológicos de la nicotina	
2.2.1.- Receptores nicotínicos cerebrales	50
2.2.2.- Nicotina y sistemas de neurotransmisión	55
2.3.- Efectos conductuales y cognitivos	64
2.4.- Nicotina y emocionalidad	70
3.- MODELOS DE APRENDIZAJE: LABERINTO DE AGUA Y CONDICIONAMIENTO DE EVITACIÓN ACTIVA.	
3.1.- Laberinto de agua de Morris	
3.1.1.- Descripción y procedimiento	74
3.1.2.- Bases neuroanatómicas y neuroquímicas	79
3.2.- Condicionamiento de evitación activa	
3.2.1.- Descripción y procedimiento	95
3.2.2.- Bases neuroanatómicas y neuroquímicas	104

4.- AISLAMIENTO, APRENDIZAJE Y EMOCIONALIDAD	117
III.- OBJETIVOS E HIPÓTESIS EXPERIMENTALES	129
IV.-DESCRIPCIÓN DE LOS ESTUDIOS EXPERIMENTALES	
<u>ESTUDIO 1: EFECTOS DEL AISLAMIENTO SOCIAL Y DE LA NICOTINA SOBRE EL APRENDIZAJE EN RATONES NMRI QUE DIFIEREN EN EL NIVEL DE AGRESIÓN.</u>	
INTRODUCCIÓN	143
1.-EXPERIMENTO 1: <i>APRENDIZAJE ESPACIAL</i>	
1.1.- MATERIAL Y MÉTODO	147
1.2.- RESULTADOS	163
1.3.- DISCUSIÓN	171
2.-EXPERIMENTO 2: <i>CONDICIONAMIENTO DE EVITACIÓN ACTIVA</i>	
2.1.- MATERIAL Y MÉTODO	177
2.2.- RESULTADOS	185
2.3.- DISCUSIÓN	208

**ESTUDIO 2: EFECTOS DEL AISLAMIENTO Y DE LA NICOTINA
SOBRE EL APRENDIZAJE EN RATONES NMRI QUE DIFIEREN EN
EL NIVEL DE ANSIEDAD**

INTRODUCCIÓN	217
3.- EXPERIMENTO 3: <i>APRENDIZAJE ESPACIAL</i>	
3.1.- MATERIAL Y MÉTODO	219
3.2.- RESULTADOS	229
3.3.- DISCUSIÓN	237
4.- EXPERIMENTO 4: <i>CONDICIONAMIENTO DE EVITACIÓN ACTIVA</i>	
4.1.- MATERIAL Y MÉTODO	241
4.2.- RESULTADOS	250
4.3.- DISCUSIÓN	274
V.- DISCUSIÓN GENERAL	283
VI.- CONCLUSIONES	297
VII.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	301

I.- PRESENTACIÓN

I.- PRESENTACIÓN

La presente Tesis tiene como tema central el estudio de los efectos del aislamiento social y de la administración de nicotina sobre el aprendizaje en ratones NMRI. Además, se pretende evaluar si los posibles efectos de la nicotina en dicho aprendizaje podrían estar modulados por variables de tipo emocional (nivel de ansiedad y agresividad).

De acuerdo con este objetivo, el presente trabajo se ha dividido en 8 capítulos. En el primer capítulo se realiza una breve presentación de los contenidos incluidos en la presente Tesis Doctoral. En el segundo capítulo se plantea el marco teórico de la misma, exponiendo en primer lugar una revisión acerca de los principales efectos del aislamiento social en roedores tanto a nivel neurobiológico como conductual. A continuación se describe la farmacología de la nicotina y sus efectos conductuales. Seguidamente se exponen los dos modelos de aprendizaje utilizados en los experimentos realizados: el laberinto de agua y la prueba de evitación activa. Por último, se incluye un apartado que intenta plantear la relación entre aislamiento, capacidad de aprendizaje y nivel de emocionalidad, así como el posible papel modulador de la nicotina en dicha relación.

Tras delimitar el marco teórico, se establecerán los objetivos e hipótesis experimentales en el capítulo III. El capítulo IV se dedica a presentar la parte experimental del presente trabajo, exponiendo los dos estudios realizados con el objetivo de contrastar nuestras hipótesis experimentales. El primer estudio analiza los efectos de las condiciones de alojamiento y de la administración de nicotina sobre diferentes tareas de aprendizaje en ratones NMRI que difieren en su nivel basal de agresividad. Este estudio consta de un primer experimento en el que se utiliza el laberinto de agua de Morris y de un segundo experimento en que empleamos el condicionamiento de evitación activa. Los datos obtenidos en este primer experimento han dado origen a una publicación en la revista *Behavioral Brain Research* : “*Spatial learning in male mice with different levels*

of aggressiveness: effects of housing conditions and nicotine administration”.
2003; 147:1-8.

En el segundo estudio se evalúan los efectos del aislamiento y de la administración de nicotina en el aprendizaje de ratones NMRI que difieren en el nivel basal de ansiedad. Este estudio comprende dos trabajos experimentales (Experimentos III y IV). En el tercer experimento estudiamos el aprendizaje espacial con el laberinto de agua y en el último experimento la adquisición del condicionamiento de evitación activa, comparando grupos de ratones con niveles bajo, moderado o alto de ansiedad.

En el capítulo V se discuten los resultados obtenidos en los distintos experimentos y en el capítulo VI se resumen las conclusiones más relevantes del presente trabajo. Finalmente, en el capítulo VII se recogen las referencias bibliográficas de las citas que aparecen a lo largo de todo el trabajo.

***II.- MARCO TEÓRICO Y
ANTECEDENTES
EXPERIMENTALES***

1.- AISLAMIENTO SOCIAL

La idea básica de que ciertos aspectos del ambiente, especialmente en fases tempranas de la vida, pueden tener consecuencias importantes para el desarrollo adulto posterior es común en muchas teorías del desarrollo y del aprendizaje. En etapas críticas del desarrollo, el establecimiento de los circuitos neurales va a depender de las interacciones específicas entre el organismo y el ambiente. Es ampliamente conocido que las condiciones ambientales en los períodos previos o inmediatamente posteriores al destete ejercen efectos complejos y duraderos sobre la reactividad emocional y capacidades de aprendizaje mostradas posteriormente por los animales durante su etapa adulta (Valencia-Alfonso y cols., 2004). Evidencias experimentales indican que las condiciones de alojamiento pueden tener consecuencias emocionales y neurobiológicas en roedores, influir en las respuestas neuroendocrinas y en la sensibilidad a algunos fármacos así como en la respuesta a diferentes estímulos ambientales (Moncek y cols., 2004). Además, se ha comprobado que los cambios conductuales y fisiológicos provocados a largo plazo por las alteraciones sociales tempranas, se hacen más patentes bajo condiciones que implican algún tipo de novedad o desafío para el animal, así como en situaciones estresantes y que tienden a provocar reacciones emocionales (McEwen, 2000).

En roedores, el aislamiento social es uno de los métodos más utilizados para evaluar el impacto de las variables ambientales tanto sobre el desarrollo como sobre la conducta. En modelos animales se ha demostrado que las experiencias tempranas pueden modificar el comportamiento a largo plazo; aunque este tipo de efectos son todavía objeto de considerable debate en sujetos humanos (Valencia-Alfonso y cols., 2004).

El procedimiento de aislar a los animales consiste, generalmente, en mantener a los sujetos alojados individualmente durante un período determinado de tiempo, el cual puede oscilar desde días hasta meses en función del modelo

animal empleado en la investigación y del procedimiento seguido en el experimento. Asimismo, cabe señalar que el aislamiento se puede iniciar en distintos momentos del ciclo vital, habiéndose observado que cuando dicho procedimiento comienza después del destete puede provocar cambios profundos en el desarrollo posterior de los animales (Sánchez y cols., 1998). En estos casos hablaríamos de “cría en aislamiento” (*isolation rearing*) que conviene diferenciar del llamado “aislamiento social” (*isolation housing*) cuando los animales se alojan individualmente en una etapa posterior (Hellemans y cols., 2004).

Para especies gregarias como las ratas, el contacto social es probablemente una primera necesidad, por lo que la privación social o la cría en aislamiento es más probable que produzca trastornos endocrinos y conductuales más graves, al resultar una experiencia estresante en gran medida. En este sentido, el aislamiento social también se ha aplicado y considerado como un método para inducir estrés en los animales y su uso se ha hecho extensivo al estudio de alteraciones como la esquizofrenia (Powell y cols., 2003; Leng y cols., 2004) y los trastornos del estado de ánimo (Lapiz y cols., 2003; Schrijver y cols., 2004).

Hay que tener en cuenta que el aislamiento es un fenómeno mucho más complejo que la simple separación de los animales de sus co-específicos; los animales aislados viven en un ambiente empobrecido y pueden mostrar una amplia variedad de cambios fisiológicos (Heidbreder y cols., 2000) y conductuales (Weiss y cols., 2001; Hellemans y cols., 2004). Se ha sugerido que, al menos, tres variables diferentes podrían estar implicadas en las posibles consecuencias del aislamiento social: 1) La privación maternal a la que se ven sometidos los animales y que puede regular ciertas conductas posteriores (por ejemplo, del eje hipotálamo-hipófiso-adrenal (HHA); 2) La separación de los co-específicos que les priva del contacto social; y 3) La posibilidad de que el aislamiento se convierta en estresor crónico (Sánchez y cols., 1998). En este sentido, diversas evidencias señalan la existencia de un estrés que provoca el aislamiento *per se* al evidenciarse diversos cambios endocrinos en los animales aislados (Sánchez y cols., 1998; Bartolomucci y cols., 2003) los cuales

señalaremos con mayor detalle más adelante. Nos parece necesario resaltar que el aislamiento es un fenómeno global donde pueden interactuar cada una de las variables señaladas, y sus consecuencias pueden no ser las mismas que para cada una de dichas variables por separado, provocando efectos característicos y específicos que conforman el llamado “síndrome de aislamiento”, cuyas particularidades expondremos en el siguiente apartado. A continuación presentaremos una revisión de los cambios más importantes que tienen lugar tras el aislamiento social en roedores, tanto a nivel neurobiológico como conductual.

1.1.- CONSECUENCIAS NEUROBIOLÓGICAS DEL AISLAMIENTO.

Se han descrito diferentes alteraciones neurobiológicas como consecuencia del aislamiento social en roedores, aunque dependiendo en parte del periodo de alojamiento individual. A continuación, se presenta una revisión de los principales cambios, descritos tanto a nivel de sistemas de neurotransmisión como a nivel neuroendocrino, además de otros efectos fisiológicos.

Cambios en diferentes sistemas de neurotransmisión

Serotonina: La mayor parte de estudios sobre los efectos del aislamiento en el sistema serotoninérgico se relacionan con la conducta agresiva que expresan los animales sometidos a este régimen de alojamiento (Van der Vegt y cols., 2001 y 2003; Sakaue y cols., 2002). Generalmente se observa que el aislamiento da lugar a una reducción en el metabolismo de la serotonina (5-HT) que depende tanto del periodo de aislamiento como de la estructura cerebral evaluada (Rilke y cols., 1998a; Schiller y cols., 2003), aunque algunos estudios también han encontrado incrementos en dicho metabolismo. Tras el aislamiento en ratas se observó un descenso del ratio 5-HIAA/5-HT en el núcleo accumbens, estructura de reconocida implicación en el refuerzo (Jones y cols., 1992). Heidbreder y

colaboradores (2000) también mostraron un descenso significativo en los niveles basales de 5-HT en el núcleo accumbens, reducción que podría explicar, junto con alteraciones dopaminérgicas, la hiperactividad mostrada por ratas aisladas. Otros autores han demostrado que el aislamiento altera la actividad de los receptores presinápticos 5-HT_{1B} en el hipocampo pero no la de los receptores postsinápticos 5-HT_{1A} (Muchimapura y cols., 2003).

Los efectos del aislamiento en los receptores serotoninérgicos podrían depender de la duración del mismo, aunque la persistencia en el decremento observado en el hipocampo puede indicar una continua pérdida o daño neuronal (Schiller y cols., 2003). Después de 4 semanas de aislamiento la densidad de los receptores 5-HT_{1A} disminuyó especialmente en las áreas corticales lateral frontal, parietal y entorrinal, en el hipocampo y giro dentado, y en los núcleos basolateral, basomedial, central y medial de la amígdala, además del hipotálamo. Asimismo los receptores 5-HT_{2A} se redujeron considerablemente en la corteza frontal, el hipocampo, y los núcleos accumbens y estriado. Sin embargo, Schiller y colaboradores (2003) observaron que tras 12 semanas de aislamiento continuaba disminuida la densidad del 5-HT_{1A} en el hipocampo y en la corteza pero se apreciaba una recuperación en la amígdala; en cuanto a las densidades del receptor 5-HT_{2A} se encontró una recuperación en la corteza, hipocampo, estriado y núcleo accumbens.

Acetilcolina: Respecto a las posibles alteraciones neuroquímicas que subyacen a un período de aislamiento social, los cambios en la neurotransmisión colinérgica han sido poco estudiados. Las primeras investigaciones fueron llevadas a cabo por el equipo de Rosenzweig, quien en los años 70 evaluó el impacto del aislamiento sobre la actividad de la acetilcolinesterasa (AChE) y señaló que la actividad de la AChE por unidad de tejido cerebral es mayor en animales aislados que en animales cuidados en ambiente enriquecido en todas las especies testadas. Por su parte, Greenough y sus colaboradores a finales de esa misma década demostraron la existencia de morfologías neuronales alteradas tras

el aislamiento (en Lehmann y cols., 2004). En otro estudio se observó un déficit significativo en la unión de la Acetilcolina (ACh) con su receptor, y en consecuencia, un aumento de la ACh cortical libre en ratones aislados, cambios que son consistentes con una reducida eficiencia en la síntesis y el almacenamiento colinérgico (Esmann, 1971). No obstante, en una investigación reciente cuyo objetivo era observar si se producían efectos diferenciales entre ratas aisladas y agrupadas en el nivel de ACh, tanto basal como tras la administración de anfetamina, no se encontraron diferencias en los niveles basales de dicho neurotransmisor dependientes de las condiciones de alojamiento (Leng y cols., 2004). Estos datos estarían de acuerdo con los hallados por Jones y colaboradores (1991), que tampoco muestran diferencias en el nivel de acetilcolintransferasa (AChT) en el córtex prefrontal de las ratas aisladas y agrupadas del grupo control. En este sentido, la administración de anfetamina incrementó el nivel colinérgico de ambos grupos, tanto en aislamiento como en alojamiento social (Leng y cols., 2004).

También se han evaluado las consecuencias del aislamiento social en roedores sobre el sistema colinérgico considerando la posibilidad de que el deterioro en las funciones colinérgicas observado en la esquizofrenia se mimetizara en el modelo animal de cría en aislamiento (Lehmann y cols., 2004). Sus resultados indican que la cría en aislamiento incrementa la densidad de las fibras colinérgicas en el córtex prefrontal del hemisferio izquierdo y en el córtex entorrinal del hemisferio derecho, pero no se hallan efectos contralaterales. Estos autores concluyen que la densidad de las fibras colinérgicas se encuentra regulada diferencialmente según las áreas corticales y que su plasticidad está muy relacionada con la intervención de varios sistemas moduladores.

El sistema colinérgico desempeña un importante papel en las funciones de aprendizaje y memoria, y el aislamiento puede alterar la actividad colinérgica, la reactividad a fármacos colinérgicos como la nicotina (Cheeta y cols., 2001), e incluso anticolinérgicos como la escopolamina (Wongwitdecha y Marsden, 1996a). Estos autores señalan que la escopolamina deterioró la tarea del laberinto

de agua en animales agrupados, pero no afectó la ejecución de las ratas aisladas, sugiriendo una menor sensibilidad a los efectos de los fármacos anticolinérgicos en los animales mantenidos en aislamiento.

GABA: En general, parece que tras un periodo de aislamiento se observan decrementos en los niveles gabaérgicos. Sherif y Oreland (1995) reportan que tras dos semanas de aislamiento, la conducta exploratoria se suprimía en el laberinto elevado y en el campo abierto. Recurrieron a la administración de vigabatrina (antiepiléptico que aumenta los niveles de GABA inhibiendo la función de la GABA-transaminasa) para observar los cambios que se producían en los tests de ansiedad y encontraron que en el *plus maze* aumentó la exploración en aislados y agrupados; en cambio en el campo abierto, únicamente incrementó la conducta exploratoria en las ratas aisladas. Podría decirse que el aislamiento potencia la eficacia ansiolítica de la vigabatrina. Guidotti y colaboradores (2001) indican que el aislamiento social provoca una resistencia a los efectos ansiolíticos directos o indirectos de los fármacos que mimetizan la acción gabaérgica, como el pentobarbital; además, en aislados el sueño inducido por esta droga es menor que en los agrupados (Dong y cols., 1999). Serra y colaboradores (2000) aportan que en los cerebros de ratas aisladas se hallan una reducción en la función de los receptores GABA_A asociada con descensos en las concentraciones de neuroesteroides. Señalan una menor eficacia del diazepam en ratas aisladas, congruentemente con los resultados que señalan Wongwitdecha y Marsden (1996b) en el test de interacción social. En un estudio más reciente, el equipo de Serra (2004) ha encontrado que el aislamiento en ratas incrementa la respuesta de los receptores benzodiazepínicos periféricos, lo que puede reflejar una mayor sensibilidad a estos receptores provocada por el aislamiento social.

Noradrenalina: Tras el aislamiento se ha descrito, tanto *in vivo* como *in vitro*, un aumento de la función de los receptores α_2 en el hipocampo dorsal (Fulford y Marsden, 1997ab). También se ha observado un aumento de la

conducta exploratoria de la rata tras la administración de una neurotoxina (DSP-4) que reduce los niveles centrales de noradrenalina al destruir selectivamente las proyecciones desde el núcleo accumbens (Lapiz y cols., 2001). Además, el aislamiento parece disminuir la función noradrenérgica pre-sináptica en el hipocampo, pero la eleva en la amígdala (Lapiz y cols., 2003). Diversos estudios sugieren que en el sistema atencional se producen efectos diferenciales dependiendo del régimen de alojamiento (Lapiz y cols., 2000, 2001). En ratas aisladas se observan cambios que sugieren una mayor atención hacia el ambiente general que ante estímulos específicos. Estos cambios se agudizan con la aplicación de la neurotoxina DSP-4 indicando una mayor vulnerabilidad de las ratas aisladas a la reducción noradrenérgica (Lapiz y cols., 2000).

Dopamina: Muchos de los cambios conductuales inducidos por el aislamiento se han relacionado con modificaciones en la función del sistema dopaminérgico mesolímbico (Robbins y cols., 1996). En particular, la hiperreactividad conductual a los estímulos activadores se ha vinculado con un incremento en la liberación de dopamina en el estriado dorsal y ventral.

Es ampliamente conocido que las experiencias tempranas de estrés pueden alterar la sensibilidad al refuerzo y a los estímulos aversivos tanto en animales como en humanos. El aislamiento después del destete provoca un incremento en las respuestas conductuales tanto a los reforzadores primarios como a los estímulos que inducen recompensa (Jones y cols., 1990). Un estrés agudo o a corto plazo como puede ser el aislamiento social parece incrementar la motivación hacia la búsqueda de refuerzo (Coudereau, 1999). Se ha sugerido que los cambios en la sensibilidad a la recompensa pueden convertirse en una respuesta adaptativa del organismo que le permite mantener sus necesidades cubiertas y mantener un equilibrio entre experiencias positivas y negativas. Por ejemplo, el estrés provoca en el animal una mayor reactividad, probablemente para compensar el estado negativo. Ello se aprecia claramente en los animales aislados que muestran una mayor preferencia por un ambiente novedoso (Sahakian y cols., 1977; Hall y

cols., 1997a) o por el agua azucarada y la comida (Hall y cols., 1997ab) aunque parece ser que bajo circunstancias menos estresantes la sensibilidad al refuerzo desciende de nuevo.

Según otras investigaciones las ratas aisladas responden más a estímulos asociados con la recompensa (Coudereau, 1999). Estudios post-mortem han encontrado en ratas aisladas un incremento en las concentraciones de dopamina en la corteza prefrontal (Matsuda y cols., 2001) así como niveles elevados de dopamina en el núcleo accumbens (Hall y cols., 1998). Los datos neuroquímicos disponibles indican claras alteraciones de los animales criados en aislamiento en la función presináptica de la dopamina, pero no son tan concluyentes respecto a la función postsináptica (Powell y cols., 2003). En otras investigaciones se ha encontrado un marcado deterioro de la inervación dopaminérgica mesocortical en animales privados de interacción social y se hipotetiza que el deterioro dendrítico observado en la corteza prefrontal puede estar ocasionado, al menos en parte, por una disfunción dopaminérgica (Pascual, 2002). Sin embargo, en un estudio reciente, no se observaron alteraciones en los receptores D2 en ratas después de 2 meses de aislamiento (Del Arco y cols., 2004).

Opiáceos endógenos: El aislamiento, al igual que la derrota social, induce una activación del sistema de opiáceos endógenos (Smith y cols., *in press*). Los ratones aislados parecen ser menos sensibles a los efectos de la analgesia inducida por opiáceos y tienden a autoadministrarse cantidades mayores de morfina y de heroína que los animales agrupados (Coudereau y cols., 1997a; Broseta y cols., 2005). En el condicionamiento de preferencia de lugar (CPL) se observó un deterioro en el aprendizaje de las propiedades reforzantes de la metanfetamina (Wogwitdecha y Marsden, 1995) y también de la morfina (Wongwitdecha y Marsden, 1996c). En este mismo sentido, Coudereau y colaboradores (1997b) encontraron que una dosis de 100 mg/kg de morfina no indujo el CPL en los ratones aislados y sí lo hizo en agrupados a una dosis de 8 mg/kg, aunque este deterioro fue reversible al reagrupar a los animales. El aislamiento también

deterioró la eficacia reforzante de la cocaína por vía intravenosa (Phillips y cols., 1994a) o de la *d*-anfetamina intra-accumbens (Phillips y cols., 1994b). Se han sugerido diversas hipótesis para explicar los posibles mecanismos implicados en las diferencias de las propiedades reforzantes de las drogas de abuso en ratones aislados y agrupados. Ratones NMRI aislados mostraron una alta preferencia por el consumo de agua azucarada (Coudereau y cols., 1999). Esta preferencia podría ser explicada, al menos en parte, por una alteración en la liberación de dopamina en los animales aislados, aunque no puede descartarse la implicación de otros sistemas de neurotransmisión como la serotonina al encontrarse un descenso del ratio 5-HIAA/5-HT en el núcleo accumbens, estructura de reconocida implicación en el refuerzo (Jones y cols., 1992). Una segunda hipótesis podría ser que el metabolismo (o la absorción) de la morfina y su transporte a través de la barrera hematoencefálica fuera diferente en ratones aislados que en agrupados; Coudereau y colaboradores (1999) encontraron niveles de morfina y de uno de sus metabolitos (M3G) más bajos en ratones aislados que en agrupados, lo que indica que es posible que el aislamiento provoque una diferente predisposición a las sustancias de abuso. En un estudio reciente, Smith y colaboradores (*in press*) no han encontrado diferencias en la CPL inducida por morfina entre ratones aislados y agrupados en ambiente enriquecido, aunque sí obtienen evidencias que sugieren una densidad reducida de los receptores opiodes μ tras un período de aislamiento de 6 semanas desde los 21 días de edad sugiriendo que probablemente, en respuesta al ambiente social, tienen lugar múltiples adaptaciones celulares. Una tercera posibilidad es que el aislamiento deteriore la capacidad de los ratones aislados para asociar la textura del suelo de la caja de CPL con el refuerzo de la morfina; hipótesis que no parece tener suficiente base puesto que el aislamiento no provoca un déficit generalizado en el aprendizaje al no mostrarse deterioro ni en el laberinto de agua (Wongwitdecha y Marsden, 1996a) ni en la prueba de evitación pasiva (Coudereau y cols., 1997b). Recientemente, Broseta y colaboradores (2005) obtienen en ratones aislados menores signos de dependencia a la morfina que los ratones agrupados. Parece que los animales alojados individualmente poseen un nivel más elevado de opiáceos endógenos, que les

hace menos sensibles a los efectos de la morfina, tolerar mayores cantidades y requerir mayor cantidad de droga para obtener los mismos efectos.

Los desequilibrios neuroquímicos producidos por el aislamiento parecen contribuir a la respuesta exagerada de las ratas aisladas a los estímulos novedosos o peligros potenciales, así como provocar una amplia variedad de cambios conductuales (Lapiz y cols., 2003). Los estudios del equipo de Schiller y sus colaboradores (2003) señalan que se trata de cambios adaptativos dependientes del periodo de aislamiento y de la estructura cerebral modificada.

Cambios neuroendocrinos

Las características y la cantidad de individuos con los que se convive parecen tener un fuerte impacto sobre las reacciones frente al estrés. El estrés crónico generado por las condiciones inadecuadas de alojamiento (hacinamiento, inmovilidad, aislamiento social) puede provocar cambios a largo plazo en la regulación de los sistemas hipotálamo-hipófiso-adrenal (HHA): hipercortisolemia, aumento en la capacidad de síntesis de esteroides, sensibilidad de las glándulas adrenales a la ACTH, la CRH y la vasopresina (Valencia-Alfonso y cols., 2004).

En los estudios respecto a las posibles alteraciones en el eje HHA tras el aislamiento se obtienen resultados conflictivos. Sánchez y colaboradores (1995, 1998) han descrito una hipofuncionalidad de dicho eje neuroendocrino tras el aislamiento al observar una reducción de la corticosterona basal en las ratas aisladas. También detectaron una actividad reducida de las neuronas del núcleo paraventricular del hipotálamo (NPV) y del área preóptica lateral (APL), aunque no fue así en estructuras adyacentes. Tras la estimulación de la amígdala medial también hallaron respuestas alteradas en dichos núcleos. Estos resultados, junto con los cambios del eje HHA, sugieren una alteración del eje límbico-hipotálamo-hipófiso-adrenal tras periodos de aislamiento como resultado de una alteración del

sistema límbico, específicamente en la amígdala y sus vías hacia el NPV (Sánchez y cols., 1995). No obstante, tras el aislamiento social en ratas, otros autores encuentran un incremento en la activación del eje HHA que finalmente se traduce en una mayor secreción de glucocorticoides suprarrenales, con la consiguiente hipercortisolemia. Esta sobreactivación neuroendocrina puede tener como consecuencia una disminución significativa de receptores para los glucocorticoides en las neuronas hipocampales (Pascual, 2002).

Un aumento sostenido de glucocorticoides se ha relacionado con atrofia dendrítica y muerte neuronal en algunas regiones del hipocampo, como la CA3 (Magariños y cols., 1997) y además ha demostrado ir acompañado de déficits cognitivos en el aprendizaje y memoria relacional o declarativa (McEwen, 2000) y puede ser el resultado de un estrés psicosocial grave y prolongado. Asimismo, es probable que las secuelas por experiencias traumáticas sean ocasionadas por un incremento de glucocorticoides circulantes, generando finalmente alteraciones en el desarrollo neuronal. Los glucocorticoides modulan también la excitabilidad de las neuronas hipocampales de manera reversible y bifásica, por lo que influyen sobre la magnitud de la potenciación a largo plazo y también son capaces de provocar depresión a largo plazo (Valencia-Alfonso y cols., 2004). Se ha demostrado que los efectos acumulativos de daño hipocampal por corticosteroides ocasionan anormalidades endocrinas, alteraciones cognitivas y una mayor vulnerabilidad frente a episodios futuros de enfermedad, especialmente de tipo emocional (Valencia-Alfonso y cols., 2004). Los déficits sobre la memoria episódica y espacial dependerán, en gran medida, de la intensidad y duración de la exposición a los acontecimientos estresantes.

Sin embargo, también se ha observado que la corticotropina, los glucocorticoides, la vasopresina, la epinefrina y la norepinefrina, a dosis bajas, pueden tener un efecto facilitador de la memoria, aunque a dosis altas la impidan (McGaugh, 2002). Por ejemplo, se han descrito como efectos de la CRH (hormona liberadora de corticotropina) un descenso en la exploración de ambientes desconocidos, pero un aumento de la actividad en ambientes familiares,

incrementos en el condicionamiento de miedo y alteraciones en aprendizaje y memoria (Steckler y Holsboer, 1999). Asimismo, como respuesta adaptativa a la amenaza, la CRH aumenta el conjunto de conductas relacionadas con la lucha y la supervivencia. En este sentido, Haller y Hálasz (1999) demostraron que un estresor suave diario tenía efectos protectores contra los efectos del aislamiento. Parece que las respuestas frente al estrés son un intento del organismo de mantener la homeostasis. Las respuestas a un estrés agudo o suave pueden ser interpretadas como beneficiosas o con propiedades reforzantes para el individuo (Valencia-Alfonso y cols., 2004). En general, se acepta que un grado de estrés excesivo puede llegar a provocar efectos perjudiciales, como daño neuronal o déficit de aprendizaje y memoria, mientras que un grado de estrés ligeramente elevado puede favorecer las funciones cognitivas y no causar daños en la población neuronal (de Kloet, 2000). Una explicación plausible para este hecho podría ser que la memoria se halla regulada por los corticosteroides de manera dosis-dependiente en forma de U invertida (Moncek y cols., 2004), y la ejecución óptima sucede cuando las concentraciones de corticosterona se encuentran en el pico de la curva.

Cambios en la sensibilidad a fármacos

El impacto del aislamiento y las condiciones de alojamiento de los animales en la eficacia de los fármacos y otras sustancias psicoactivas es considerado actualmente un tema de gran relevancia del que se derivan implicaciones tanto teóricas como prácticas. Es bien conocido en roedores, que una experiencia social temprana puede modificar los efectos conductuales de algunos fármacos (Cheeta y cols., 2001; Smith y cols., 2003). En este sentido, recientemente se ha enfatizado en la necesidad de prestar atención a las condiciones de alojamiento previamente a la administración de fármacos o de cualquier *test* conductual (Karolewicz y Paul, 2001; Majercsik y cols., 2003). Obviamente, los efectos tan discutidos de las diferencias individuales, así como el tipo de estresor y la sensibilidad ambiental al mismo interfieren con el efecto de los fármacos (Jähkel y cols., 2000).

Karolewicz y Paul (2001) señalan que los ratones alojados individualmente presentan menor sensibilidad a los efectos de fármacos antidepresivos en la prueba de natación forzada y en la prueba de suspensión por la cola (*tail suspension test*) que aquellos alojados en grupo. Haller y colaboradores (2000) en un estudio con buspirona indican que el aislamiento parece ser un factor que incrementa la eficacia de los fármacos serotoninérgicos. Majercsik y colaboradores (2003) también hallan efectos diferenciales en los efectos de la buspirona entre ratas aisladas y agrupadas, siendo mayor el efecto ansiolítico en ratas aisladas. En este mismo sentido, estudios previos señalaban que los efectos conductuales de distintos fármacos serotoninérgicos se veían aumentados considerablemente por períodos de aislamiento de diferentes duraciones (Wright y cols., 1991; Motta y cols., 1992; Fone y cols., 1996). También se ha señalado que las experiencias sociales anteriores alteran los efectos del clordiazepóxido sobre el comportamiento agresivo en ratones macho y que ratones criados para presentar una agresividad alta o baja presentan diferencias en la sensibilidad a este fármaco (Ferrari y cols., 1997). Jähkel y colaboradores (2000) también encontraron una respuesta al diazepam influenciada por las condiciones de alojamiento: en ratones seleccionados por su alta actividad, aislados durante 3 o 6 semanas dicho fármaco provocó un aumento en su actividad motora. Previamente, Wongwitdech y Marsden (1996b) habían señalado que el aislamiento modificaba la respuesta al diazepam, aunque éste disminuía la conducta agresiva provocada por la cría en aislamiento.

Generalmente, se ha propuesto que los animales aislados son hiperactivos en respuesta a un ambiente novedoso aunque los resultados encontrados son dispares. Algunos investigadores han señalado que los animales aislados no parecen diferir con los agrupados respecto a los efectos locomotores de los psicoestimulantes (Jähkel y cols., 2000; Weiss y cols., 2001); sin embargo, otros autores han sugerido que las ratas aisladas son más sensibles a los efectos de algunos de ellos (Jones y cols., 1992; Hall y cols., 1998; Howes y cols., 2000). Por ejemplo, en un estudio de Bardo y colaboradores (1995) los animales aislados incrementaron la

susceptibilidad a desarrollar sensibilización a los efectos de la anfetamina tras repetidas inyecciones.

Otros cambios neurobiológicos

Se han descrito cambios en estructuras cerebrales tras diferentes periodos de aislamiento social. En una investigación acerca de los efectos del aislamiento en el cerebelo de ratas Sprague-Dawley se demuestra que las experiencias tempranas adversas, alteran de manera permanente el desarrollo estructural de las células de Purkinje, hipotetizándose que el deterioro cerebeloso podría ser uno de los sustratos neuroanatómicos involucrados en los trastornos provocados por experiencias tempranas adversas, como el aislamiento social (Pascual, 2001). En un trabajo posterior, se observó que las ratas aisladas mostraron un menor porcentaje de dendritas en la corteza prefrontal, asociado a un incremento de la expresión del péptido intestinal vasoactivo que actúa como factor promotor de la diferenciación y plasticidad neuronal, por lo que es posible que su incremento sea un mecanismo compensatorio para minimizar los potenciales efectos del aislamiento sobre el desarrollo dendrítico (Pascual, 2002). Además, también se ha demostrado un deterioro en la arborización dendrítica, modificaciones en el número de sinapsis por neurona, una disminución significativa de neuronas gabaérgicas, y una reducción significativa de la innervación catecolaminérgica (Pascual y cols., 2003). La corteza prefrontal participa en la regulación del estado emocional del individuo (LeDoux, 2000) y su disfunción podría dar cuenta de distintas alteraciones emocionales como los trastornos de ansiedad. De este modo se sugiere que un entorno social no favorable podría generar alteraciones permanentes en la corteza prefrontal, asociadas a trastornos del comportamiento emocional (Pascual y cols., 2003).

Se han observado también diversos cambios fisiológicos en animales aislados, como alteraciones en el control de la temperatura corporal (Kim y Kirpatrick, 1996) e incluso hay algún modelo animal que provoca hipertermia por

estrés en ratones y se interpreta en términos de miedo anticipatorio debido un acontecimiento aversivo. Se ha observado que el aislamiento de 1, 5 o 15 días no es suficiente para inducir un aumento de la temperatura basal, aunque la mayoría de estudios encuentran un aumento de la temperatura (Frances y cols., 1981) y concluyen que la hipertermia por estrés es más susceptible a la habituación en animales aislados que en agrupados pero que parece un buen modelo para probar el potencial ansiolítico de algunos fármacos (Van der Heyden y cols., 1997).

También se han descrito cambios en el funcionamiento del sistema inmune tras el aislamiento. Durante el estrés se activa el eje HPA y se incrementan los niveles de glucocorticoides circulantes, lo que puede dar como resultado alteraciones de la función inmunitaria, mayor susceptibilidad a las infecciones y desarrollo de neoplasias (Valencia-Alfonso y cols., 2004). Stefanski y cols. (2001) investigaron los efectos del alojamiento diferencial en el sistema inmune de ratas Long Evans, encontrando que el ambiente social de las madres durante el embarazo y la lactancia podría afectar a la cantidad de células del sistema inmune en las crías macho, aunque permanezcan alojadas individualmente.

1.2.- CONSECUENCIAS CONDUCTUALES DEL AISLAMIENTO

En roedores, el aislamiento provoca importantes cambios a nivel conductual, que pueden observarse incluso a largo plazo (Hall y cols., 1998). Dichos efectos forman parte del denominado “*síndrome de aislamiento*” caracterizado por un incremento tanto de la actividad motora espontánea (Gentsch y cols., 1988; Weiss y cols., 2001) como de las respuestas motoras de adaptación a un ambiente novedoso (Heidbreder y cols., 2000; Hellemans y cols., 2004). Los animales criados en aislamiento muestran además un deterioro en los procesos sensorio-motores de recepción de estímulos (Weiss y Feldon, 2001).

Reactividad al ambiente y conducta exploratoria: Se ha observado que los animales criados en aislamiento son más reactivos a las manipulaciones que tienen lugar comúnmente en los laboratorios durante la investigación: la rutina de limpieza de cajas, el manejo por parte del cuidador o experimentador, etc. En un estudio en el que se compararon ratas aisladas y agrupadas, se observaron incrementos en la medida de la presión arterial y de la tasa cardíaca en periodos entre tests conductuales (Sharp y cols., 2002). La mayor reactividad de los animales aislados a la limpieza de sus jaulas también se refleja en el aumento de la temperatura en respuesta a la exploración del nuevo lecho (de Jong y cols., 2005). Sharp y colaboradores (2002) también pusieron de manifiesto que los animales alojados individualmente eran más activos en un test de campo abierto. Los datos de este estudio parecen sugerir que el aislamiento provoca una hiper-reatividad frente a estresores suaves y que esa mayor responsividad no aparece únicamente en respuesta a la novedad, sino que también se pone de manifiesto en los periodos de descanso (de Jong y cols., 2005). Recientemente se ha abierto un debate sobre cuánto tiempo de aislamiento es necesario para inducir dicha reactividad. Algunos autores sugieren que con un corto período es suficiente, mientras que otros afirman que dicho efecto sólo se observa cuando los animales son mantenidos en aislamiento desde el destete. En este sentido, Hellemans y colaboradores (2004), sugieren que la duración del período de alojamiento individual es el factor crítico

que determinará la expresión del síndrome de aislamiento. Tras tres semanas de aislamiento en ratas, Lapiz y cols., (2000) observaron una mayor actividad locomotora y mayor conducta de *rearing* así como mayor distancia recorrida en el campo abierto, por lo que asocian la hiperactividad a una mayor exploración.

En contraste con los datos que hemos puesto de manifiesto, en un estudio realizado utilizando también el test de campo abierto, los animales criados en aislamiento muestran una notable reducción de la conducta exploratoria. Las ratas aisladas presentan menor impulso a aventurarse en ambientes desconocidos, que contrasta con la complejidad del camino que recorren las ratas que habían permanecido agrupadas durante el mismo período de tiempo (Pascual, 2002; ver Figura 1-1). La conducta de los animales controles se inicia con un comportamiento *cauteloso* en una primera fase para luego mostrar intensa exploración; en cambio, las ratas sometidas a privación social realizan un recorrido exploratorio mínimo, girando frecuentemente sobre sí mismas. Esta conducta se ha relacionado con extrema ansiedad y una interpretación del ambiente como potencialmente peligroso (Hilakivi y cols., 1989). En el mismo sentido, Lapiz y colaboradores (2000) utilizando la misma prueba conductual indican una habituación reducida de las ratas aisladas a la arena experimental. En otro estudio, Jähkel y cols. (2000) investigaron los efectos del aislamiento en ratones NMRI evaluando tres factores en el campo abierto: actividad, exploración e irritabilidad. El aislamiento provocó un incremento de la actividad y de la irritabilidad, pero produjo un descenso de la conducta exploratoria. Estos efectos fueron más acusados con un aislamiento a largo plazo, ya que los ratones aislados durante más tiempo fueron más activos pero exploraron el campo abierto de manera menos efectiva.

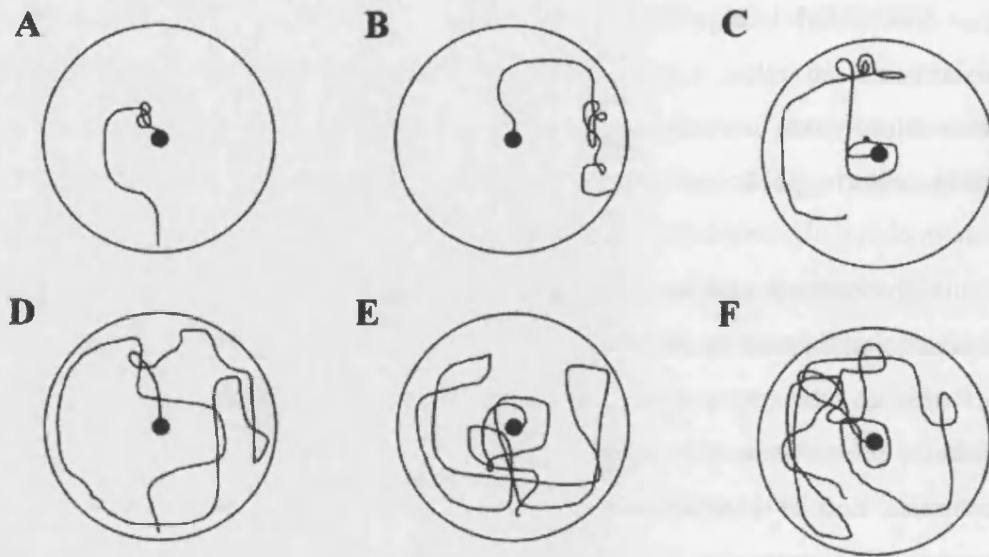


Figura 1-1. Exploración en el test de campo abierto. A, B, y C: trazados recorridos por ratas del grupo aislado ; D, E, y F: trazados recorridos por animales del grupo control . Tomado de Pascual y cols., 2002.

Los discrepantes resultados obtenidos en el test de campo abierto muestran diferencias respecto a la metodología empleada: las características del aparato de campo abierto difieren entre estudios, también hay diferencias en el procedimiento, la duración del aislamiento, la cepa empleada, la edad de los animales, etc. Por ejemplo, en un estudio reciente se señala que en esta prueba la conducta mostrada por los animales depende en mayor medida de la edad de los sujetos en el momento del aislamiento y no tanto de la duración misma del periodo de aislamiento (Arakawa, 2003).

Conducta agresiva: Uno de los efectos más ampliamente documentados provocados por el alojamiento individual es el incremento de los niveles de agresividad. De hecho, el aislamiento social es el método usado con mayor frecuencia para inducir en los ratones conductas de lucha (Miczek y cols., 2001). Una amplia variedad de investigaciones señalan un marcado incremento en la conducta agresiva en ratones tras diferentes periodos de aislamiento (Scott, 1966;

Rodgers y Cole, 1993; Gariépy y cols., 1995; Sandnabba, 1996). Parece ser que la conducta agresiva provocada por aislamiento sufre cambios dependiendo de la duración del mismo y llega a su incremento máximo entre las 3 y las 6 semanas de alojamiento individual (Rilke y cols., 1998a).

Hood y Cairns (1989) examinaron la influencia del medio de crianza en el desarrollo del fenotipo agresivo en dos cepas de ratones. El medio de crianza fue el aislamiento social desde la terminación del destete al final de la 3ª semana. Al someterlos a una primera prueba de conducta agresiva durante la 6ª semana de edad (Figura 1-2) se observa que entre ratones aislados y agrupados hay una gran diferencia en la frecuencia de ataque entre las dos cepas. En cambio, si la crianza se realiza en grupos las diferencias desaparecen, mostrando la influencia del medio social en el desarrollo de la agresión en ratones.

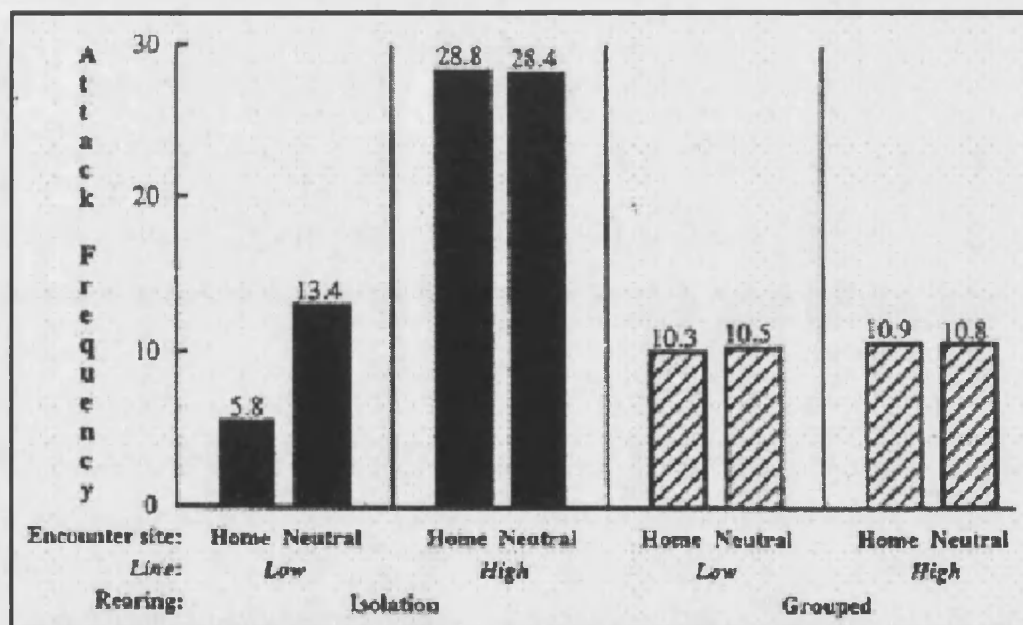


Figura 1-2: Frecuencia de ataque en dos líneas de ratones seleccionados como alta y baja agresión. Las barras negras pertenecen a la conducta agresiva de los animales aislados; a la derecha se aprecia la de los animales agrupados. Tomado de Hood y Cairns (1989)

Los efectos del aislamiento en la conducta agresiva difieren según la cepa, el sexo de los animales, y la edad a la que se produce la separación. Por ejemplo, Blanchard y cols., (2001) advierten que el aislamiento social resulta mucho más estresante para las ratas hembra que para los machos, ya que para éstos es más estresante el alojamiento en grupos. En cambio, para las ratas hembra los encuentros agresivos son poco estresantes, desarrollando poca conducta agresiva tras el aislamiento, aunque pueden mostrar un tipo especial de conducta agresiva en defensa de la camada, la agresión maternal (Ferreira y cols., 2002). El aislamiento también tiene efectos en el desarrollo de la conducta impulsiva. En un estudio en ratas de Hellemans y colaboradores (2004) se observa que el aislamiento durante 3 meses afectó la impulsividad cognitiva (entendida como la preferencia por una pequeña pero inmediata recompensa *versus* una recompensa mayor pero demorada) pero no a la impulsividad motora (entendida como mostrar respuestas rápidas e imprecisas, es decir, fracasar en realizar una conducta inhibitoria).

Schutz y colaboradores (1978) encontraron que las ratas *vencedoras* en una situación de competición para obtener comida en un campo abierto, mostraban menor actividad motora y mayor reactividad emocional (medida por el ratio de defecaciones) que las ratas *perdedoras*. En ratones, Schuller y Renne (1988) hallaron que los más agresivos mostraban una reactividad emocional menor y una actividad locomotora incrementada. Ferrari y colaboradores (1998) indican también que tanto los machos que se habían mostrado más agresivos en encuentros diádicos, como los ratones aislados mostraban niveles más altos de ansiedad en el laberinto elevado (bajo porcentaje de entradas y de tiempo en brazos abiertos) que aquellos no agresivos o que estaban alojados en grupo. Además, Peres y Leite (2002) examinaron la influencia del estatus social (perder o ganar en una situación de competición) en la conducta de las ratas en 3 tests de ansiedad: las ratas ganadoras tuvieron una mayor actividad locomotora que las perdedoras en el laberinto elevado, el campo abierto y el test de interacción social. Barnard y Luo (2002) encontraron que el estatus social también influía en la

ejecución de un laberinto radial; los ratones dominantes realizaban la prueba mejor que los subordinados.

Ansiedad: En roedores, la cría en aislamiento induce cambios en el nivel de ansiedad medido en diferentes pruebas conductuales (Serra y cols., 2000; Lodge y Lawrence, 2003). Al igual que otras alteraciones emocionales, la ansiedad tras el aislamiento correlaciona con diversos cambios neuroquímicos que señalaremos con detalle en el siguiente apartado, especialmente en regiones cerebrales asociadas a la integración del procesamiento emocional como el complejo amigdalino, la sustancia gris periacueductal, locus coeruleus, el hipotálamo ventral, el tálamo y determinadas regiones corticales (Sandford y cols., 2000; Lodge y Lawrence, 2003). Se han descrito diferencias entre ratas aisladas y agrupadas en los niveles de CCK y dopamina en aquellas regiones cerebrales asociadas con la ansiedad y la recompensa (Fendt y Fanselow, 1999; Lodge y Lawrence, 2003).

A nivel conductual, la prueba mas ampliamente utilizada para evaluar cambios en el nivel de ansiedad es el laberinto elevado en forma de cruz (*plus maze*). Este test, validado por Pellow y colaboradores (1985) para ratas y por Lister (1987) para ratones, permite detectar los efectos ansiolíticos o ansiógenos de fármacos o de otras manipulaciones conductuales. Tras el aislamiento social se han descrito tanto incrementos en el nivel de ansiedad (Ferrari y cols., 1998) como efectos ansiolíticos (Hilakivi y cols., 1989; Rodgers y Cole, 1993), e incluso una ausencia total de efectos sobre la ansiedad (Lapiz y cols., 2001; Manzanque y cols., 2002).

Generalmente, en ratas, diversos estudios encuentran un efecto ansiógeno del aislamiento. Maissonette y colaboradores (1993) mostraron que simplemente 2 horas de aislamiento ya inducen cambios indicadores de ansiedad en el laberinto elevado. El estrés producido por un aislamiento prolongado disminuyó el porcentaje tanto de entradas como de tiempo en brazos abiertos en ratas macho

(Overstreet y cols., 1992). Consistentemente con estos resultados, otros estudios también aportan una menor actividad en los brazos abiertos del *plus maze* (Parker y Morinan, 1986; Wright y cols., 1991). Molina-Hernández y colaboradores (2001) indican que las ratas alojadas en aislamiento durante 20 días muestran una mayor conducta de miedo en el laberinto elevado que las agrupadas, si bien en períodos más largos de aislamiento (50 o 70 días) no se observan efectos en dicha prueba. Pascual su equipo (2003) confirman que el aislamiento social en ratas induce un perfil ansiógeno que se refleja en el menor número de entradas realizadas a los brazos abiertos y en el menor tiempo pasado en ellos respecto a los animales agrupados. Además, este trastorno parece perdurar aunque su causa original (el aislamiento social) ya no se encuentre presente, ya que se sigue manifestando cuando los animales son re-agrupados. Sin embargo, y en un sentido opuesto al de los autores citados, los estudios de Fone y colaboradores (1996) indican que los animales aislados no muestran un perfil ansiógeno comparados con las ratas controles.

En ratones aunque también se ha puesto de manifiesto este perfil indicador de incrementos en la ansiedad, los resultados tampoco son unánimes. Ferrari y colaboradores (1998) observaron que tras un período de aislamiento de 24 h los animales mostraban una ansiedad elevada; al igual que Haller y Hálász (1999) que describieron resultados similares, ya que los ratones pasan menos tiempo en los brazos abiertos del laberinto elevado, aunque en un estudio posterior los autores no encuentran que el aislamiento *per se* afecte a los niveles de ansiedad en el *plus maze* (Haller y cols., 2004) pero sí hallan respuestas de ansiedad incrementadas en el test de interacción social, lo que sugiere que la interacción social podría ser más sensible a los efectos del aislamiento. También observaron que el aislamiento aumentó los efectos ansiolíticos de la buspirona en ambas pruebas conductuales (Haller y cols., 2004). Sin embargo, otros autores no encuentran un efecto claro del aislamiento sobre los niveles de ansiedad. Manzaneque y colaboradores (2002) observan que un aislamiento de 7 días no produce efectos en la ansiedad en los ratones tratados con vehículo, aunque sí modificó la respuesta al tratamiento con clozapina. A pesar de estas observaciones, algunas

investigaciones sugieren que el aislamiento podría tener efectos ansiolíticos en ratones. En este sentido, Hilakivi y colaboradores (1989) observan en ratones macho una preferencia por los brazos abiertos y un aumento en la conducta social provocadas por un período de aislamiento menor de 3 semanas. En un estudio más reciente, ratones macho aislados pasaron más tiempo en los brazos abiertos del *plus maze* que los agrupados después de 4 meses de aislamiento, lo que sugiere una disminución de la ansiedad (Guo y cols., 2004).

Además de la especie, hay que tener en cuenta que los resultados conflictivos obtenidos en los distintos estudios podrían atribuirse a diferentes factores: especie, cepa o sexo de los animales empleados; la duración y pauta del aislamiento y a los procedimientos de manejo de los animales así como a la intensidad de la luz empleada (Holson y cols., 1991; Hall y cols., 1997ab; 1998; Lapiz y cols., 2001). También habría que considerar la diferente sensibilidad de las pruebas conductuales utilizadas (Haller y cols., 2000).

Aprendizaje: Se ha sugerido que la cría en aislamiento puede producir cambios en las habilidades de aprendizaje de los animales (Robbins y cols., 1996; Heidbreder y cols., 2000) aunque las investigaciones ofrecen datos contradictorios.

Algunos estudios sugieren un claro deterioro de la capacidad de aprendizaje tras un periodo de aislamiento de duración variable. En ratones bloqueó el condicionamiento de preferencia de lugar inducido por morfina (Coudereau y cols, 1997b), aunque este condicionamiento se consiguió al reagrupar a los animales durante 2 o 4 semanas. En el condicionamiento de evitación activa, Valzelli (1973) observó un deterioro en el aprendizaje de ratones aislados agresivos. Essman (1971) también señaló que ratones aislados mostraron una respuesta de evitación empobrecida al compararlos con los agrupados, aunque la respuesta de escape no sufrió alteraciones. En una tarea de evitación pasiva, ratas

Sprague-Dawley aisladas mostraron latencias de retención más bajas que las agrupadas 24 hr después del entrenamiento (Del Arco y cols., 2004). También se han encontrado déficits en el aprendizaje espacial, en el laberinto radial (Juraska y cols., 1984) y en el laberinto de agua en ratas inmediatamente aisladas después del destete (Hellemans y cols., 2004). Wade y Maier (1986) también encontraron deterioro en el laberinto de agua tras el aislamiento, aunque los efectos pudieron verse influidos por una exposición a un sonido fuerte previo a la prueba espacial.

Otras investigaciones no encuentran efectos significativos del alojamiento en régimen de aislamiento en la ejecución de diferentes tareas de aprendizaje. En ratones NMRI macho, un período de aislamiento de 30 días no provocó diferencias entre ratones aislados y agrupados ni en el aprendizaje de lugar ni en el *probe trial* de la tarea del laberinto de agua; tampoco encontraron diferencias ni en la adquisición ni en la retención de una tarea de evitación pasiva (Coudereau y cols., 1997b). En ratas Wistar, la cría en aislamiento no afectó el aprendizaje de una tarea de autoformas (Molina-Hernández y cols., 2001). Un ambiente enriquecido mejoró en ratas el aprendizaje espacial en el laberinto de agua de Morris independientemente de las condiciones de alojamiento (Schrijver y cols., 2004).

En contraste con los datos previos señalados, algunos estudios sugieren efectos positivos del aislamiento social en el aprendizaje. En ratas macho, Lapiz y colaboradores (2001) demostraron un efecto facilitador del aislamiento de la retención en el laberinto de agua de Morris. En otro estudio, ratas criadas en aislamiento fueron menos sensibles a los efectos deteriorantes de la escopolamina en el aprendizaje del laberinto de agua (Wongwitdecha y Marsden, 1996a). Estos mismos autores demuestran un efecto facilitador del aislamiento en ratas en la adquisición del aprendizaje de lugar en el laberinto de agua de Morris. Lapiz y colaboradores (2001) encontraron que las ratas aisladas recordaron con más precisión el lugar donde se había situado la plataforma, porque éstas entraron más veces en el lugar exacto donde antes se situaba la plataforma, aunque no obtuvieron efectos en la adquisición del aprendizaje espacial. El aislamiento

también podría mejorar el aprendizaje en el condicionamiento de preferencia de lugar (Douglas y cols., 2003), el condicionamiento apetitivo (Harmer y Phillips, 1998ab) y el condicionamiento clásico (Phillips y cols., 2002). Una aportación más reciente de Schrijver y colaboradores (2004) refleja que el aislamiento alteró el aprendizaje inverso en una tarea de discriminación (*two choice discrimination task*) pero no el espacial en el laberinto de agua. Estos autores señalan que cuando se halla deterioro en la navegación en el laberinto de agua en sujetos alojados individualmente, es muy probable que sea debido a efectos no cognitivos (conducta de tigmotaxis o de flotación) o a respuestas de perseveración por parte del animal que sí pueden ser inducidas por el aislamiento (Robbins y cols, 1996; Hall, 1998).

El aislamiento puede no alterar las formas simples de aprendizaje espacial o discriminativo, pero no sucede así en aquellas tareas que requieren la inhibición de alguna conducta previamente reforzada, como por ejemplo, el aprendizaje de extinción (Jones y cols, 1991), el inverso (Schrijver y cols., 2004), el de preferencia de lugar (Coudereau, 1997b) o el cambio de determinadas estrategias de respuesta (Schrijver y Würbel, 2001). Deterioros que pueden ser atribuibles a daños en las vías prefrontales córtico-estriatales (Schrijver y cols., 2004).

Todas las discrepancias surgidas en los estudios de aislamiento social pueden ser resultado de diferencias entre estudios respecto a la edad y la maduración del sistema nervioso de los sujetos al inicio de la separación social, de la duración y el número de los períodos de aislamiento, y también de los estímulos sociales y sensoriales del ambiente a los que se tiene acceso durante el aislamiento (Sánchez y cols., 1998).

A la vista de lo expuesto en el presente apartado, parece que serían necesarios más estudios para determinar los efectos del aislamiento en el aprendizaje y la memoria y además, qué componente del proceso se halla deteriorado (adquisición, consolidación o recuperación) así como dilucidar los mecanismos específicos subyacentes a las alteraciones (Del Arco y cols., 2004).

2.- NICOTINA

2.1.-FARMACOLOGÍA DE LA NICOTINA

La nicotina es el principal alcaloide del tabaco y desempeña una función central en los efectos farmacológicos, fisiológicos y psicológicos del tabaco. Se han identificado más 4.700 sustancias en el humo del tabaco y se estima que todavía quedan por identificar unos 10.000 componentes (López y García, 2004). No obstante, aunque el humo del tabaco contiene miles de componentes se ha demostrado que la nicotina es la responsable de la adicción al tabaco, siendo considerada una sustancia de abuso según los criterios del Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (DSM-IV) [American Psychiatric Association (APA), 1995]. Otros alcaloides del tabaco, como la nornicotina y la anabasina, también parecen tener algunas propiedades farmacológicas similares a la nicotina (Vainio y Tuominen, 2001). Cuando la nicotina se administra vía tabaco, otros componentes asociados a fumar un cigarrillo (estímulos sensoriales como el olor o el sabor), pueden contribuir al mantenimiento de la dependencia, constituyéndose como reforzadores secundarios del tabaco (Ayesta y Otero, 2004).

La nicotina es una amina terciaria compuesta por un ciclo piridínico y uno pirrolidínico (Figura 2-1). Su fórmula química se representa como $C_5H_4N CH(CH_2)_3 NCH_3$. Esta sustancia es incolora, volátil, oleaginosa, soluble en agua y altamente alcalina. Se puede administrar por diferentes vías: digestiva (mascada, bebida, en comprimido, inhalador bucal), dérmica (parche) y respiratoria (esnifar o fumar tabaco).

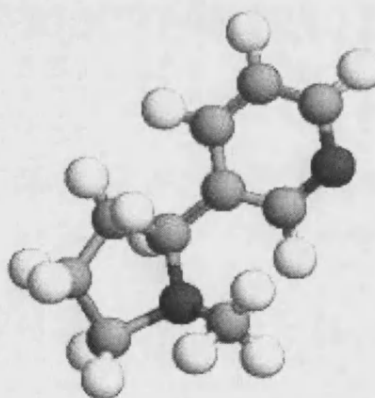


Figura 2-1: Molécula de nicotina

Comparativamente, la vía respiratoria es la que proporciona una más rápida liberación de nicotina al cerebro, maximizando las propiedades adictivas de esta sustancia. La absorción de nicotina puede realizarse a través de la cavidad oral, la piel, el tracto digestivo y la vejiga urinaria (Yildiz, 2004). Su absorción se realiza a través de las membranas celulares, siendo pH dependiente: en un medio ácido atraviesa difícilmente las membranas, pero en un medio básico la nicotina se absorbe rápidamente. El pH del cigarrillo es aproximadamente de 5.5, poco asimilable por la mucosa bucal y su principal vía de absorción son los alveolos pulmonares. En los pulmones, la nicotina pasa rápidamente a la circulación sistémica, absorción que se ve facilitada por el elevado flujo sanguíneo de los capilares pulmonares. La nicotemia aumenta rápidamente desde el consumo de un cigarrillo, presentando un pico plasmático al final del mismo. De este modo, la nicotina contenida en el humo del tabaco se distribuye rápidamente en diversos órganos corporales, incluido el cerebro. El grado de absorción también dependerá de la concentración de nicotina en el humo del tabaco.

La distribución y los niveles máximos de nicotina en sangre varían en función del metabolismo del sujeto, la vía de consumo, la dosis ingerida, el ritmo y la intensidad de la inhalación, así como el modo de administración (Swan y cols., 1993). Desde los pulmones, la nicotina llega al cerebro en un periodo entre 7 y 10 segundos (Benowitz, 1990) y el mayor nivel plasmático de nicotina se obtiene en los primeros minutos después de empezar a fumar. Las concentraciones arteriales y cerebrales aumentan con rapidez y decaen en un periodo de 20 a 30 minutos (Mangan y Golding, 1984) y entonces la nicotina se distribuye en otros tejidos, especialmente en los músculos esqueléticos. La vida media de la nicotina oscila entre 2 y 4 horas, aunque en fumadores habituales la nicotina se acumula y puede ser detectada hasta 10 horas después de haber fumado.

La nicotina se metaboliza principalmente en el hígado y en menor cuantía en el riñón y el pulmón. Su principal metabolito es la cotinina, producto de la oxidación hepática. La vida media de este metabolito es aproximadamente de 16 horas y se utiliza frecuentemente como marcador del consumo de nicotina (Jarvis,

2004). Se ha comprobado que los varones metabolizan la nicotina más rápidamente que las mujeres, observándose niveles más elevados de cotinina en varones (Al'Absi y cols., 2002). Además de las hormonas sexuales, otros factores como la edad, el consumo de determinados fármacos o la dieta, pueden modular la farmacocinética y los efectos de la nicotina (Pineda, 1999; Balfour y cols., 2000). La eliminación de la nicotina es rápida debido a su captación y concentración en distintos tejidos y a su metabolismo hepático. Su vida media de eliminación es de 2-3 horas y su vía principal de excreción es la renal. Otras rutas de eliminación son a través de la saliva (segunda vía) o a través del sudor, leche materna, bilis, jugos gástricos y heces.

La administración de nicotina da lugar a una amplia variedad de efectos en los diferentes sistemas del organismo. Esta sustancia psicoactiva incrementa las secreciones y la motilidad gástrica, estimula la respiración y las secreciones salivares, incrementa el metabolismo graso y el gasto energético, y disminuye la temperatura corporal. La nicotina también tiene importantes acciones endocrinas, produciendo un aumento en la secreción de numerosas hormonas como la vasopresina, aldosterona, hormona del crecimiento, prolactina y también incrementa la liberación de las hormonas relacionadas con el estrés (la adrenalina, la noradrenalina, la ACTH y el cortisol) (Paterson y Nordberg, 2000; Perkins y cols., 2001; Lorza, 2004; Yildiz, 2004). Uno de los efectos más conocidos es su influencia sobre el sistema cardiovascular, ya que su consumo aumenta la tasa cardíaca, la presión arterial y el flujo sanguíneo coronario (Balfour y cols., 2000). Además de los efectos negativos producidos por la propia nicotina, hay que tener en cuenta que el monóxido de carbono es un componente muy importante (alrededor de un 5%) del humo del tabaco (López y García, 2004). Este gas, al unirse a la hemoglobina de la sangre y formar la carboxihemoglobina, deteriora el aporte de oxígeno a los tejidos, lo que ocasiona un descenso en la capacidad de esfuerzo y un incremento en la probabilidad de sufrir enfermedades cardiovasculares (López y García, 2004).

2.2.- EFECTOS NEUROBIOLÓGICOS DE LA NICOTINA

La nicotina ejerce una potente acción sobre el sistema nervioso central (SNC), ya que incrementa el flujo de iones y la liberación de neurotransmisores de varios sistemas neuronales, provocando una amplia diversidad de cambios fisiológicos y conductuales (Paterson y Nordberg, 2000). Esta sustancia es un agonista de la acetilcolina (ACh), siendo uno de los pocos agonistas colinérgicos que puede atravesar con facilidad la barrera hematoencefálica (Turchi y cols., 1995). La nicotina interactúa con los receptores nicotínicos de ACh (nAChRs), Existen distintos tipos de nAChRs en el SNC y en el sistema nervioso periférico, estando presentes desde los primeros estadios del desarrollo (Leonard y Bertrand, 2001; George y O'Malley, 2004).

2.2.1.- RECEPTORES NICOTÍNICOS CEREBRALES

Los receptores nicotínicos son de gran complejidad estructural y están ampliamente distribuidos en el sistema nervioso central (SNC), localizándose especialmente en la corteza cerebral, hipocampo, estriado, área tegmental ventral, tálamo y núcleo interpeduncular, y en menor medida en la amígdala, septum, núcleos motores del troncoencéfalo y locus coeruleus (Levin y Simon, 1998; Dani y De Biasi, 2001). La función de estos receptores es activar la liberación de neurotransmisores en el SNC. Estos receptores son canales catiónicos transmembrana regulados por la ACh y por agonistas nicotínicos, como la nicotina. Cuando la acetilcolina o la nicotina se ligan al receptor, éste cambia de configuración, lo que provoca la apertura del canal iónico y permite la entrada de sodio al interior de la célula, causando la despolarización de la membrana. Se considera que el papel de los nAChRs cerebrales consistiría en la modificación de la excitabilidad neuronal para obtener la ejecución óptima de las neuronas, acción importante en un gran número de respuestas conductuales y, en particular, en procesos cognitivos (McGehee y Role, 1995; Paterson y Nordberg, 2000).

Los nAChRs son pentámeros de glicoproteínas, formadas por homo o hetero-oligómeros de 12 subtipos diferentes, 9 subunidades α ($\alpha 2$ - $\alpha 10$) y 3 subunidades β ($\beta 2$ - $\beta 4$) (Le Novere y Changeux, 1995; Lindstrom, 2000). Las 5 sub-unidades de polipéptidos se organizan alrededor de un canal constituyendo un pseudo-eje de simetría (Cooper y cols., 1991; Unwin, 1996) (ver Figura 2-2). Estudios con radioligandos nicotínicos en diferentes áreas cerebrales diferenciaron dos clases de nAChRs: los que reaccionan con agonistas de alta afinidad pero no con la α Bungarotoxina (α Bgtx) que son los nAChRs; y los que reaccionan con ambos: con agonistas y con α Bgtx (denominados α Bgtx-nAChRs) (Lukas y Bencherif, 1992). Los α Bgtx-nAChRs pueden ser homoméricos formados por subunidades de un único tipo $\alpha 7$ - $\alpha 9$ o heteroméricos con tipos $\alpha 7$ - $\alpha 10$. Sin embargo, los nAChRs sólo forman hétéromeros con las subunidades $\alpha 2$ - $\alpha 6$ y las $\beta 2$ - $\beta 4$ (Revisión en Lindstrom, 2000).

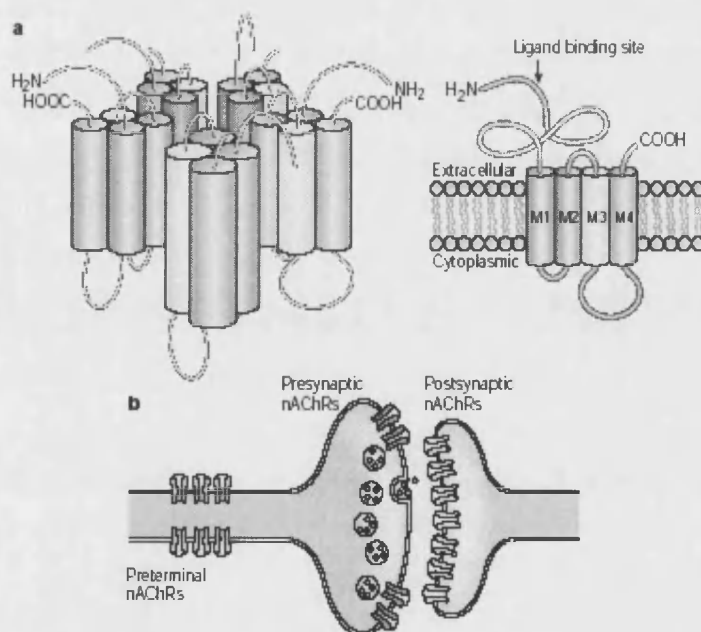


Figura 2-2: Estructura de los receptores colinérgicos nicotínicos (nAChRs).

a) Cada receptor se compone de 5 unidades homo o heteroméricas, tipo α o β . El esquema de la derecha muestra la tipología transmembrana de una sub-unidad.

b) Los nAChRs se localizan en el cuerpo de las neuronas, en las terminales pre-sinápticas y en los botones post-sinápticos.

(Tomado de Laviolette y Van der Kooy, 2004)

La corteza cerebral contiene sub-unidades $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\beta 2$ y $\beta 4$ distribuidas desigualmente entre sus diferentes capas. El hipocampo contiene principalmente las $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\beta 2$, $\beta 3$ y $\beta 4$; el sistema mesocorticolímbico las $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\beta 2$, $\beta 3$ y $\beta 4$; el córtex auditivo las $\alpha 7$; la corteza visual las $\alpha 2$, $\alpha 5$, $\alpha 7$

y $\beta 2$ y la retina $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\alpha 8$, $\beta 2$, $\beta 3$ y $\beta 4$ (Jones y cols., 1999; Vailati y cols., 1999). Los nAChRs intervienen en funciones complejas como la percepción sensorial y del dolor, el control de la actividad locomotora, la regulación de la temperatura corporal, el *arousal* y los procesos cognitivos, (Gotti y cols., 1997; Levin, 2002). La mayoría de estos efectos se han relacionado con los nAChRs presinápticos que modulan la liberación de diferentes neurotransmisores (Wonnacott, 1997). No obstante, los nAChRs post-sinápticos también desempeñan funciones importantes especialmente en el hipocampo y la corteza sensorial (Jones y cols., 1999).

Diferentes subtipos de receptores participan en varias funciones del sistema nervioso. Cerca del 90 % de los nAChRs cerebrales están conformados por subunidades $\alpha 4$ - $\beta 2$, presentando sitios de unión a la nicotina de mayor afinidad (Zoli y cols., 1995) y siendo estas subunidades las más relacionados con las posibles mejoras del aprendizaje y la memoria inducidas por la nicotina (Levin, 2002). El subtipo $\alpha 3(\alpha 5)\beta 4$ se encarga principalmente de regular la transmisión ganglionar y la liberación de dopamina por las neuronas dopaminérgicas está controlado parcialmente por un subtipo que contiene la subunidad $\alpha 4$ (Wonnacott, 1977; Xu y cols., 1999). Las principales vías colinérgicas, dopaminérgicas, gabaérgicas y glutamatérgicas están mediadas por $\alpha 7$ nAChRs y subtipos que contienen $\beta 2$. El subtipo $\beta 2$ es importante en la liberación presináptica de GABA (Lu y cols., 1998), y en la respuesta a la nicotina de las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo en ratones. El subtipo $\beta 3$ participa en el control de la actividad locomotora, por medio de la liberación de dopamina en el estriado y otras áreas del SNC.

Se ha demostrado que el tratamiento crónico con nicotina aumenta la densidad de los receptores nicotínicos tanto en roedores como en humanos, provocando una regulación al alza de las sub-unidades $\alpha 2\beta 4$ y $\alpha 7$ en distintas zonas cerebrales (Mihailescu y Drucker-Colín, 2000). Los estudios *post mortem* de los cerebros de personas fumadoras muestran un aumento del número de estos

receptores (Breese y cols., 1997), a pesar de que su número disminuye con la edad del sujeto. Los nAChRs también parecen estar involucrados en la supervivencia neuronal, ya que se han observado similitudes en las alteraciones producidas en enfermedades neurodegenerativas y los ratones *knock-out* de edad avanzada que presentan la sub-unidad $\beta 2$ no funcional. Estas alteraciones correlacionan funcionalmente con un deterioro en el aprendizaje espacial (Zoli, 2000).

En diferentes áreas del cerebro se encuentran distintos receptores nicotínicos con propiedades electrofisiológicas y farmacológicas muy dispares. Se ha propuesto que la variedad de efectos comportamentales provocados por la nicotina se debe a la activación de distintas vías neuronales que expresan los diferentes subtipos de nAChRs (Stolerman, 1991). Datos recientes profundizan en la idea de que dichos efectos son el resultado de la particularidad que posee la nicotina de estimular vías en el SNC mediante nAChRs que difieren en respuesta a la activación y desensibilización por nicotina. De este modo, pequeñas diferencias en el estado de activación, conectividad o sensibilidad de las vías neuronales entre los diferentes individuos podrían provocar grandes diferencias en las respuestas conductuales generadas por la nicotina (Picciotto, 2003).

Un campo de especial interés es la implicación de los nAChRs en la patogénesis de síndromes y enfermedades causadas por alteraciones de distintos sistemas de neurotransmisión. Por ejemplo, en el autismo se han descrito anormalidades en el sistema colinérgico cerebral (Perry y cols., 2001), observándose un descenso de nAChRs tipo $\alpha 4$ - $\beta 2$ en el córtex parietal y el cerebelo; además los niveles del subtipo $\alpha 7$ permanecen normales en el córtex pero se incrementan en el cerebelo (Martín-Ruiz y cols., 2004). También existen evidencias respecto a que la epilepsia autosomal dominante del lóbulo frontal puede estar causada por mutaciones de la región del cromosoma 20 que codifica la subunidad $\alpha 4$ de los nAChRs (Phillips y cols., 1995).

La implicación de los nAChRs en algunos trastornos mentales como la esquizofrenia, la depresión o la ansiedad también ha sido puesta de manifiesto en diversos estudios. En la esquizofrenia parece que los nAChRs homoméricos $\alpha 7$ están claramente involucrados. Estos pacientes presentan un decremento pequeño pero significativo de la inmunoreactividad $\alpha 7$ en el hipocampo, el núcleo reticular del tálamo, el córtex frontal y el cíngulo (Martín-Ruiz y cols., 2003). En las familias de esquizofrénicos el gen $\alpha 7$ está parcialmente duplicado, y la región del cromosoma 15 en la que se encuentra está implicada en la transmisión genética (Freedman y cols., 2001). Un hecho que se ha constatado es que la prevalencia del tabaquismo es mayor en individuos con depresión (Poirier y cols., 2002). La nicotina puede ejercer un efecto antidepresivo y estabilizador del estado de ánimo en humanos (Shytle y cols., 2002).

En patologías neurodegenerativas, como la enfermedad de Parkinson o la enfermedad de Alzheimer también se está investigando el papel de los receptores nicotínicos. En la enfermedad de Parkinson, patología provocada por la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la vía nigroestriada, se sabe que los $\alpha 6\beta 3\beta 2$ y $\alpha 4\beta 2$ en el estriado son los responsables de la liberación de dopamina desde las terminaciones nerviosas (Champtiaux y cols., 2003). En estos enfermos, así como en aquellos que presentan la enfermedad de Alzheimer (EA), se ha descubierto una disminución de los receptores que contienen subunidades $\alpha 4$ y de los que presentan subunidades $\alpha 7$ (Burghaus y cols., 2003). El subtipo $\alpha 4\beta 2$ se relaciona con el deterioro cognitivo que pueden llegar a presentar estos pacientes. Además, la administración de nicotina a enfermos de Parkinson puede ejercer un efecto neuroprotector (Dajas-Bailador y cols., 2000). En los enfermos de Alzheimer existe una disminución de la cantidad de nAChRs cerebrales, en ausencia de una disminución general del número de neuronas (Clementi y cols., 2000). Las áreas más afectadas son las neocorticales, hipocampo y núcleos talámicos. Además, se ha descubierto una disminución de subunidades $\alpha 4$ en dichas áreas corticales y en el hipocampo (Court y cols., 2000). Por otra parte, la β -proteína amiloide

característica de dicha enfermedad interactúa con los nAChRs $\alpha 4\beta 2$ y con los receptores $\alpha 7$, inhibiendo la función de dichos receptores (Wu y cols., 2004).

2.2.2.- NICOTINA Y SISTEMAS DE NEUROTRANSMISIÓN

Los efectos de la nicotina en la conducta y el funcionamiento cerebral son complejos, ya que la activación de los receptores nicotínicos provoca no sólo la liberación de acetilcolina, sino también la activación de otros neurotransmisores como la dopamina, la noradrenalina, la serotonina, el GABA, el glutamato y los opiáceos endógenos (Levin y Simon, 1998; Perkins y cols., 2001; George y O'Malley, 2004).

La exposición repetida a nicotina causa una pérdida de sensibilidad a sus efectos por parte de los nAChRs cerebrales, lo que provoca un incremento del número de receptores en presencia de nicotina ya que al ligarse al receptor, éste cambia de configuración y no es posible estimularlo de nuevo durante un cierto tiempo, fenómeno conocido como desensibilización (Sthal, 2002). Estas propiedades de los receptores pueden ser puestas en paralelo con los fenómenos de tolerancia, que desempeñan un importante papel en la dependencia (Le Houezec, 2003). Cuando los receptores nAChRs se encuentran estimulados de forma repetida por el consumo regular de cigarrillos, estos receptores se desensibilizan y se produce una hipoactividad del sistema dopaminérgico y noradrenérgico, lo que provoca respuestas compensatorias. Estos mecanismos de compensación quedan patentes cuando se deja de consumir nicotina y aparece el síndrome de abstinencia (Márquez-Pérez y Garrido, 2004).

En la Figura 2-3 se describen los cambios fisiológicos producidos tras la administración aguda y crónica de nicotina. Tal como se refleja en la misma, la exposición repetida a la nicotina provoca una neuroadaptación (Balfour y Fagerström, 1996; Benowitz, 1996) y podría conducir a la inactivación de muchos

de los AChRs. Esta administración crónica de nicotina induce cambios neuroadaptativos especialmente en la neurotransmisión dopaminérgica y noradrenérgica.

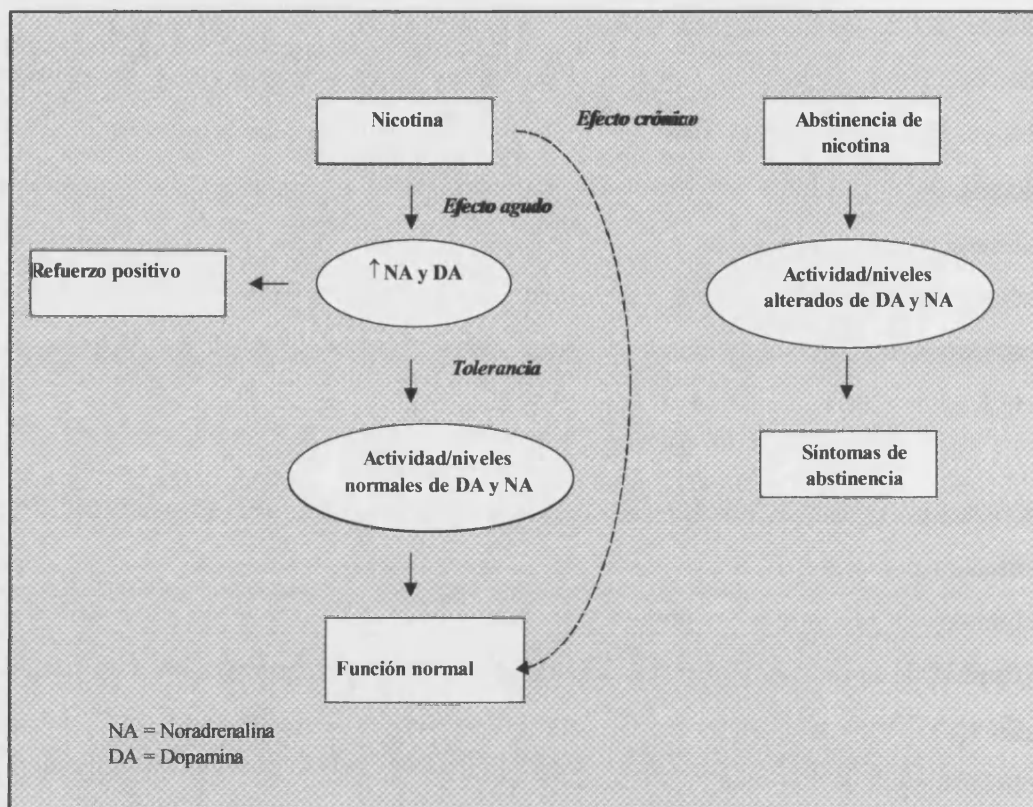


Figura 2-3. Fenómeno de neuroadaptación. Adaptado de Benowitz y Peng (2000)

El hecho de que la nicotina produzca un amplio espectro de efectos conductuales pone de manifiesto la complejidad de acción de la nicotina sobre el funcionamiento cerebral. Seguidamente se exponen brevemente los sistemas de neurotransmisión que pueden estar modulados por la acción de la nicotina en el SNC.

Acetilcolina: La acetilcolina es un neurotransmisor cuya liberación en el cerebro se asocia especialmente con la estimulación cognitiva (Warburton y Rusted, 1993; Balfour y Fagérstrom, 1996; Myhrer, 2003). La modulación de la actividad sináptica por el influjo pre-sináptico del calcio puede representar un

papel fisiológico de la ACh en el cerebro, así como un mecanismo de acción de la nicotina (Wonnacott, 2001). Radcliffe y colaboradores (1999) observaron que los receptores presinápticos colinérgicos (probablemente compuestos de sub-unidades $\alpha 7$), intervienen en el influjo de calcio que aumenta la liberación tanto de glutamato como de GABA en las neuronas del hipocampo. Ambos neurotransmisores aumentan con la acción de la nicotina.

De acuerdo con los autoinformes realizados por los fumadores, éstos utilizan el consumo de tabaco como un instrumento que les permite modular el nivel de *arousal*, de atención o de concentración, y mejorar su ejecución cognitiva (Warburton, 1992; Balfour y Fagérstrom, 1996; Mumenthaler y cols., 2003). De hecho, la necesidad de obtener estos efectos de la nicotina podría estar influyendo sobre el deseo de fumar y dificultar el abandono del tabaco. Se considera que es especialmente la acción de la nicotina sobre la corteza cerebral y el hipocampo, el sustrato neurobiológico que subyace a los efectos de la nicotina sobre las capacidades cognitivas (Pineda, 1999). En animales se ha observado que la administración de nicotina a dosis altas puede inhibir la liberación de ACh, produciendo un descenso en la actividad motora, causada por la desensibilización del receptor nicotínico (Balfour y cols., 2000). Este hecho se explica porque la nicotina es un estimulante del SNC a bajas dosis, pero a dosis altas se convierte en depresor (Sharp y Matta, 1993; Gray y cols., 1996).

Dopamina: La activación del sistema dopaminérgico que produce la nicotina se asocia especialmente con el poder adictivo de esta sustancia, así como con sus efectos sobre la actividad motora. La nicotina incrementa la frecuencia de disparo de las neuronas dopaminérgicas y, por tanto, facilita los cambios neuroquímicos en estas neuronas y sus proyecciones (Mathieu-Kia y cols., 2002). Esta sustancia psicoactiva, al igual que otras drogas de abuso, influye en la actividad de las neuronas dopaminérgicas actuando directamente en los nAChRs somatodendríticos y presinápticos, o ejerciendo una modulación de *inputs* en el área tegmental ventral (ATV) y el núcleo accumbens (Wonnacott y cols., 2005).

Las neuronas dopaminérgicas del ATV proyectan hacia el núcleo accumbens y a otras estructuras límbicas: la amígdala, el hipocampo, la corteza prefrontal y el núcleo pálido ventral. Debemos remarcar el papel de los nAChRs en el sistema dopaminérgico mesolímbico, implicado en la adicción a la nicotina y a otras drogas de abuso. La acción de la nicotina sobre este sistema de refuerzo es lo que produce las sensaciones agradables y de placer (Sullivan y Covey, 2002; George y O'Malley, 2004), aunque en los fumadores, las señales asociadas con el fumar adquieren el estatus de reforzadores secundarios y contribuyen al mantenimiento de la conducta de fumar.

Una inyección aguda de nicotina, como de otras drogas de abuso, incrementa las concentraciones extracelulares de dopamina en el sistema mesolímbico, mesocortical y nigroestriatal (Di Chiara, 2000; Mathieu-Kia y cols., 2002). Repetidas inyecciones de nicotina tienen una acción selectiva y disminuyen la recaptación de dopamina en el núcleo accumbens, lo que sugiere que es en este núcleo donde se produce un mayor efecto de la nicotina (Lapin y cols., 1989). La administración crónica de nicotina causa un incremento de dopamina en el córtex prefrontal (Nisell y cols., 1996) y parece que las sub-unidades $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$ y $\beta 2$ de los receptores nicotínicos contribuyen a los efectos reforzantes y también a los efectos psicoestimulante de la droga (Mathieu-Kia y cols., 2002). La auto-administración de nicotina en animales se ve reducida por antagonistas D1 y D2 (con lesiones neurotóxicas en el núcleo accumbens y por microinfusiones de antagonistas nicotínicos en el ATV), lo que confirma que las acciones reforzantes de la nicotina se hallan mediadas por el sistema dopaminérgico mesolímbico (Pogun, 2001). El bloqueo de esta vía dopaminérgica mesolímbica puede incluso anular los efectos reforzantes de la nicotina (Laviolette y van der Kooy, 2004). La aplicación local de nicotina en el estriado produce un incremento del nivel extracelular del glutamato y parece que son las sub-unidades $\alpha 3$ $\beta 2$ y $\alpha 4(\alpha 5)\beta 2$ las que se encuentran en las terminaciones dopaminérgicas de dicha área. Además, los antagonistas NMDA podrían modular los efectos de la nicotina en el ATV (Laviolette y van der Kooy, 2004). En las neuronas que proyectan al área mesolímbica dopaminérgica, la nicotina puede

modular la liberación de glutamato y ejercer un efecto excitatorio indirecto en las neuronas dopaminérgicas (Araki y cols., 2002).

Noradrenalina: Algunas investigaciones han señalado el efecto excitador de las neuronas noradrenérgicas provocado por la nicotina en diferentes partes del cerebro, pero que actúa primariamente a nivel del locus coeruleus (Benwell y Balfour, 1997; Fu y cols., 1998). Se postula que el locus coeruleus, principal núcleo noradrenérgico cerebral, está implicado en algunos de los síntomas asociados con el síndrome de abstinencia a la nicotina. Otras regiones, como el hipocampo, la corteza cerebral y el cerebelo requieren altas concentraciones de nicotina para causar un incremento en el metabolismo de la noradrenalina. El hipocampo también parece jugar un papel importante en la dependencia a la nicotina (Markou y cols., 1998). Sershen y colaboradores (1997) señalaron que el subtipo de receptor que controla la liberación de noradrenalina en el hipocampo es el $\alpha 3\beta 2$. Infusiones de nicotina mediante microinyecciones desensibilizan los receptores nicotínicos y disminuyen la liberación de noradrenalina en las neuronas que inervan el hipocampo desde el locus coeruleus (Balfour y Fagérstrom, 1996). Se considera que la desensibilización de los receptores y la reducción en la noradrenalina podría desempeñar un papel crítico mediando los posibles efectos *calmantes* de la nicotina (Gilbert 1999; Pomerleau, 1998). De hecho, en un fumador cuando existe un descenso significativo del nivel de nicotina en sangre, se produce una alteración importante en la actividad noradrenérgica, generándose una liberación anormal de este neurotransmisor en el locus coeruleus (Granda, 2004).

Setotonina (5-Hidroxitriptamina o 5-HT): El consumo de nicotina puede modificar la liberación de serotonina (5-HT) en diferentes áreas cerebrales (Bannon y cols., 1998). Su acción se relaciona con los cambios en el humor y en el estado de ánimo que notan muchos fumadores tras fumar un cigarrillo. Es sabido que los núcleos del rafe, que proporciona casi el 80% de la serotonina

cerebral, contienen una gran cantidad de receptores nicotínicos $\alpha 4$ (Wada y cols., 1989). Otras áreas cerebrales en las que se liberan considerables cantidades de 5-HT son el hipocampo, el sistema límbico y la hipófisis. La nicotina administrada de forma crónica está asociada con una reducción selectiva en las concentraciones de 5-HT en el hipocampo (Benwell y cols., 1990). Los resultados experimentales indican que la modulación del sistema serotoninérgico en la dependencia de nicotina es más evidente en los reforzadores negativos de la abstinencia que el refuerzo positivo producido por la nicotina (Le Houezec, 2001). Se considera que el mayor incremento en la actividad serotoninérgica durante el síndrome de abstinencia a la nicotina podría explicar, en parte, el aumento en el nivel de ansiedad que experimentan los fumadores al dejar el tabaco (Kenny y cols., 2001).

GABA: Estudios electrofisiológicos han demostrado que los agonistas nicotínicos estimulan la liberación del aminoácido inhibitorio GABA en el tejido cerebral de roedores. Lu y colaboradores (1998) encontraron que la nicotina incrementaba la liberación de GABA y que esta liberación era calcio-dependiente. Una de las áreas cerebrales donde se ha observado que la administración de nicotina incrementa la actividad gabaérgica es el hipocampo (Wonnacott, 1997). Los receptores nicotínicos involucrados en la estimulación de este sistema gabaérgico parecen ser los receptores de alta afinidad tipo $\alpha 4 \beta 2$, el subtipo más difundido en el cerebro (Ferreira y cols., 2001). Además, esta subpoblación de receptores nicotínicos tiene gran importancia en los procesos de aprendizaje y memoria (Ripoll y cols., 2004). Yin y French (2000) han examinado las acciones de la nicotina en las interneuronas gabaérgicas del ATV, las cuales juegan un importante papel modulador en la excitabilidad neuronal dopaminérgica mesolímbica. Sus resultados señalan que la nicotina incrementa la tasa de disparo tanto de las neuronas dopaminérgicas como no dopaminérgicas, aunque más vigorosamente en las primeras. La desensibilización ocurre en ambos tipos de neuronas pero más pronunciadamente en las no dopaminérgicas (presumiblemente gabaérgicas), lo que podría sugerir que las neuronas gabaérgicas pueden ser una diana importante para los efectos de la nicotina en el SNC, facilitando una mayor

respuesta a la nicotina de las neuronas dopaminérgicas mesolímbicas (Yin y French, 2000).

Opioides: Existen estudios que señalan la relación entre el sistema opioide y la nicotina, mostrando que esta sustancia aumenta la liberación de opiáceos endógenos en zonas cerebrales como el núcleo accumbens y la hipófisis (Shacka y Robinson, 1996). Aunque en modelos animales se han descrito las similitudes entre el síndrome de abstinencia de nicotina y el de opiáceos, y la existencia de cierto parecido entre los efectos de los agonistas opiodes y de la nicotina, los intentos de demostrar una posible modulación por parte del sistema opioide de la conducta de fumar no son totalmente concluyentes (Pomerleau, 1998). Se ha informado que en sujetos humanos, la naloxona (antagonista opioide) podría reducir el número de cigarrillos en fumadores crónicos y bloquear las posibles respuestas subjetivas placenteras de fumar (Mathieu-Kia y cols, 2002), sugiriendo que los péptidos opiodes se liberan al consumir nicotina y pueden ser parcialmente responsables del mantenimiento de la adicción. Sutherland y colaboradores (1995) también señalaron que otro antagonista opiáceo, la naltrexona, redujo la dificultad percibida en mantener la abstinencia durante las primeras 24 horas de no consumo de nicotina. La mecamilamina (antagonista nicotínico) precipitó un síndrome de abstinencia que fue atenuado con una preinyección de un agonista de los receptores opioides- μ y también por un agonista selectivo de los receptores opioides- δ (Ise y cols., 2000). De acuerdo con lo señalado por Mathieu-Kia y colaboradores (2002) es posible que la administración crónica de nicotina induzca una liberación prolongada de opiáceos endógenos, y que la retirada de nicotina, por tanto, produzca un descenso del tono en el sistema opiáceo.

Aminoácidos excitatorios: Se ha informado de que los AChRs intervienen en la regulación del sistema de aminoácidos excitatorios (Wonnacott, 1997; Mansvelder y McGehee, 2000). La nicotina parece influir en la transmisión

glutamatérgica en algunas áreas cerebrales como la corteza cerebral, el tálamo, el estriado, el hipocampo y el núcleo interpeduncular (Mansvelder y McGehee, 2002). En el locus coeruleus también la nicotina induce una estimulación neuronal a través de la liberación del glutamato. Además, se considera que el sistema glutamatérgico puede estar implicado en los efectos de la nicotina sobre el ATV (Laviolette y van der Kooy, 2004). Los principales inputs excitatorios de las neuronas dopaminérgicas del ATV son proyecciones glutamatérgicas desde el córtex prefrontal (Mansvelder y McGehee, 2002). Se considera que la acción de la nicotina sobre el sistema glutamatérgico constituye uno de los mecanismos subyacentes a las mejoras cognitivas que puede inducir la administración de nicotina (Gray y cols., 1996; Mansvelder y McGehee, 2002).

Tal como se puede apreciar en la Figura 2-4, la nicotina produce cambios importantes sobre los diferentes sistemas de neurotransmisión cerebral. Estos efectos neurobiológicos desencadenados por la nicotina podrían explicar la complejidad de la conducta de fumar.

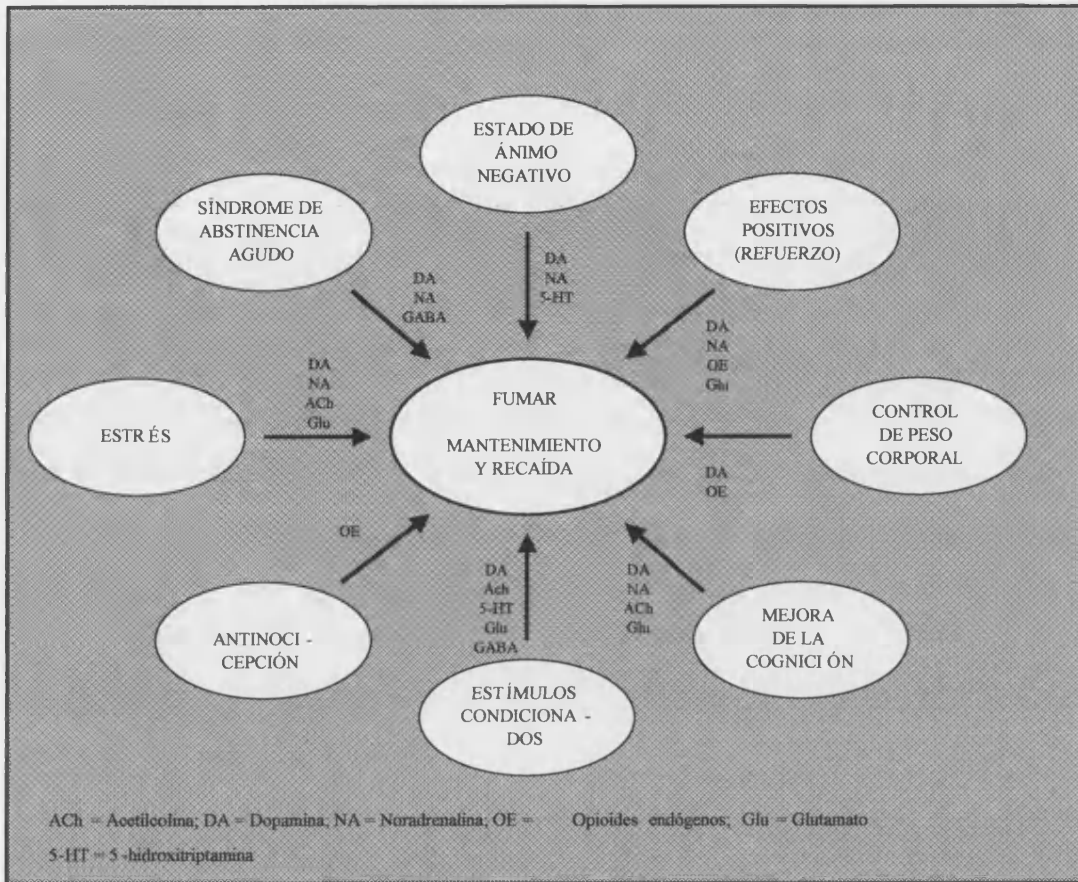


Figura 2-4: Factores y sistemas de neurotransmisión que median el mantenimiento y la recaída de la conducta de fumar. Adaptado de George y O'Malley (2004)

2.3.- EFECTOS COGNITIVOS Y CONDUCTUALES DE LA NICOTINA

El perfil cognitivo de la nicotina es complejo. Debido a su farmacología esta sustancia puede inducir un amplio rango de cambios fisiológicos y conductuales, tanto en humanos como en animales (Stolerman y cols., 1995ab; Levin y Simon, 1998; Levin, 2002). La administración de nicotina eleva el *arousal* cortical, lo cual puede provocar cambios cognitivos significativos tanto en fumadores como en no fumadores (Heishman y Henningfield, 2000; Domino, 2003). En fumadores la privación de nicotina puede entorpecer sus capacidades cognitivas, especialmente en tareas que requieren un procesamiento complejo de la información (Picciotto, 2003; Newhouse y cols., 2004). De hecho, la mayoría de los fumadores señalan que fumar les ayuda a concentrarse. Por ello, se considera que la acción cognitiva de la nicotina puede ser uno de los factores en el mantenimiento de la adicción (Al'Absi y cols., 2002).

Los efectos positivos de la nicotina sobre el procesamiento de la información han sido demostrados en numerosas tareas. La nicotina puede mejorar la atención, la memoria, la ejecución psicomotora, el tiempo de reacción y la resolución de problemas (Redolat y cols., 1994; Heishman, 1999; Levin, 2002). Un hecho de especial relevancia es que los efectos a nivel cognitivo causados por la nicotina no parecen ser resultado de la finalización de los déficits inducidos por la abstinencia (Mancuso y cols., 1999). Además, este efecto positivo sobre la cognición no disminuye con la administración crónica de esta sustancia (Rezvani y Levin, 2001). A pesar de ello, hay que tener en cuenta que los beneficios inducidos por la nicotina y la magnitud de los cambios cognitivos pueden variar según el tipo de tarea experimental, la exposición previa a la nicotina, la dosis, la topografía de la conducta de fumar, el género de los sujetos, etc. (Levin, 2002). Estudios con animales también indican que la edad es un factor importante cuando se evalúan las acciones de la nicotina, sugiriendo que el desarrollo cerebral es vulnerable a los efectos de la droga durante la adolescencia (Thrauth y cols., 2001; Slotkin, 2002; Xu y cols, 2002). También es conocido que la nicotina, cuando se administra durante el desarrollo fetal, produce importantes

déficits neuroconductuales (Levin y Slotkin, 1998).

Los efectos conductuales y cognitivos producidos por la nicotina parecen estar mediados por los receptores colinérgicos nicotínicos en el SNC (Dani y Heinemann, 1996). Estudios de laboratorio han mostrado que la nicotina puede ser un potente activador cognitivo tanto en humanos como en animales (Rezvani y Levin, 2001). También se ha observado que los animales tratados con ligandos de los nAChRs (TC-2403 o TC 1734) mostraron mejorías duraderas en la función cognitiva (Lippiello y cols., 1996; Bencherif y cols., 1998). Aunque la nicotina puede mejorar la ejecución en tareas cognitivas en sujetos jóvenes, esta mejoría aparece más patente en personas mayores o con personas que presenta patologías asociadas a disfunciones en el sistema colinérgico, confirmando la implicación del sistema nicotínico en las capacidades cognitivas (Jones y cols., 1992; Rezvani y Levin, 2001). De hecho, gran parte de la investigación realizada tanto con nicotina como con otros agonistas nicotínicos se centra en la evaluación de los efectos cognitivos y neuroprotectores de estas sustancias en enfermedades neurodegenerativas como la EA. En este sentido, existen datos que apoyan que el déficit cognitivo que acompaña a estos pacientes se encuentra asociado con la pérdida de receptores nicotínicos cerebrales (Dajas-Bailador y cols., 2000; Hernández y Terry, 2005). Diversos trabajos han encontrado que la administración de nicotina a pacientes con EA (administrada subcutáneamente o intravenosa) aumenta la atención visual, el tiempo de reacción, el aprendizaje y la memoria (Jones y cols., 1992; Potter y cols., 1999; Rezvani y Levin, 2001). Estos efectos positivos se mantienen con la administración repetida (una vez al día durante 6 días) lo que sugiere que no se desarrolla tolerancia a los efectos de mejoría cognitiva (Levin y cols., 1990; Arendash y cols., 1995).

Los estudios con animales también han mostrado que la nicotina puede tener un amplio rango de efectos conductuales, aunque sus efectos parecen depender de factores como la especie, cepa, sexo, dosis, edad, o la pauta de administración de esta sustancia (Marks y cols., 1989; Levin y Simon, 1998). Investigaciones realizadas con distintos modelos animales muestran que la nicotina puede

estimular la actividad motora, aunque a dosis altas también puede inducir hipoactividad (Redolat y cols., 2002), inducir efectos ansiolíticos o ansiógenos de forma dosis-dependiente (Ouagazzal y cols., 1999; File y cols, 2000), y alterar la conducta agresiva (Driscoll y Baettig, 1981; Redolat y cols., 2002).

Un aspecto que ha recibido una gran atención por parte de la comunidad científica es la evaluación de los efectos de la nicotina sobre el aprendizaje y la memoria en animales. En este sentido diversos estudios han demostrado que este agonista colinérgico puede mejorar la ejecución tanto de tareas espaciales (Riekkinen y Riekkinen, 1997; Bernal y cols., 1999; Levin, 2002) como de tareas que no implican aprendizaje espacial (Brioni y Arneric, 1993; Zarrindast y cols., 1996; Yilmaz y cols., 1997). Al igual que en otras conductas, los efectos de la nicotina sobre el aprendizaje y la memoria pueden depender de diversos factores (especie, dosis, duración del tratamiento, la experiencia previa de los animales...). Uno de los factores que pueden influir en la acción de la nicotina sobre el aprendizaje son las características o requerimientos de la tarea experimental. Investigaciones en las que se ha valorado la influencia de la nicotina en el laberinto radial, tarea que evalúa tanto memoria de trabajo como memoria de referencia, señalan efectos facilitadores de la nicotina en la memoria de trabajo, pero no muestran un claro efecto sobre la memoria de referencia (Levin y cols., 1996). La nicotina también puede incrementar la capacidad de aprendizaje tanto en animales con lesiones en núcleos colinérgicos (Decker y cols., 1992) como en aquellos que presentan deterioro cognitivos debidos a la edad (Sahakian y cols., 1989; Sasaki, 1991; Levin y Torry, 1996).

En el condicionamiento de evitación activa, una tarea de memoria implícita que mide el recuerdo de una experiencia aversiva, los efectos de la nicotina han resultado conflictivos ya que parecen depender de diversos factores (Yilmaz y cols., 1997). En ratas viejas la administración repetida de nicotina mejora el aprendizaje de una tarea de evitación activa en un sentido (Arendash y cols., 1995). En ratones, uno de los factores que parece influir en los efectos de la nicotina en la tarea de evitación activa es la cepa, ya que se ha comprobado que

en ratones de las cepas C57 y DBA la nicotina no afecta al aprendizaje de la evitación activa, pudiendo incluso deteriorar el reaprendizaje de la misma (Gilliam y Schlesinger, 1985). También la dosis parece ser un factor importante en los efectos de esta sustancia, aunque puede interactuar con el sexo de los animales. Diversos trabajos sugieren que administración de nicotina a dosis menores de 0,5 mg/kg incrementa la conducta de evitación (Evangelista y cols., 1970; Essman, 1971; Orsingher y Fulginiti, 1973). En un estudio posterior en ratas se confirma que la nicotina a bajas dosis mejora el aprendizaje en machos y hembras pero a dosis elevadas puede deteriorar la ejecución de las hembras (Yilmaz y cols., 1997). En un estudio reciente, Vaglenova y colaboradores (2004) señalan que la exposición prenatal a la nicotina induce un aumento en el nivel de ansiedad durante la adolescencia y un déficit cognitivo importante en la edad adulta reflejado en una peor ejecución en la tarea de evitación activa.

En el laberinto de agua, una tarea que evalúa básicamente memoria espacial de referencia, la administración de nicotina en ratas mejora la adquisición de esta tarea (Hodges y cols., 1992; Decker y cols., 1992 y 1993; Grigoryan y cols., 1994; Riekkinen y cols., 1996a; Riekkinen y Riekkinen, 1997). En el laberinto de agua de Morris se ha observado que la nicotina ejerce un efecto positivo tanto en ratas jóvenes (Abdulla y cols., 1993 y 1996) como de edad avanzada (Socci y cols., 1995). En ratones, los efectos presentan mayor variabilidad, dependiendo de la dosis, de la cepa y del régimen de administración de esta sustancia psicoactiva (Lamberty y Gower, 1991b; Bernal y cols., 1999; Vicens y cols., 2003b). Por ejemplo, Bernal y colaboradores (1999) observaron que en ratones de la cepa C57 la nicotina podía mejorar la adquisición del laberinto de agua pero únicamente si la administración se iniciaba anteriormente al entrenamiento. En ratones hembra de la cepa NMRI, la nicotina no influyó sobre esta tarea espacial (Lamberty y Gower, 1991b). En ratones macho tampoco se pudo demostrar un claro efecto facilitador de la nicotina administrada a diferentes edades (Vicens y cols., 2003b).

Aunque pueden existir diferentes áreas cerebrales implicadas en los efectos de la nicotina sobre el aprendizaje y la memoria, se considera que el hipocampo es

una estructura crítica en acciones de la nicotina a nivel cognitivo. Las neuronas colinérgicas en el septum medial y en la banda diagonal envían proyecciones vía fórnix que inervan el hipocampo, encontrándose una alta concentración de receptores nicotínicos en esta estructura cerebral (Wonnacot, 1997; Paterson y Nordberg, 2000). Los subtipos $\alpha 7$ y $\alpha 4\beta 2$ son los que predominan principalmente en el hipocampo y los que se han relacionado con el procesamiento de la información (Levin y Rezvani, 2000). De hecho, en ratas se puede observar un incremento significativo de la ACh hipocampal después del aprendizaje de una tarea espacial (Stancampiano y cols., 1999). Los modelos de lesión confirman la implicación de la función nicotínica hipocampal en las funciones cognitivas (Levin y Rezvani, 2000). Las observaciones de pérdida de nAChRs en el hipocampo y el córtex frontal de pacientes con EA ayudan a completar el papel que juega dicha estructura en el funcionamiento cognitivo (Paterson y Nordberg, 2000).

Se ha comprobado que la administración de nicotina facilita la actividad sináptica hipocampal (Gray y cols., 1996) e incrementa la potenciación hipocampal a largo plazo (Hamid y cols., 1997). Estudios de lesión en animales también ponen de manifiesto los efectos neuroprotectores ejercidos por la nicotina. El tratamiento con esta sustancia psicoactiva puede reducir la muerte neuronal en el área CA1 del hipocampo después de un proceso isquémico cerebral (Nanri y cols., 1998). Otros trabajos también han confirmado los efectos positivos de la nicotina sobre la memoria. Por ejemplo, en un modelo de lesión cerebral con metanfetamina, la administración de nicotina mejoró los déficits de memoria (Levin y cols., 1993) y previno la degeneración de neuronas dopaminérgicas (Maggio y cols., 1998). Estudios recientes también sugieren que la nicotina induce cambios en los procesos de plasticidad sináptica que podrían estar claramente implicados en el proceso de adicción a esta sustancia (Pidoplichko y cols., 2004).

Uno de los factores a considerar cuando se evalúan la acción de la nicotina sobre las capacidades cognitivas es la posible interacción entre aprendizaje y emocionalidad. Cada vez más se empieza a tener en cuenta que los efectos

cognitivos de la nicotina pueden estar modulados por factores emocionales, como la ansiedad. Por ejemplo, en tareas de aprendizaje espacial (Prior y cols., 1997) y en tareas de evitación activa (Ribeiro y cols., 1999) se ha demostrado la importancia que puede ejercer el nivel de ansiedad en el aprendizaje.

2.4.-NICOTINA Y EMOCIONALIDAD

Los procesos emocionales tienen una influencia motivacional amplia y directa en el uso del tabaco. Para muchos fumadores fumar un cigarrillo se utiliza como una forma de afrontar emociones negativas. En un gran número de fumadores la urgencia para encender un cigarrillo parece estar estrechamente relacionada con el estado emocional en el que se encuentran (Parrott, 1999). De hecho, muchos fumadores indican que incrementan el consumo de cigarrillos cuando experimentan estrés, ansiedad o irritabilidad (Kassell y Yates, 2002). Se ha informado, además, que la administración de nicotina disminuye la ansiedad ante una situación estresante (Wesnes y Warburton, 1983). Por otra parte, estudios clínicos han mostrado una asociación entre diversos trastornos de ansiedad y dependencia a la nicotina (Breslau y cols., 1991) indicando mayor prevalencia de trastornos de ansiedad en sujetos fumadores. A la inversa, pacientes con ataques de pánico tienen un mayor consumo de tabaco (Breslau y Klein, 1999). En adolescentes también se ha descrito una asociación entre el riesgo de sufrir agorafobia y trastorno de ansiedad generalizada con el hecho de ser fumador con fuerte dependencia a la nicotina (Johnson y cols., 2000), aunque no se conocen claramente los factores que subyacen a dicha asociación.

Desde la perspectiva de la investigación en animales, se considera que las emociones incluirían conductas adaptativas y procesos fisiológicos y neurales (Paul y cols., 2005). En este sentido, el estudio de los efectos emocionales de la nicotina en animales está ayudando a clarificar la importancia de los receptores nicotínicos como posibles moduladores de las respuestas emocionales. Aunque la evidencia clínica sugiere que la nicotina reduce la ansiedad en situaciones estresantes, en animales se ha observado que la administración de nicotina puede tener tanto efectos ansiolíticos como ansiógenos en modelos de ansiedad. Dichos efectos ansiolíticos/ansiógenos ocasionados por la nicotina están probablemente mediados por acciones sobre diferentes neurotransmisores y diversas regiones cerebrales (File y cols., 1998). Los efectos ansiolíticos se han puesto de

manifiesto en varios paradigmas conductuales como el *white-black box* (Costall y cols., 1989), el laberinto elevado (Brioni y cols., 1993; Irvine y cols., 2001) o el test de interacción social (Irvine y cols., 1999) En el test de campo abierto, un paradigma utilizado para evaluar la actividad motora y el nivel de emocionalidad que presentan los animales, se ha encontrado que el tratamiento con nicotina indujo un descenso en la conducta de autoaseo, y después del cese del tratamiento, se observó en las ratas hipoactividad y un descenso en la conducta de erguirse (Thrauth y cols, 2000).

El papel modulador de la nicotina en la ansiedad parece ser variable según la dosis administrada: dosis bajas tienen efectos ansiolíticos (independientes de cambios en la actividad motora), mientras que dosis altas incrementan la ansiedad en el test de interacción social (File y cols., 1988). En el laberinto elevado en forma de cruz, File y colaboradores (2000) encontraron que la administración de nicotina en el hipocampo dorsal tuvo efectos ansiolíticos en ratas. Otros estudios han demostrado que los efectos de la nicotina en el laberinto elevado pueden ser bloqueados por mecamilamina (antagonista nicotínico) lo que indica una implicación de los receptores nicotínicos centrales (Brioni y cols., 1993). Se considera que el sistema colinérgico septo-hipocampal juega un papel importante en el control de la ansiedad, pero poco se conoce acerca de los subtipos de receptores implicados. Ross y colaboradores (2000) han señalado que en una línea de ratones *knock-out* que no presentan la sub-unidad $\alpha 4$, la conducta en el laberinto elevado fue consistente con una ansiedad elevada. Salas y colaboradores (2003) también con ratones *knock-out* señalan la implicación de esta sub-unidad en la conducta de ansiedad.

Se ha sugerido que la acción ansiolítica de la nicotina podría estar mediada por un aumento en la liberación del GABA (Ouagazzal y cols., 1999). Por ejemplo, la administración de flumazenil, agonista inverso de los receptores de benzodiazepina, bloquea los efectos ansiolíticos inducidos por nicotina, tanto en humanos como en animales, sugiriendo que la acción sedante de la nicotina se debe a la estimulación gabaérgica (Paterson y Nordberg, 2000). Se postula

también que el equilibrio entre los diversos sistemas de neurotransmisión es lo que subyace a la pérdida de efectos ansiolíticos de la nicotina a dosis bajas y la aparición de efectos ansiógenos a dosis altas (File y cols., 1998). El papel del tono colinérgico endógeno del hipocampo dorsal también puede modular la ansiedad en el test de interacción social (File y cols., 1998), aunque no parece estar implicado en otros modelos de ansiedad como el laberinto elevado en forma de cruz (Ouagazzal y cols., 1999).

Es conocida la implicación del sistema colinérgico en la modulación de la agresión, aunque el papel de los receptores nicotínicos ha sido escasamente estudiado. Se ha demostrado que los fumadores al fumar un cigarrillo disminuyen la intensidad y frecuencia de las respuestas agresivas (Cherek, 1984). Además, la privación de nicotina puede ocasionar un incremento de la irritabilidad y la agresión (Hughes y Hatsukami, 1986). Los escasos estudios realizados en animales también sugieren que la nicotina influye sobre la conducta agresiva. En ratas, la nicotina disminuye la agresión intraespecífica y la conducta predatoria (Driscoll y Baettig, 1981). En ratones se han obtenido datos contrarios, observándose una potenciación de la conducta agresiva tras la administración intraventricular de nicotina (Rolinski y Herburt, 1981) o ningún efecto tras su administración sistémica (Redolat y cols., 2000). Estos resultados indican que los efectos de la nicotina sobre la agresión son de tipo modular pero que, al igual que con otras conductas, su influencia depende en gran medida de la especie, la cepa y el test utilizado (Marks y cols., 1984; Levin, 2002).

3.- MODELOS DE APRENDIZAJE: EL LABERINTO DE AGUA Y EL CONDICIONAMIENTO DE EVITACIÓN ACTIVA

3.1.- EL LABERINTO DE AGUA

El laberinto de agua fue diseñado por Richard G. Morris con el objetivo de evaluar la memoria espacial en ratas (Morris, 1984). Consiste en una piscina circular llena de agua en la que se sumerge una plataforma que el animal debe localizar para escapar del agua. En este laberinto los animales deben aprender a utilizar las señales del entorno para la correcta ejecución de la tarea (ver Figuras 3-1 y 3-2). Este modelo animal permite valorar el aprendizaje relacional en roedores y presenta un especial interés para el estudio del aprendizaje y la memoria espacial principalmente porque no es necesaria la privación de comida o agua, ni la aplicación de una descarga eléctrica para motivar el aprendizaje (Gower y Lamberty, 1993). Otra de las ventajas del laberinto de agua es que el animal, con pocos ensayos, puede aprender a localizar una plataforma sumergida bajo el agua. Al ser un laberinto abierto de adquisición rápida se pueden estudiar los efectos de diferentes fármacos sobre los procesos de aprendizaje y memoria mejor que con otros laberintos de adquisición más lenta como el laberinto radial (Hodges, 1996). También ha demostrado ser una prueba conductual más sensible a un mal funcionamiento cognitivo que el laberinto radial (Myhrer, 2003).

Un aspecto a tener en cuenta en el laberinto de Morris es que la conducta de escape para situarse sobre la plataforma puede considerarse una recompensa en sí misma puesto que permite a los animales mantenerse fuera del agua. Aunque clásicamente se ha utilizado para valorar la memoria de referencia, siempre que la plataforma se sitúe en el mismo lugar (Hodges, 1996), en este modelo es posible evaluar también la memoria de trabajo, cuando se cambia la plataforma de posición en cada ensayo (Vicens y cols., 2003a). La memoria de referencia sería

independiente de los ensayos y nos daría información de cómo el animal aprende el procedimiento general para la ejecución de la tarea (Wong y cols., 1997). Se trataría de una memoria para las reglas de una *tarea* concreta, por ejemplo, que el laberinto de agua contiene una plataforma oculta (Dudchenko, 2004). En cambio, la memoria de trabajo sería una memoria con mayor contenido temporal y dependiente de los ensayos (Wyss y cols., 2000).

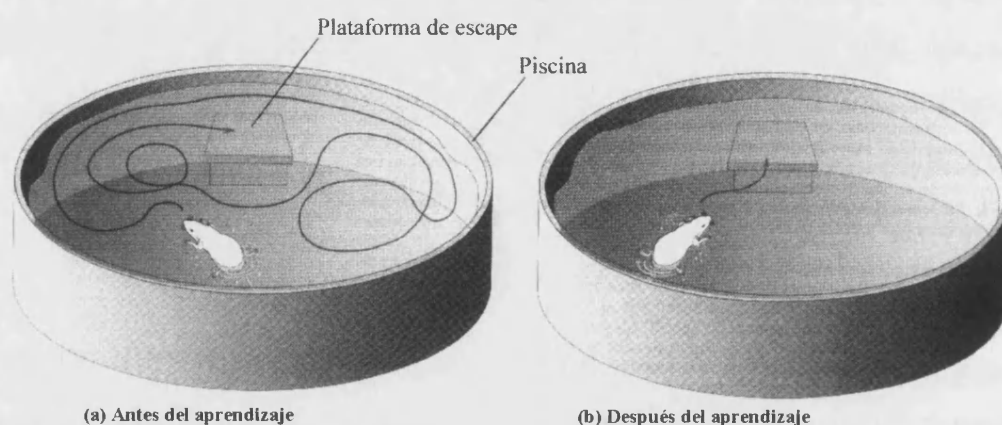


Figura 3-1: Laberinto de agua de Morris. a) Posible recorrido de una rata en el laberinto de agua en los primeros ensayos de entrenamiento; b) Posible recorrido de una rata en el laberinto de agua después del entrenamiento en la tarea (Tomado de Bear y cols., 1996).

3.1.1.- DESCRIPCIÓN Y PROCEDIMIENTO

El laberinto de agua de Morris mide la capacidad que tiene el animal para escapar del agua, guiándose por las claves exteriores que se sitúan fuera del laberinto. En general, la piscina circular se llena de agua hasta una altura aproximada de 1 cm por encima de la plataforma de escape y la temperatura del agua suele oscilar entre los 18 y los 27°C, según se utilicen ratas o ratones en la experimentación (Francis y cols., 1997). En el procedimiento tradicional, el agua

se vuelve opaca echando un poco de leche o alguna otra sustancia no tóxica que impida al animal ver la plataforma (Abdulla y cols., 1993). Parece que esta precaución es innecesaria puesto que el animal nada con la cabeza por encima del agua, lo que le impide ver la plataforma. El agua clara de la piscina imposibilita ver la plataforma transparente al igual que ocurre cuando el agua se vuelve oscura para impedir ver la plataforma negra (Fontana y cols., 1995). La utilización de agua clara es un procedimiento cada vez más aplicado por los investigadores (Vicens y cols., 2003a). El aparato, que inicialmente se diseñó para ratas, ha sido adaptado posteriormente para ratones, reduciendo su tamaño, con dimensiones entre 73-180 cm de diámetro y entre 28-57 cm de profundidad (Fordyce y Wehner, 1993). Como plataforma de escape se utiliza bien una plataforma circular, con diámetro de 10 cm (Zhou y Suszkiw, 2004), o bien una plataforma cuadrada de 6 x 6 cm (Berger-Sweeney y cols., 1995).

El laberinto de agua ha resultado ser un modelo animal útil en el estudio de la contribución de diferentes estructuras cerebrales a los procesos de aprendizaje y memoria, además de haber sido ampliamente utilizado en el estudio de los efectos de fármacos sobre el aprendizaje y la memoria espacial. En la versión tradicional del laberinto de agua, la plataforma de escape permanece oculta a los animales, lo que se conoce como *plataforma oculta* (Figura 3-2). En dicha versión los animales nadan en una piscina circular desde diferentes puntos de salida que se sitúan en el perímetro de la misma hasta una plataforma que se encuentra sumergida en una posición fija de ensayo a ensayo. Esta es la versión más utilizada del laberinto de agua de Morris (Dellu y cols., 1997; Bernal y cols., 1999). Otro procedimiento utilizado en la realización de esta tarea, conocido como *plataforma visible*, consiste en permitir que los animales naden hasta una plataforma que pueden localizar visualmente bien haciendo que la plataforma sobresalga sobre la superficie del agua (Zhou y Suszkiw, 2004) o bien utilizando alguna señal que permita su visualización (Lamberty y Gower, 1991a). En este procedimiento experimental los animales no utilizan la información espacial para resolver la tarea, siendo entonces un tipo de aprendizaje *hipocampo-independiente* (Logue y cols., 1997). La aplicación de este procedimiento con la plataforma

visible puede servir para controlar la influencia de los fármacos sobre factores no asociativos como la capacidad sensoriomotriz o la motivación de los animales para escapar del agua (Keith y Galizio, 1997). La ejecución de los animales en la tarea de natación con la plataforma oculta se considera una prueba de aprendizaje y memoria espacial, siendo imprescindible que el animal utilice las claves espaciales disponibles (Smith y Rose, 1996). Una buena ejecución en la versión de la plataforma oculta depende del correcto funcionamiento del hipocampo, puesto que las lesiones hipocampales deterioran este aprendizaje espacial (D'Hooge y De Deyn, 2001).

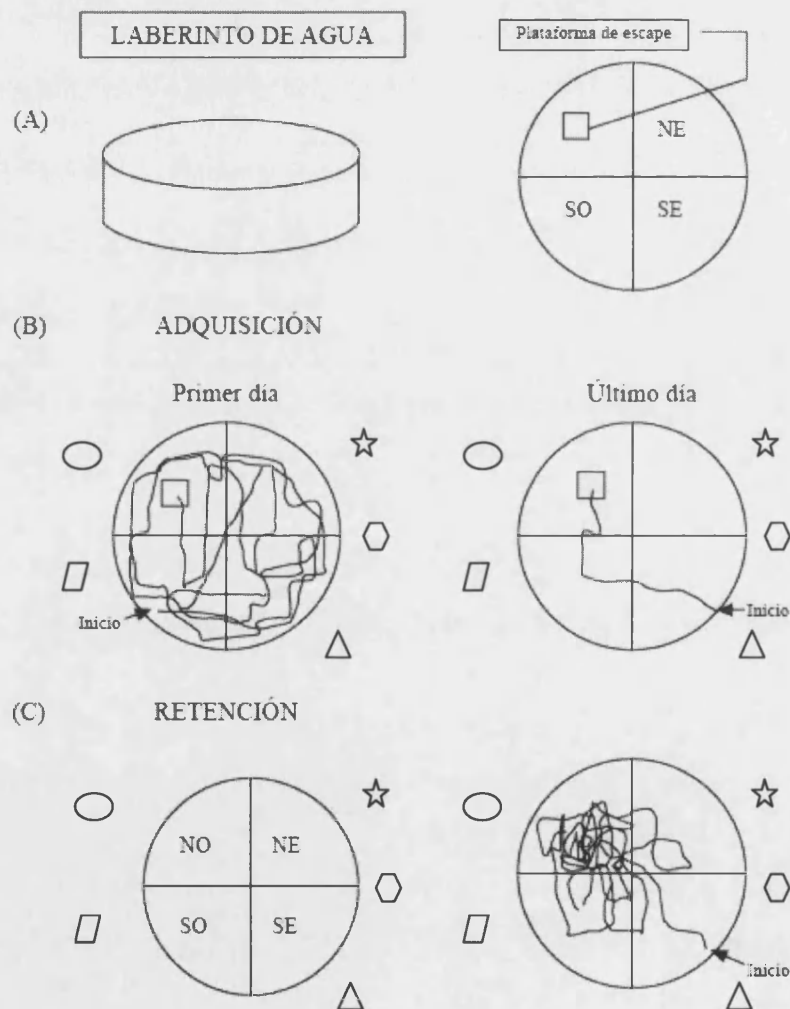


Figura 3-2: A) Laberinto de agua y lugar donde se sitúa la plataforma sumergida (cuadrante NO); B) Trayectoria que realiza el animal para alcanzar la plataforma sumergida en la fase de adquisición y las claves espaciales extra-laberinto utilizadas. Progresión de la trayectoria de aprendizaje desde el primer hasta el último día; C) Trayectoria del animal en la prueba final sin plataforma, el animal nada más tiempo en el cuadrante NO (Modificado de Vicens y cols., 2003a).

El procedimiento que se sigue cuando se entrena a los animales consiste en dejarles en el agua, desde uno de los diferentes puntos de salida situados alrededor de la piscina, con el hocico apuntando hacia las paredes de la misma. Una vez que el animal está nadando empieza a buscar la plataforma durante un tiempo determinado (normalmente entre 60 y 120 segundos). Si el animal no encuentra la plataforma el experimentador lo sitúa sobre la misma durante un tiempo (20-30 segundos), y después lo retira. Este procedimiento se repite a lo largo de varios ensayos y durante los días fijados de entrenamiento (Vicens y cols., 2003a). La medida utilizada en el análisis conductual de este test de natación es la valoración de la latencia de escape: el tiempo que transcurre desde que se coloca al animal dentro del tanque hasta que alcanza la plataforma, sube a ella y permanece al menos 5 segundos. Normalmente, el animal a medida que realiza más ensayos presenta latencias de escape más cortas, lo que confirma que está aprendiendo correctamente (D'Hooge y De Deyn, 2001).

Finalmente, tras el aprendizaje de la tarea se realiza una prueba final o ensayo de prueba (*probe trial*). En este ensayo se retira la plataforma y el animal nada en la piscina durante un periodo de tiempo, normalmente entre 60 y 120 seg. Para evaluar la conducta del animal se utiliza como medida el porcentaje de búsqueda en el cuadrante de entrenamiento. Esta respuesta se define como el porcentaje de tiempo que el animal pasa en el cuadrante donde previamente se encontraba la plataforma de escape en los ensayos de adquisición. Se considera una prueba de retención ya que, si el animal ha aprendido la tarea en la fase de adquisición, mayor será el porcentaje de tiempo que se encuentre en dicho cuadrante. Además, esta prueba final puede resultar útil en el análisis de las estrategias de aprendizaje de los animales (Gallagher y cols., 1993).

La correcta adquisición de la tarea del laberinto de agua requiere que los animales naden desde las posiciones de salida del perímetro de la piscina hasta el sitio donde está la plataforma oculta. Los animales deben adquirir además, otras habilidades importantes antes de localizar la plataforma de escape, ya que previamente deben nadar lejos de las paredes de la piscina, subir a la plataforma y

permanecer en ella para poder recordar la localización de la plataforma oculta. Sin embargo, en los ensayos iniciales los animales tienden a nadar por el perímetro de la piscina para posteriormente nadar hacia el centro de la misma (Lukonayov y cols., 2005). En el transcurso de los ensayos, los animales van corrigiendo sus recorridos de forma que cada vez utilizan menos tiempo para alcanzar la plataforma. Normalmente, los animales requieren pocos ensayos para aprender a nadar directamente a la plataforma de escape desde cualquiera de las posiciones de salida localizadas en el perímetro de la piscina (Francis y cols., 1995). En la mayoría de los procedimientos de adquisición, las posiciones de salida son aleatorias, para asegurar que los animales aprenden a utilizar las claves extra-laberinto y no un camino concreto hasta la plataforma (Chapillon y Roulet, 1996).

Según D'Hooge y De Deyn (2001) básicamente el animal puede utilizar tres estrategias distintas para alcanzar la plataforma durante el ensayo: 1) Utilizar una secuencia de movimientos aprendidos que le lleve hasta la plataforma (*praxis*); 2) Aproximarse a la plataforma mediante el uso de las claves proximales (*taxis*); 3) Navegar hacia la plataforma utilizando la configuración espacial que le aportan las claves distales (*mapping o estrategia espacial*). La tercera estrategia sería el *aprendizaje cartográfico* que implica el uso de las señales distales con las que los animales conforman su *mapa cognitivo* (Santín, 2000). Las dos primeras estrategias se incluyen dentro del *aprendizaje táxico*, en el que se distingue el *aprendizaje de orientación* que corresponde a la *praxis* de D'Hooge y el segundo a un *aprendizaje guía* que se asemeja a la *taxis*. Santín (2000), añade además la estrategia de *integración de la ruta*, que sería utilizada cuando las claves espaciales no proporcionan suficiente información y el sujeto necesita de pistas cinestésicas o vestibulares que, en función del lugar de salida, conformarían un sistema de referencia interno.

3.1.2.- BASES NEUROANATÓMICAS Y NEUROQUÍMICAS

Las bases neuroanatómicas del aprendizaje espacial se han estudiado principalmente mediante investigaciones sobre los efectos de la lesión de diferentes estructuras cerebrales en la ejecución de tareas de aprendizaje espacial. Dichos estudios han demostrado el destacado papel que desempeña el hipocampo en los procesos de aprendizaje y memoria espacial. Sin embargo, es importante tener en cuenta que existen otras estructuras cerebrales implicadas en dichos procesos (D'Hooge y De Deyn, 2001)

La formación hipocampal: Es una región especializada de la corteza límbica que se ubica en el lóbulo temporal formando una especie de cuerno a lo largo de la curvatura del ventrículo lateral. Forman parte de la formación hipocampal: el hipocampo, la corteza entorrinal, el giro dentado y el subículo (ver las Figuras 3-3A y B). La aferencia más importante proviene de la corteza entorrinal, que recibe *inputs* desde la corteza los cuales llegan al hipocampo (áreas CA1 y CA3, principalmente) por la vía perforante. También recibe *inputs* desde la corteza cingulada, perirrinal y parahipocampal. Las eferencias de la formación hipocampal se originan, principalmente, en el subículo, desde donde saldrán los *outputs* hacia la corteza cingulada y áreas de la corteza de asociación. Además, las eferencias de la formación hipocampal se dirigen, a través del fórnix, hacia los cuerpos mamilares, el tálamo anterior y la corteza cingulada. Todas las áreas de la formación hipocampal están implicadas en el procesamiento de la información espacial (Wyss y cols., 2000) aunque también intervienen en el procesamiento de información no espacial (Galani y cols., 1998; Lukonayov y cols., 2005) (ver Figura 3-3B).

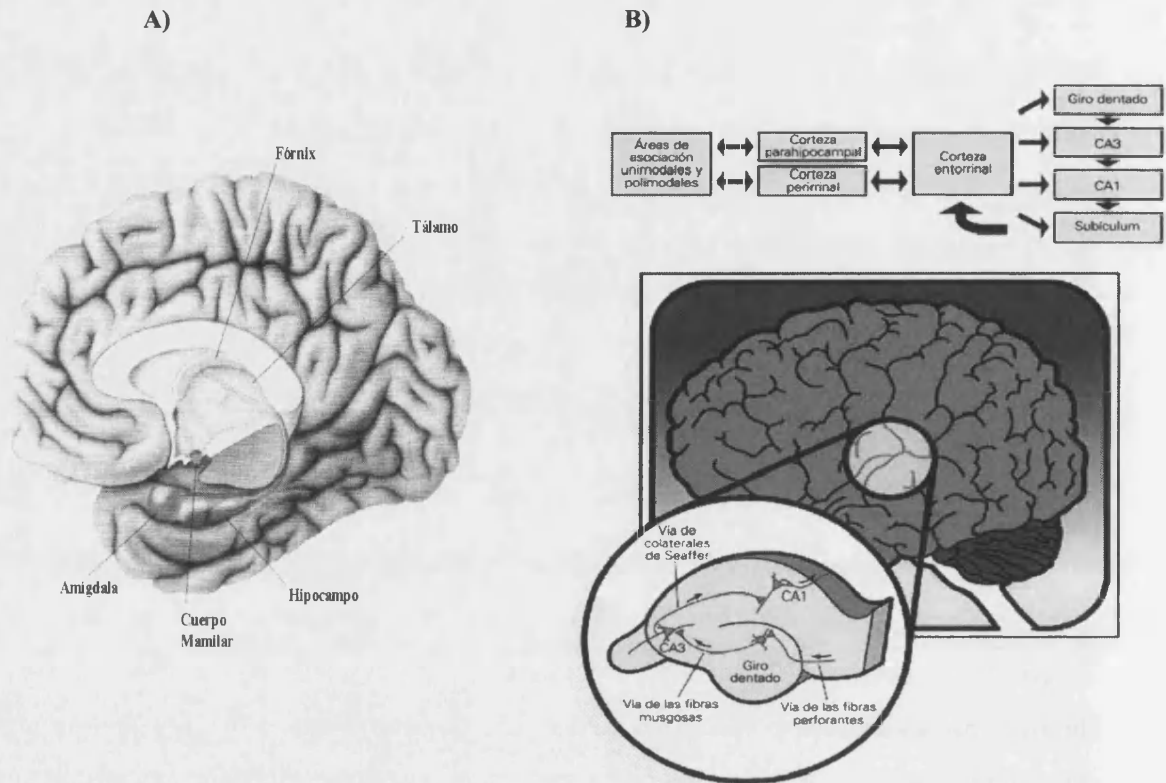


Figura 3-3: A) Localización del hipocampo (Tomado de Bear y cols., 1996); B) Diagrama de flujo y esquema de las principales vías del hipocampo involucradas en el procesamiento de la información (Tomado de Valencia-Alfonso y cols., 2004)

A nivel anatómico, el hipocampo se considera una estructura crítica para el aprendizaje y la memoria en sujetos humanos, interviniendo en la formación de nuevas representaciones de estímulos durante el aprendizaje y en el procesamiento de pistas contextuales necesarias para la memoria espacial (Gluck y Myers, 1993). En animales, experimentos realizados con el laberinto de agua muestran que el hipocampo parece ser el lugar donde se almacena la información espacial necesaria para una correcta ejecución, aunque no sería la única estructura implicada (Burwell y cols., 2004).

A nivel molecular, diversas investigaciones apoyan la idea de que la potenciación a largo plazo (LTP o *Long Term Potentiation*) ocurre más

rápidamente en el hipocampo y, por tanto, esta estructura podría ser importante en la formación del engrama (Cain, 1998). Además, aunque la LTP del hipocampo se ha asociado teóricamente a diversos tipos de aprendizaje, se ha relacionado más claramente con el aprendizaje espacial (Morris y cols., 1986). La inducción de ciertas formas de LTP implica un aumento post-sináptico de calcio (Ca^{2+}) dependiente de los receptores NMDA. Se ha observado que las sustancias que bloquean la LTP dependiente de los receptores NMDA deterioran el aprendizaje espacial en ratas (Almaguer-Melián y cols., 2002). Los resultados obtenidos en los estudios sobre manipulaciones genéticas en ratas y ratones también son consistentes con la idea de un posible papel de la LTP en el aprendizaje espacial (Silva y cols., 1998). Sin embargo, es importante tener en cuenta el hecho de que la saturación de la LTP puede causar déficits de aprendizaje en el laberinto de agua de Morris (Moser y cols., 1998), ya que en este estado neural no es posible, al menos durante un periodo de tiempo, la potenciación en ningún lugar de la vía que se pretende potenciar (Liao y cols., 1995).

Un estudio de Ramírez-Amaya y colaboradores (1999) demuestra que puede producirse sinaptogénesis (formación de contactos sinápticos) en las fibras musgosas del hipocampo después de someter a ratas adultas a sesiones repetidas de aprendizaje espacial en el laberinto de agua de Morris. Los resultados histológicos señalaron que los animales en los que se encontró un aumento significativo de las terminales de las fibras musgosas en CA3 fueron los que se habían entrenado durante varios días (10 ensayos por día) en comparación con aquellos animales que se habían entrenado solamente 1-2 días. Los animales entrenados durante 5 días fueron los que mejor recordaron la tarea una semana y hasta un mes más tarde, y además mostraron un mayor incremento en las proyecciones de las fibras musgosas. Dichos datos permiten sugerir que estas nuevas proyecciones podrían relacionarse con la formación de la memoria a largo plazo y la representación espacial (Balderas y cols., 2004).

A nivel celular, la hipótesis de O'Keefe y Nadel (1978) referente al hipocampo como la estructura cerebral a través de la cual se forma el mapa

cognitivo que permite al animal navegar en el espacio, está apoyada por el descubrimiento de un tipo de células, las *células de lugar* (*place cells*), ubicadas en el hipocampo y que se activan cuando el animal se encuentra en una localización concreta en determinado ambiente (O'Keefe y Dostrovsky, 1971). Anatómicamente, estas neuronas son células piramidales de la región CA1 y CA3; se han hallado tanto en ratas como en ratones y en ambas especies parecen codificar una representación polimodal del lugar y no simplemente las señales sobresalientes del entorno del animal (Cho y cols., 1998). Ello pone de manifiesto el papel de las células de lugar en la codificación de las localizaciones espaciales del ambiente y apoya, en el ámbito anatómico y funcional, la hipótesis de que el hipocampo está implicado en la formación del mapa cognitivo, el cual resulta crucial en el aprendizaje de lugar (Cain, 1998). Se considera que la representación de las células de lugar es plástica y que depende de los mismos mecanismos neurobiológicos que subyacen a la plasticidad sináptica (Jeffery y Hayman, 2004). Por su parte, Florian y Roullet (2004) enfatizan que el área hipocampal CA3 resulta imprescindible para la adquisición, pero sobre todo para la retención, del aprendizaje espacial.

Corteza parietal: Varias investigaciones apuntan la implicación del lóbulo parietal en procesos de aprendizaje y memoria espacial (Steinmetz, 1998; Constantinidis y Wang 2004). El córtex parietal parece estar más directamente implicado en la navegación cuando se utilizan señales proximales; en cambio, el hipocampo parece estar más involucrado en el procesamiento de las señales distales (Cressant y cols., 1997). La lesión del córtex parietal induce patrones de búsqueda diferentes a los que produce la lesión del hipocampo: los animales buscan la plataforma sumergida en el agua de manera más o menos aleatoria; los animales con lesiones del hipocampo utilizan estrategias como realizar círculos de diferentes diámetros para localizarla. Estas diferentes estrategias sugieren que las ratas con lesiones parietales muestran un grave deterioro en la ejecución del laberinto de agua, tanto en la fase de adquisición como en la fase de retención (DiMattia y Kesner, 1988).

McNaughton y cols., (1989) descubrieron unas células en el córtex parietal llamadas *células de dirección de la cabeza (head direction cells)*, que mostraban propiedades complementarias a las *células de lugar* del hipocampo. Estas células se encuentran situadas detrás del subículo y su actividad parece estar relacionada con la orientación de la cabeza de los animales con respecto al entorno, independientemente de su localización (Poucet y cols., 2003). El descubrimiento de estas células apoya la idea de que el córtex parietal integra y procesa tanto información visual como información relativa al movimiento (Save y cols., 1998). La contribución de la corteza parietal al procesamiento de la información espacial podría depender del grado de funcionalidad del hipocampo, aunque el papel de estas dos estructuras no puede aislarse de otras áreas cuya actividad parece estar implicada en algunos aspectos espaciales de la integración y procesamiento del entorno (Save y cols., 1998).

Hoh y colaboradores (2003), en una amplia investigación respecto a la implicación de zonas de la neocorteza en el laberinto de agua, corroboran el papel de la corteza parietal en la adquisición de la tarea, pero curiosamente encuentran que ratas entrenadas previamente a la lesión ejecutaron igual que las ratas controles. Estos resultados parecen sugerir que ninguna de las zonas de la neocorteza examinadas, entre ellas la corteza parietal, son cruciales para la realización de la prueba cuando los sujetos ya poseen estrategias para realizar la misma.

Otras estructuras implicadas en el aprendizaje espacial: Como hemos señalado, para el aprendizaje espacial es esencial la integridad de la formación hipocámpal, pero debemos remarcar que el proceso es mucho más complejo y requiere de la participación de otras estructuras y vías cerebrales (Cain y cols., 1996). De hecho, el aprendizaje espacial en general y la ejecución del laberinto de Morris en particular, requieren de la acción coordinada de diversas áreas

cerebrales que constituyen una red neural funcionalmente integrada (D'Hooge y De Deyn, 2001).

Estudios con ratas con lesiones en el tálamo lateral muestran deficiencias en el aprendizaje tanto con plataforma oculta como visible (Savage y cols., 1997), y sugieren que las estructuras del tálamo podrían intervenir en la memoria de trabajo espacial (Mumby y cols., 1999). Dicha memoria de trabajo espacial en ratas también se ve perjudicada por lesiones en los cuerpos mamilares (Santín y cols., 1999), y además, varios estudios implican a la amígdala en diferentes aspectos de la ejecución del laberinto de agua (Spanis y cols., 1999; Kim y cols., 2005). Asimismo, lesiones en el locus coeruleus y en núcleos del rafe afectan la ejecución del laberinto de Morris (Compton y cols., 1995). Las lesiones en los núcleos dorsales del rafe no afectaron al aprendizaje en el laberinto de agua, pero agravaron los efectos de las lesiones de los ganglios basales (Riekkinen y cols., 1990). En un experimento con el laberinto de agua de Morris y la administración de anfetamina post-entrenamiento en el hipocampo, Packard y colaboradores (1994) observaron que mejoraba la retención del laberinto basado en claves espaciales, mientras que si la administración se producía en el núcleo caudado, la retención facilitada era la del laberinto guiado por claves visuales. Sin embargo, la administración en la amígdala facilitó la retención de la tarea en ambas situaciones.

Debemos señalar, además, que no sólo las lesiones de áreas cerebrales relevantes para el aprendizaje espacial sino la desconexión entre ellas pueden perjudicar la ejecución del laberinto de agua. Por ejemplo, las lesiones de la fimbria y el fórnix interrumpen la mayor parte de las conexiones que se abren paso a través de estas estructuras, por lo que convierten en disfuncional al hipocampo, además de que estas fibras median en funciones no atribuibles al hipocampo (Whishaw y Jarrard, 1995). A nivel conductual, las lesiones en la fimbria-fórnix mostraron un aprendizaje deficiente con plataforma oculta (Nilson y cols., 1989). Recientemente Mogensen y colaboradores (2005) han señalado que tras seccionar esta estructura, las ratas lesionadas mostraron una orientación

egocéntrica en un ensayo sin plataforma, y en cambio, tras lesiones del córtex prefrontal utilizaron otras estrategias distintas.

Las lesiones en el núcleo basal magnocelular, principal estructura colinérgica, parecen deteriorar gravemente el aprendizaje de la localización espacial de una plataforma oculta en el laberinto de agua, tanto utilizando una estrategia aloécéntrica como egocéntrica (Nieto-Escámez y cols., 2002), aunque este núcleo parece jugar un mayor papel durante te las fases de adquisición de la tarea que durante su ejecución (Nieto-Escámez y cols., 2004).

Investigaciones realizadas en ratas han llevado a sugerir que el estriado dorsal (caudado-putamen) también podría desempeñar un papel relevante, aunque diferenciado del hipocampo, en la organización espacial de la conducta. Parece que las regiones laterales del estriado dorsal participarían en el aprendizaje de hábitos estímulo-respuesta mientras que el estriado dorsal medial podría intervenir e influir en una forma de memoria cognitiva similar a la asociada típicamente con el hipocampo (Packard y Knowlton, 2002). Esta teoría se basa en la evidencia de que las lesiones en el estriado dorsal medial perjudican la capacidad de navegación espacial en el laberinto de agua con plataforma oculta; en cambio, lesiones en las regiones laterales del estriado dorsal no la alteran (Devan y White, 1999).

Respecto a las *bases neuroquímicas* del aprendizaje espacial, las evidencias obtenidas en pacientes con Enfermedad de Alzheimer (EA) así como numerosos estudios realizados en animales han confirmado el importante papel del sistema colinérgico en los procesos de aprendizaje y memoria, particularmente en la memoria espacial (Riekkinen y cols., 1997; Myhrer, 2003). Señalaremos en primer lugar el relevante papel del sistema colinérgico en el aprendizaje espacial y brevemente la función de otras sustancias neurotransmisoras con mayor implicación en este modelo animal.

Acetilcolina: El declive en la actividad colinérgica central en la EA se halla bien documentado (Perry y cols., 1986; Pepeu y Giovanelli, 1994). Las reducciones en la acetilcolintransferasa (AChT), enzima que interviene en la síntesis de acetilcolina, correlacionan con la reducción en el número de neuronas colinérgicas centrales así como con el grado de deterioro cognitivo (Levin, 1992; Levin y Simon, 1998). Diversos estudios muestran también que los deterioros del aprendizaje espacial en ratas de edad avanzada se relacionan con la disminución de la actividad de la AChT en la región del cerebro basal anterior (Gallagher, 1993). Estas observaciones apoyan la denominada *hipótesis colinérgica de la memoria* (Bartus y cols., 1982), según la cual se considera que los déficits en el sistema colinérgico podrían ser responsables del deterioro cognitivo que se observa tanto en el envejecimiento normal como en la EA. Dicha hipótesis apunta al sistema colinérgico como el más claramente implicado en el deterioro cognitivo asociado al envejecimiento normal y al patológico (Francis y cols., 1999).

Un gran número de investigaciones se han centrado en evaluar los efectos de la administración de agonistas y antagonistas colinérgicos sobre la adquisición y retención del laberinto de agua. Los resultados de dichas investigaciones apoyan, en general, el papel del sistema colinérgico en el aprendizaje espacial así como la independencia funcional entre los dos tipos de receptores colinérgicos (muscarínicos y nicotínicos) en la regulación de este tipo de aprendizaje. Estos dos receptores parecen tener efectos simplemente aditivos ya que, generalmente, no se observa interacción entre ellos en el control de la memoria espacial (Cozzolino y cols., 1994).

La nicotina, agonista colinérgico, influye sobre la ejecución en el laberinto de agua, aunque sus efectos parecen depender de la dosis y de la duración de la exposición al fármaco, así como de las características de los animales experimentales y del régimen de administración (Vicens y cols., 2003a). Por ejemplo, la administración aguda de nicotina antes del entrenamiento diario mejora el aprendizaje en ratas de edad avanzada (Socci y cols., 1995; Riekkinen y Riekkinen, 1997), en ratas jóvenes con lesiones septales (Hodges y cols., 1992;

Grigoryan y cols., 1994), y en ratas jóvenes no lesionadas (Hodges y cols., 1995). Sin embargo, no se han observado efectos beneficiosos del tratamiento agudo con nicotina en ratones intactos de la cepa NMRI (Lamberty y Gower, 1991b) ni tras 10 días de administración en la evaluación de la tarea a varias edades (Vicens y cols., 2003b). Attaway y colaboradores (1999) tampoco indican mejoría en ratas Fisher jóvenes o viejas, aunque sí señalan que la nicotina aumenta la velocidad de nado en el laberinto de agua. Por otra parte, la administración crónica de nicotina antes de la evaluación en el laberinto de agua de Morris mejora la adquisición de esta tarea en ratas jóvenes (Abdulla y cols., 1996). Por ejemplo, cuando el tratamiento con nicotina se inicia 3 días antes de la evaluación en la prueba conductual y sigue durante la realización de la misma, facilita la ejecución en el laberinto de agua tanto en ratas jóvenes como en ratas de edad avanzada (Socci y cols., 1995). En ratones de la cepa C57 se ha observado que la nicotina acelera la tasa de aprendizaje de la tarea cuando la administración se inicia 5 días antes de la adquisición de la tarea, pero no cuando se administra únicamente antes del entrenamiento diario (Bernal y cols., 1999). En ratas, tras una lesión del cortex fronto-medial Brown y colaboradores (2000) aportan una mejoría en la adquisición del laberinto de agua tras el tratamiento con nicotina durante 11 días; mejoría que no se observa en ratas controles. Estos mismos autores señalan también un efecto compensatorio de la nicotina tras lesiones en la fimbria-fornix, efecto que se revierte tras la administración de mecamilamina (Brown y cols., 2001b).

La fisostigmina, un inhibidor de la enzima acetilcolinesterasa (AChE: enzima que inactiva la ACh), induce una mejora moderada del funcionamiento cognitivo, aunque la mayor desventaja de esta sustancia es la corta duración de su efecto (Johansson y Nordberg, 1993). La rivastigmina, un agente anticolinesterásico, mejora los déficits motores y el deterioro de la memoria espacial producidos por un traumatismo cerebral en ratones (Chen y cols., 1998). También se ha observado que la tacrina (*tetra-hidroaminoacridina o THA*), otro agente inhibidor de la AChE, puede estabilizar los déficits en la memoria de referencia observados en el laberinto de agua tanto en ratas con lesiones septales

como en ratas de edad avanzada (Riekkinen y cols., 1991). La pilocarpina, agonista muscarínico, previene los déficits cognitivos en ratas de edad avanzada logrando que su ejecución no sea diferente a la de ratas jóvenes (De-Mello y cols., 2005)

Por otra parte, las manipulaciones farmacológicas que suprimen la actividad de la ACh en el hipocampo producen déficits en la ejecución en el laberinto de agua, confirmando la implicación del sistema colinérgico en el aprendizaje espacial (Whishaw, 1985). Así, la escopolamina, antagonista muscarínico, deteriora la adquisición y la retención del laberinto de agua (Abdulla y cols., 1993; Zheng y cols., 2002), y la fenserina (inhibidor colinesterásico) contrarresta los déficits provocados por la escopolamina (Janas y cols., 2005). La administración de mecamilamina, antagonista nicotínico central, empeora la adquisición de la información espacial en este laberinto aunque no afecta al recuerdo de la información espacial previamente adquirida (Decker y Majchrzak, 1992). La administración de hexametonio, antagonista nicotínico periférico, aumenta también las latencias de escape en el laberinto de agua, aunque su efecto es menor que el de la mecamilamina (Decker y Majchrzak, 1992). Las lesiones con ácido iboténico (análogo del glutamato) en el septum medial induce efectos amnésicos en la tarea de aprendizaje espacial y provoca signos degenerativos como un descenso en la actividad de la AChT y en las neuronas reactivas al AChE en el hipocampo (CA1 y CA3 sobre todo) y en el córtex frontal (Kim y cols., 2004). Recientemente, Wu y Yu (2004) señalan que la administración de oxitocina en el núcleo basal magnocelular (NBM) incrementó la latencia de las ratas en el laberinto de agua de Morris, indicando un deterioro en la adquisición de la tarea espacial, aunque la retención no se ve afectada. Los autores apuntan que los efectos de la oxitocina en el aprendizaje y memoria están causados por su interacción con el sistema colinérgico y mediados por el receptor de oxitocina.

NMDA y Glutamato: Diversos estudios apoyan la hipótesis de que los receptores NMDA, implicados en el fenómeno de la LTP (Izquierdo, 1991; Xu y

cols., 2005) son críticos para el inicio de la modificación sináptica que subyace al aprendizaje espacial aunque no son necesarios para la transmisión sináptica implicada en la recuperación de la información espacial. El estudio de este sistema de neurotransmisión es importante puesto que el fenómeno de la LTP en la mayoría de sinapsis del hipocampo depende de la actividad de los receptores NMDA (Cain, 1998; Kim y cols., 2004).

Para evaluar el papel de los receptores NMDA en la sinaptogénesis, Balderas y colaboradores (2004) estudian la aplicación antes de la adquisición del laberinto de agua del antagonista NMDA denominado MK801, y observan que afecta al aprendizaje, aunque finalmente los animales al quinto día adquieren la tarea. También se aprecian un fuerte daño en la memoria, y en la inducción de la sinaptogénesis en la región CA3. Este estudio sugiere que para que se pueda consolidar la memoria a largo plazo se requieren los eventos plásticos provocados por sesiones reiteradas de aprendizaje, así como el funcionamiento de los receptores NMDA para la formación de nuevas sinapsis y la consolidación de la memoria de la tarea espacial (Tang y cols., 1999).

Otros trabajos también confirman que los antagonistas de los receptores NMDA, incluso a pequeñas dosis, dan lugar a un grave deterioro en la adquisición de tareas de aprendizaje espacial de forma altamente específica, sin dañar la ejecución de la memoria (D'Hooge y De Deyn, 2001). Por otra parte, el tratamiento con glutamato monosódico induce déficits en el aprendizaje de la tarea del laberinto de agua debido, probablemente, a la lesión del hipocampo. Dichos déficits podrían atribuirse al hecho de que los mecanismos colinérgicos del hipocampo están alterados y podrían implicar una disminución en la síntesis de acetilcolina (Wong y cols., 1997).

Por otro lado, la activación de los receptores α_1 -adrenérgicos y de los lugares de unión para la glicina en el complejo receptor NMDA puede, hasta cierto punto, contrarrestar los déficits relacionados con la edad en el laberinto de agua (Riekkinen y cols., 1996b y 1997). En ratas, el tratamiento con una

neurotoxina que destruye los axones y terminales noradrenérgicos del locus coeruleus no tuvo efecto en la adquisición del laberinto de Morris (Lapiz y cols., 1999) y lesiones con 6-OHDA afectan el aprendizaje espacial dependiendo de la temperatura del agua (si está fría puede mejorar el aprendizaje), lo que sugiere que el sistema noradrenérgico no juega un papel preponderante en el aprendizaje de lugar (Lapiz y cols., 2001).

GABA: Parece que la activación del sistema gabaérgico inhibitorio interfiere directamente en las capacidades de aprendizaje espacial, y la supresión de su actividad puede aumentar esas y otras capacidades (Myhrer, 2003). En general se ha observado que los agonistas benzodiazepínicos deterioran el aprendizaje espacial (McNamara y Skelton, 1993) pero estos deterioros pueden ser revertidos con una familiarización previa al laberinto o bien con un pre-entrenamiento en una tarea no espacial, por lo que es posible que los efectos de dichos agonistas ejerzan sus efectos a través de la motivación para escapar del agua (Myhrer, 2003). De acuerdo con esta última idea, la buspirona también deterioró la adquisición del laberinto de agua de forma similar a las benzodiazepinas (McNaughton y Morris, 1992)

Dopamina: El sistema dopaminérgico es otro de los sistemas estudiados en relación con el aprendizaje espacial. En general los antagonistas dopaminérgicos deterioran el aprendizaje espacial. Se ha observado que el haloperidol, antagonista dopaminérgico, impide este tipo de aprendizaje en ratas. La administración de haloperidol a dosis bajas, deteriora la ejecución en el laberinto de agua en la versión de la plataforma oculta, mientras que con la plataforma visible no se ve alterada (McNamara y Skelton, 1993). En la interpretación de estos resultados hay que tener en cuenta que dosis elevadas de haloperidol provocan alteraciones motoras y/o motivacionales que pueden interferir en la ejecución de la tarea espacial (D'Hooge y De Deyn, 2001). Sin embargo, también se ha demostrado que los antipsicóticos, al inhibir la transmisión dopaminérgica, impiden los

procesos de memoria. Animales transgénicos sin expresar los receptores D_{1A} mostraron una ejecución deteriorada tanto con plataforma oculta como visible y los deterioros no parecían deberse a dificultades motoras para el nado aunque sí se percibió una elevada conducta de tigmotaxis. Hersi y colaboradores (1995) señalan que tras la administración de un agonista D₁ se observó una mejora en la adquisición en ratas viejas. Es posible que los efectos beneficiosos de los componentes dopaminérgicos en el laberinto de Morris se encuentren mediados por las interacciones dopamina-acetilcolina que ponen de manifiesto que la liberación de ACh hipocampal se ve incrementada por los agonistas dopaminérgicos (Laplante y cols., 2004).

Opiáceos endógenos: El sistema opiáceo también afecta el aprendizaje espacial en el laberinto de agua. Por ejemplo, la administración aguda de naloxona y naltrexona, antagonistas opiáceos, antes del entrenamiento diario en la tarea mejora la adquisición y ejecución de la misma (Decker y cols., 1989) mientras que la administración de morfina la deteriora y puede contrarrestarse con la administración de naloxona (McNamara y Skelton, 1993) así como con la administración de fisostigmina (Zheng y cols., 2002). En este último estudio, Zheng además señala que la administración conjunta de morfina y escopolamina supera el deterioro inducido por cada sustancia por separado, lo que sugiere una relación entre el sistema opioide y colinérgico en el aprendizaje espacial.

Otros sistemas implicados: Además de los distintos sistemas de neurotransmisión implicados en el aprendizaje espacial, otros mecanismos neurobiológicos podrían jugar un papel importante en este aprendizaje, como por ejemplo factores de crecimiento nervioso o algunos neuropéptidos. Los factores neurotróficos son sustancias que promueven el crecimiento y diferenciación de las neuronas, siendo especialmente importante el Factor de Crecimiento Nervioso (*Non Growing Factor o NGF*) (Smith, 1996). En ratas envejecidas hay una relación entre los niveles de NGF y el aprendizaje espacial de modo que la

administración intraventricular de NGF durante dos semanas aumenta el tamaño de las neuronas del cerebro anterior, estimula la actividad de la AChT y mejora la memoria espacial (Henriksson y cols., 1992). Como se ha señalado, la nicotina puede favorecer también la memoria espacial, y según Hernández y Terry (2005) dichos efectos favorables en el sistema colinérgico y en las funciones mnésicas podrían estar mediados por receptores NGF de alta afinidad. Tanto los cambios en la morfología dendrítica encontrados en el córtex prefrontal (Brown y cols., 2001a), como el aumento en la liberación de factores NGF en el hipocampo (French y cols., 1999) tras la administración de nicotina pueden contribuir a los efectos facilitadores de dicho agonista colinérgico en el aprendizaje espacial, puesto que lesiones de ambas estructuras deterioran la ejecución del laberinto de agua de Morris. Así neuropéptidos pueden actuar como neurotransmisores o neuromoduladores en el SNC y pueden estar implicados en los procesos de aprendizaje espacial. La contribución de la somatostatina al aprendizaje del laberinto de Morris no está del todo clara, pero recientemente se ha observado que un agonista de la angiotensina puede facilitar el aprendizaje, mientras que un antagonista deteriora la adquisición. La administración en el septum de vasopresina también provocó un aumento en las latencias de escape del laberinto de agua (Myhrer, 2003).

Las evidencias señaladas en las páginas precedentes sobre los mecanismos neurobiológicos que subyacen al aprendizaje en el modelo del laberinto de agua de Morris, sugieren que una ejecución óptima de la tarea requiere de una red neural de funcionamiento integrada entre las diferentes áreas y sistemas de neurotransmisión que intervienen en el aprendizaje y la memoria espacial.

3.2.- EL CONDICIONAMIENTO DE EVITACIÓN ACTIVA

Este tipo de paradigma permite evaluar, dependiendo del procedimiento de aplicación del mismo, tanto la adquisición como el recuerdo implícito de una tarea de tipo asociativo que combina componentes de condicionamiento clásico y de condicionamiento instrumental (aunque haya diferentes teorías al respecto, tal como expondremos en un apartado posterior).

El condicionamiento de evitación activa es una tarea compleja de aprendizaje y memoria no declarativa (Heyser y cols., 1999; Vaglenova y cols., 2004) en la cual el aprendizaje emocional parece desempeñar un papel muy importante (Beuzen y Belzung, 1995), e incluso algunos autores lo consideran un modelo muy útil para estudiar la implicación emocional en un aprendizaje de miedo (Zhang y cols., 2005). En este sentido, se considera una tarea tanto de aprendizaje condicionado como de respuesta emocional ante un estímulo aversivo (Brambilla y cols., 1997). Esta tarea implica, además, un alto grado de conflicto provocado por la tendencia a la evitación pasiva (quedarse quieto) y la activa (cambiar de compartimento) debido a que, en cada ensayo, los animales deben aprender a cruzar al lado de la caja donde anteriormente han recibido una descarga si quieren evitar la siguiente (Ferré y cols., 1994). En las etapas de entrenamiento iniciales conlleva niveles elevados de miedo condicionado (Aguilar y cols., 2002) y, en estos ensayos, la ansiedad parece desempeñar un papel fundamental (Ferré y cols., 1994).

En los roedores, existen amplias diferencias individuales para aprender este condicionamiento. Algunos animales muestran una buena capacidad de aprendizaje, mientras que otros necesitan más sesiones de entrenamiento para conseguirlo o no llegan a aprenderlo (Morgado, 2002). Estas diferencias en el fenotipo de la conducta de evitación han dado lugar a la cría selectiva de ratas *altamente evitadoras* y *poco evitadoras* utilizadas en diferentes estudios (Escorihuela y cols., 1999). Otras investigaciones han puesto de manifiesto importantes diferencias entre cepas en la adquisición de las respuestas de

evitación (Heyser y cols., 1999; Brennan, 2004). También se han observado diferencias entre ratas y ratones en esta tarea debidas principalmente a que los ratones presentan una menor tendencia que las ratas a mostrar la conducta de *freezing* (inmovilización) al enfrentarse con un estímulo de miedo. Estas distinciones en la respuesta de evitación son de especial relevancia ya que de ello se deriva que dicha tarea es un aprendizaje sensible tanto a las diferencias individuales mostradas por los sujetos como al posible efecto de las manipulaciones ambientales debido al alto contenido emocional que presenta.

Como se ha señalado, el condicionamiento de evitación activa es una tarea de aprendizaje no declarativo. *Bajo el nombre de memoria implícita (no declarativa) se engloban un conjunto de diferentes formas de memoria no conscientes, memorias que implican cambios en hábitos, en habilidades y en la manera de responder a los estímulos como consecuencia de la experiencia adquirida. La memoria implícita es la memoria de cómo se realizan las cosas que hacemos normalmente* (Morgado, 2005). Las diferentes formas de memoria no declarativa implican regiones que se encargan de la percepción del material presentado, juntamente con algunas estructuras que procesan la información motora y emocional (neocorteza, neocortezado o amígdala). En cualquier caso, parecen ser memorias independientes de la formación hipocampal, puesto que se encuentran conservadas en pacientes con lesiones en el lóbulo temporal medial además de que pueden observarse en invertebrados, que no poseen formación hipocampal. Recientemente, sin embargo, ha podido comprobarse experimentalmente que la separación entre los distintos sistemas de memoria no es tan estricta como se planteaba y los sistemas de memoria no declarativa pueden interactuar entre ellos e incluso junto con el sistema de memoria declarativa (Morgado, 2005).

3.2.1.- DESCRIPCIÓN Y PROCEDIMIENTO

La tarea de evitación activa se considera un modelo dual de aprendizaje y memoria implícita (Morgado, 2005) en la que el sujeto tiene que aprender a ejecutar una determinada respuesta para evitar un castigo. La presentación del castigo suele ir precedida de una señal de alarma que señala el momento indicado para realizar la respuesta. Si bien al comienzo de la prueba el sujeto *huye* del estímulo aversivo (generalmente un choque eléctrico ligero en las patas), las repetidas asociaciones entre la señal de alarma y la estimulación aversiva permiten que el sujeto responda a la señal de alarma y pueda así *evitar* el estímulo aversivo consiguiente (la descarga eléctrica). El emparejamiento de ambos estímulos produce el condicionamiento de miedo ante la señal de alarma y motiva la respuesta (Cándido y cols., 2004) El primer paso del aprendizaje de evitación es generalmente el escape; a medida que continúa el entrenamiento aparecen reacciones anticipatorias ante la señal de aviso que permiten al animal evitar la descarga. Las conductas de evitación también pueden desarrollarse en ausencia de señales externas, como ocurre en el caso de la evitación no discriminada o tipo Sidman, en la que el estímulo incondicionado se aplica a intervalos de tiempo regulares, y el paso del tiempo (o estímulos relacionados con él) sirve como estímulo condicionado (Cándido y cols., 2004)

El aprendizaje de evitación depende de diversos factores, incluyendo tanto las propiedades del estímulo condicionado (EC) como del incondicionado (EI), el intervalo entre ambos estímulos, la configuración del aparato, la topografía de la respuesta requerida, la especie y cepa de animales utilizada, etc. (Overmier, 1979; Cándido y cols., 2004; Myers y cols., 2005). Como estímulos incondicionados pueden usarse infinidad de estímulos aversivos, aunque el más utilizado es una descarga eléctrica suave en las patas del animal (normalmente roedores). Los estímulos condicionados reflejan mayor variedad porque cualquier señal detectable puede servir (sonido, luz, posición del aparato, intervalo de tiempo, etc.). Los más efectivos son aquellos que no se han asociado previamente al EI. La duración del estímulo condicionado influye en el nivel de dificultad del

condicionamiento de evitación. En términos generales y cuando los otros parámetros se mantienen inalterados, hay una relación directa entre la duración del estímulo condicionado y el número de respuestas de evitación efectuado por ratas no tratadas (Edo-Izquierdo y cols., 1994). Se ha sugerido que el EC, como estímulo de aviso puede ganar propiedades discriminativas cuando aumenta su duración y así facilitar la formación de asociaciones entre el EC y EI. Aunque probablemente al incrementarse la duración del EC se reduzca la demanda de un rápido proceso de selección y ejecución de las respuestas (Satorra-Marín y cols., 2001).

En cuanto a la intensidad del estímulo incondicionado, el aprendizaje de evitación se describió como una función en forma de U invertida cuyo pico está alrededor de 0,25-0,30 mA. (Levine, 1966) demostrando que los niveles altos y bajos de intensidad de la descarga retrasan la aparición de la conducta de evitación. Otros autores sugieren que para evitar conductas que perturben el aprendizaje, como la inmovilidad, saltos, agarre a la barrera de separación entre los compartimentos etc, es esencial que las descargas sean de una intensidad ligera (0,125 a 0,5 mA) y entre éstas, a mayor intensidad mayor aprendizaje (Van der Heyden y Bradford, 1988; Myers y cols., 2005), aunque investigaciones recientes indican que una intensidad de 0,25 mA parece el mínimo requerido para obtener aprendizaje (Brush., 2003a; Zhang y cols., 2005). Probablemente para conseguir un mejor aprendizaje sea necesaria una estudiada combinación de los EIs y ECs utilizados, por ejemplo y según Edo-Izquierdo y colaboradores (1994) se observa una mejor ejecución con un EI de baja intensidad, especialmente cuando el EC tiene una mayor duración.

En relación con el intervalo entre los estímulos condicionado e incondicionado se observa generalmente que cuanto mayor es dicho intervalo, menor es el aprendizaje; la contigüidad parece ser esencial para obtener determinados aprendizajes basados en el condicionamiento clásico (Tarpy, 1987). También se ha observado que a mayor intervalo entre ensayos, mayor ejecución

de respuesta. Sin embargo, si es demasiado largo las respuestas comienzan a disminuir.

En general, durante el condicionamiento de evitación, se contabilizan tres tipos de respuesta: *evitación*, si el animal cruza en la presentación del EC (luz o sonido); *escape*, cuando el animal cruza ante el EI (descarga); *no respuesta*, cuando el animal no cambia de lado. Esta topografía determina, generalmente, la cantidad de aprendizaje conseguido. Una consideración en este sentido es que los animales aprenderán más rápidamente conductas de respuesta adaptativas si éstas forman parte del repertorio de conductas defensivas de su especie (Bolles, 1970). Además, debido a que la respuesta de evitación implica un componente motor, cualquier fármaco, lesión o manipulación que incremente la actividad locomotora de los animales podría aumentar el número de evitaciones (Vinader-Caerols y cols., 1996; Aguilar y cols., 1998) mientras que los fármacos catalépticos o que disminuyan la conducta motora pueden producir un deterioro en el aprendizaje (Aguilar y cols., 2004).

La evitación activa puede estudiarse con diversas pruebas de conducta como el corredor de evitación condicionada (*runway avoidance*); la caja de evitación (*shuttle box*) de una o de dos vías; el corredor circular (*circular runway*); métodos de escape vertical (*pole jump o pole climb*); respuesta de retirada de la pata; respuestas derivadas de la conducta operante (*lever press o wheel turning*) y evitación de la fuente de la descarga eléctrica. Además, una misma caja de evitación puede usarse aplicando distintos procedimientos. Por ejemplo, en *shuttle box* la respuesta del animal puede ser la de cruzar siempre hacia el mismo lado (*one-way active avoidance*) o cruzar de un lado a otro (*two-way active avoidance*).

De todas las pruebas de evitación quizá el más utilizado sea el paradigma de evitación activa de dos sentidos (*two-way active avoidance*). Esta técnica de condicionamiento fue descrita por primera vez en 1932 por Warner. Se entrena al sujeto en una caja de dos compartimentos (*shuttle box*) donde debe aprender a

cambiar de lado después de la señal de alarma (una luz, un sonido o ambos) para evitar una descarga eléctrica en las patas. El animal puede recibir la descarga en cualquiera de los dos compartimentos por lo que, a veces, el animal debe moverse en el sentido inverso al ensayo anterior para escapar o evitar la descarga.

La evitación activa de dos sentidos es una tarea más difícil que la de una vía o el corredor de evitación, probablemente debido a la falta de una zona segura permanente. El conflicto experimental generado es mayor porque, además de una respuesta de miedo al EC, también se desencadena un condicionamiento de miedo al contexto (Torras-García y cols., 2003). Estas circunstancias conllevan que los factores emocionales se vean incrementados en este tipo de aprendizaje (Zhang y cols., 2005). En cambio, este tipo de tarea tiene la ventaja de evitarle manipulaciones constantes al animal entre ensayo y ensayo.

Generalmente, se diferencian cuatro fases en la adquisición de esta tarea:

1. En los ensayos iniciales, las latencias de escape son bastante elevadas.
2. En los siguientes ensayos, dichas latencias se acortan.
3. Posteriormente, aparece la primera evitación, existiendo un período en el que se alternan respuestas de escape y de evitación.
4. El animal evita la situación continuamente, disminuyendo considerablemente el número de escapes y casi desapareciendo el número de no respuestas.

Después de adquirir la respuesta de evitación, generalmente se reducen considerablemente los síntomas de miedo y el animal se muestra más tranquilo al realizar la conducta. Los fallos en la conducta de evitación pueden deberse a alguno de estos factores: 1) Una sensibilidad reducida al dolor; 2) El tratamiento farmacológico, las condiciones de alojamiento, alguna lesión, etc. pueden provocar un enlentecimiento motor; 3) Algunos de los animales podrían haber interpretado el EI como inescapable, sin darse cuenta que había una respuesta específica capaz de hacer desaparecer la descarga eléctrica, manifestando así

síntomas observados en la indefensión aprendida; 4) Los ensayos sin respuesta pueden ser un reflejo del fallo en el mecanismo de selección de respuesta: los animales podrían haber aprendido respuestas que disminuyeran el malestar (elevar las patas delanteras, encogerse, saltar, colgarse de las paredes o del separador) pero que no eran las más efectivas (Satorra-Marín y cols., 2001).

El paradigma del condicionamiento de evitación activa permite evaluar la adquisición y el recuerdo implícito de una tarea de tipo asociativo que combina componentes de condicionamiento clásico y de condicionamiento instrumental (Squire, 1992; Guillazo-Blanch y cols., 2002) aunque para algunos autores este tipo de aprendizaje tiene características de un paradigma único que puede distinguirse de ambos tipos de condicionamiento (Overmier, 1979). Presentaremos brevemente las distintas teorías explicativas de este aprendizaje ya que pueden ser relevantes para comprender la complejidad de este modelo.

En 1970 Bolles propuso que la conducta de evitación activa podía ser explicada únicamente como un condicionamiento clásico, sin ningún componente de condicionamiento instrumental. Según esta teoría, las respuestas de huida-evitación son respuestas incondicionadas frente a estímulos aversivos y la elección de un tipo concreto de respuesta dependerá de la situación. Posteriormente se ha observado que aunque algunos datos experimentales apoyarían esta teoría (es más rápido aprender una respuesta de evitación como correr de lado a lado que presionar una palanca), otros sugieren que resulta incompleta. Como el mismo Bolles sugirió, se adquieren antes aquellas conductas que se encuentran en el repertorio de las conductas defensivas de cada especie. Además, Kamin (1956) ya había demostrado previamente que cuando la respuesta de evitación no acaba con la presentación del EI y/o EC, el condicionamiento clásico entre ambos estímulos no es suficiente para aprender la tarea en la *shuttle box*. Datos más recientes apoyan la idea de que el aprendizaje de evitación activa, como parte del paradigma defensivo instrumental, incluye un componente de condicionamiento clásico de miedo (Savonenko y cols., 2003). Otros autores, sin embargo, han sugerido que la conducta de evitación puede ser un aprendizaje

instrumental sin la intervención del condicionamiento clásico. Estos trabajos intentan demostrar que la adquisición de una conducta de evitación es posible sin que se vea reforzada por la desaparición de una señal de alarma, aunque una de las deficiencias de estas teorías es que no dejan claro cuál es el estímulo que refuerza la conducta de evitación y además, ponen en duda el postulado de contigüidad del condicionamiento clásico. En diferentes experimentos para apoyar esta teoría se ha obtenido aprendizaje sin esta asociación de dos acontecimientos en un momento concreto, por lo que se cree que el hipocampo puede jugar cierto papel en la adquisición de este tipo de respuestas de evitación, al ser la estructura cerebral capaz de mantener las asociaciones discontinuas (Wallenstein y cols., 1998) y detectar elementos comunes en distintos eventos (Guillazo-Blanch y cols., 2002). Además, como veremos al explicar las estructuras implicadas en este condicionamiento, las evidencias parecen señalar un papel de las regiones corticales que rodean el hipocampo en el aprendizaje contextual (Burwell y cols., 2004).

La teoría de los dos factores, inicialmente propuesta por Mowrer y Miller fue la primera que intentó explicar la conducta de evitación señalando que se trataba de una respuesta compleja compuesta tanto por condicionamiento clásico como por condicionamiento instrumental. Según esta teoría, debido a las repetidas asociaciones, el estímulo de alarma (EI) se convierte en un estímulo condicionado (EC) de miedo. La teoría continúa afirmando que la conducta de evitación es una respuesta instrumental más reforzada por la desaparición del EC que por la no aparición del EI (Gray, 1993). Sin embargo, la explicación ofrecida por esta teoría resultaba incompleta. Si lo que mantenía la conducta de evitación era el miedo al EC, cuando el sujeto ya ha aprendido a evitar el EI, este miedo al EC debería extinguirse al no presentarse la descarga, por lo que también debería hacerlo la conducta de evitación (Cándido y cols., 2004). Fue necesaria la reformulación de la teoría y se introdujeron las *señales de seguridad* como una variable implicada en el aprendizaje de evitación activa. Experimentalmente se ha podido demostrar que el miedo al EC disminuye a lo largo de las sesiones y que las señales de seguridad se convierten en reforzadores secundarios que adquieren sus

propiedades reforzantes por asociación con períodos libres de estimulación aversiva (Dinsmoor, 2001). De hecho, durante la evitación de doble sentido, el miedo al EC no disminuye a lo largo de las sesiones si no hay señales de seguridad que lo inhiban (Cándido y cols., 2004).

Amorapanth y colaboradores (2000) han conseguido diseñar un experimento en el que han separado ambos componentes, instrumental y clásico del aprendizaje de evitación activa. El diseño de su experimento constaba de dos fases: 1) Fase de condicionamiento clásico: condicionan aversivamente un tono asociándolo a una descarga eléctrica. Los sujetos aprenden dicha asociación realizando una conducta de miedo ante el EC; 2) Fase de condicionamiento instrumental: los sujetos se exponen al EC en una habitación experimental nueva y si saltan a un compartimento contiguo, el EC termina reforzando así esta conducta. Sólo si se aprende el condicionamiento clásico previo, se puede adquirir un condicionamiento instrumental. De este modo consiguen disociar ambos condicionamientos necesarios para obtener la conducta de evitación activa según la teoría de los dos factores. Parece pues, que la teoría que más se adapta al conjunto de datos obtenidos en investigaciones realizadas con la tarea de evitación activa sea la teoría de los dos factores. No debemos esperar que esta teoría sea capaz de explicar todas las conductas de evitación, porque es muy posible que distintos sistemas de memoria contribuyan e interaccionen en este tipo de aprendizaje complejo.

Además de las teorías basadas en el condicionamiento, algunos autores consideran la conducta de evitación activa más como un modelo de reactividad emocional que como un modelo de aprendizaje. Sus trabajos se han basado fundamentalmente en los resultados de estudios llevados a cabo con dos cepas de ratas: las llamadas *Romanas*, principalmente estudiadas por el grupo de investigación de Fernández-Teruel y sus colaboradores (2002) y las llamadas *Siracusa* con investigaciones llevadas a cabo por el equipo de Brush (2003ab). Ambas cepas están criadas selectivamente por la conducta mostrada en *shuttle box*, lo que posibilita clasificarlas como *altas* y *bajas evitadoras*. Las ratas

Romanas seleccionadas como *buenas o altas evitadoras* (RHA: *Roman high-avoidance*) y las *Siracusa* (SHA) adquieren la tarea de forma muy rápida en contraste con las *malas o bajas evitadoras* (RLA: *Roman low-avoidance*) y las SLA que muestran una conducta de evitación extremadamente pobre (Aguilar y cols., 2002). Las marcadas diferencias se han atribuido a factores emocionales y/o motivacionales (Brush, 2003a). Los criterios de selección en los inicios de la cría selectiva establecieron como *buenas evitadoras* las ratas que realizaban 40 evitaciones durante 60 ensayos; y las *malas evitadoras* se hallaban cerca de 0. Más adelante y con un entrenamiento adicional (300 ensayos) los animales que realizan bien la tarea casi alcanzan el 100% de evitaciones; mientras que el fenotipo *mal evitador* alcanzan únicamente entre un 25-40% de evitaciones (Brush, 2003a). Ambas cepas no difieren en la conducta motora necesaria para la tarea, detectan la descarga por igual y no presentan deficiencias en el sistema auditivo ni en discriminación visual (Zhang y cols., 2005)

Además de por su conducta en evitación, estas ratas difieren en otros muchos aspectos, tanto a nivel conductual, como neuroendocrino, neuroquímico, inmunológico y recientemente, también se han observado diferencias genéticas. La línea RHA, además de su superioridad en la conducta de evitación, presenta una baja reactividad emocional y generalmente afronta las situaciones de forma más activa y efectiva. Estas ratas son más propensas a la búsqueda de sensaciones, por ejemplo exploran más los lugares iluminados y tiene mayor tendencia a probar nuevas sustancias aunque su sabor sea aversivo (Fernández-Teruel y Escorihuela, 1997) lo que podría explicar, al menos en parte, su conducta diferencial en evitación activa. Parecen ser menos ansiosas, muestran mayor reactividad conductual y preferencia por sustancias reforzantes, así como mayor activación del sistema mesolímbico tras la administración de estimulantes (Fernández-Teruel y cols., 1997) Son animales considerados poco miedosos/hipoemotivos (Aguilar y cols., 2002). Las ratas poco evitadoras (RLA) son animales miedosos que muestran una elevada reactividad emocional en medidas conductuales y cuentan con una organización endocrina que les predispone a mostrar parámetros hormonales de reacción al estrés en un amplio abanico de situaciones

experimentales (Ferré y cols., 1994) y son ratas consideradas miedosas/hiperemotivas (Aguilar y cols., 2002). También se han encontrado diferencias a nivel neuroendocrino en los niveles de prolactina y corticosterona (Steimer y cols., 1997), hormona corticotropa y adrenocorticotropina (Aguilar y cols., 2002) así como en neurotransmisión dopaminérgica (Lecca y cols., 2004), gabaérgica (Giorgi, 2003a) y serotoninérgica (Giorgi, 2003b).

Respecto a las diferencias genéticas, en un artículo de Fernández-Teruel y su equipo (2002) las evidencias permiten sugerir a los autores que en el cromosoma 5 existe, al menos, un gen implicado en la manifestación de la conducta de miedo; uno de cuyos alelos provoca el aumento del número de evitaciones y cambios en el tiempo pasado en los brazos abiertos del laberinto elevado, así como en la actividad en campo abierto y en el *rearing*. Señalan que dicho patrón es consistente con la acción de los fármacos ansiolíticos, que aumentan el número de evitaciones y el tiempo en los brazos desprotegidos del laberinto elevado. En este sentido y, a título de ejemplo de las investigaciones actuales que estudian la relación entre genes y conducta de evitación, Zhang y colaboradores (2005) encuentran diferencias en la expresión genética de varios genes multifuncionales (pleiotrópicos) en el hipocampo, entre ellos uno implicado en plasticidad sináptica y otro gen diana de los fármacos antidepresivos ISRS (Inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina). Estos autores concluyen que las diferencias en la conducta de miedo entre *ratas altas y bajas evitadoras* probablemente emergen de la acumulación de *muchos pequeños cambios* a nivel genético. Actualmente se considera que en el aprendizaje de miedo y la emoción hay implicados cambios estructurales y bioquímicos en las sinapsis que muy probablemente requieren de una alteración en la expresión y función génica. Además de todas estas diferencias expuestas que pueden ayudar a dilucidar las implicaciones en conducta de evitación, nos parece importante resaltar que ambas cepas muestran diferencias en su morfología hipocampal (Lipp y cols., 1988 y 1989). Abundaremos en esta diferencia en el siguiente apartado en el que intentaremos presentar el papel de diversas estructuras cerebrales en el condicionamiento de evitación activa de doble sentido.

3.2.2.- BASES NEUROANATÓMICAS Y NEUROQUÍMICAS

Investigaciones clásicas señalan la relación entre la amígdala y el condicionamiento de evitación activa. Ashford y Jones (1976) mostraron que la lesión por 6-OHDA de los núcleos amigdalinos dificultaba la adquisición de una respuesta en *shuttle box* sin afectar a su retención o extinción. Schutz e Izquierdo (1979) demostraron claramente la implicación de la amígdala tanto en este condicionamiento como en otros con gran carga emocional. Yeudall y Walley (1977) observaron como la extirpación de la amígdala impedía la ejecución de las respuestas de evitación, pero no su aprendizaje y retención. Posteriormente diversos trabajos han ido poniendo de manifiesto cuáles son los núcleos amigdalinos implicados en el condicionamiento de evitación. Por ejemplo, Roozendaal y colaboradores. (1993) mostraron como la lesión del núcleo central de la amígdala impedía la adquisición, pero no la retención del aprendizaje de evitación activa. El estudio de Amorapanth y colaboradores (2000) también evaluó el papel de los núcleos de la amígdala en la adquisición de los componentes clásicos e instrumentales de la conducta de evitación activa. Las lesiones en el núcleo lateral bloquearon la adquisición tanto del condicionamiento clásico (no aprendían la respuesta de miedo) como del instrumental (cambiar de compartimento), por tanto éste podría ser el lugar donde se asocian el EI y el EC (Savonenko y cols., 2003). La lesión en el núcleo central de la amígdala bloqueó el cambio de compartimento, pero no el miedo. Este núcleo parece recoger las aferencias del núcleo lateral y está implicado en las respuestas reflejas de miedo (*freezing*), en la expresión de diferentes cambios autonómicos (LeDoux y cols., 1990) y en la reactividad al dolor (Helmstetter, 1992). Además, actualmente se ha observado que el *arousal* emocional produce incrementos en la tasa de disparo de las neuronas de este núcleo (Pelletier y cols., 2005). Por último, la lesión en el núcleo basal no permitió aprender la conducta de miedo pero sí el cambio de zona en la *shuttle-box*. Este núcleo parece ser el responsable, junto con los sistemas estriatales, de formar las asociaciones necesarias entre el reforzador y la conducta motora (Amorapanth y cols., 2000). Savonenko y su equipo, (2003) en una completa investigación con el paradigma de evitación de doble sentido, señalan

que el bloqueo de los receptores NMDA en la amígdala basolateral produce un deterioro en dicho aprendizaje, que se refleja en un déficit en la retención del miedo al contexto a largo plazo aunque la adquisición a corto plazo del condicionamiento de miedo se mantenga. Por ello, estos autores sugieren que para aprender la asociación entre el EC-EI, necesaria para realizar una respuesta instrumental adaptativa, se requiere del normal funcionamiento de los receptores NMDA en la amígdala basolateral y proponen que estos resultados apoyan el papel de la amígdala en el almacenamiento a largo plazo de las memorias de miedo. Numerosas investigaciones recientes apoyan la idea de que el aprendizaje y el recuerdo de los sucesos temidos dependen de la integridad de la amígdala (Maren y Quirk, 2004).

La amígdala se ha relacionado generalmente con el condicionamiento de miedo (Maren, 2003) mientras que el hipocampo se aprecia como una estructura necesaria para un procesamiento de los datos complejos, así como para los detalles del ambiente espacial, del contexto (LeDoux, 1992; Guillazo-Blanch y cols., 2002). El aprendizaje del condicionamiento que nos ocupa, la conducta de evitación de doble vía, requiere de la participación de ambas estructuras y podría verse afectada por cambios o lesiones en ambas (Rubio y cols., 1999). Los hallazgos recientes indicando que el condicionamiento de miedo produce un incremento en la sincronización del ritmo theta en la amígdala lateral y en la región CA1 del hipocampo proporcionan evidencia de que la activación del circuito amígdala-hipocampo está implicado en el condicionamiento de miedo (Seidenbecher y cols., 2003). Para estos autores la actividad theta en dicho circuito representa un incremento en la comunicación neural para promover o estabilizar la plasticidad sináptica en estas zonas en relación con retención de la memoria de miedo. En este sentido, Bramhan y colaboradores (1994) ya habían encontrado un aumento del ritmo theta hipocampal tras el entrenamiento en una tarea de evitación activa. Las investigaciones actuales apuntan en la dirección de asumir como críticas para el aprendizaje emocional (incluyendo la evitación activa), las interacciones bidireccionales entre el complejo amigdalino y el hipocampo (Zhang y cols., 2005).

En la mayoría de estudios anteriores se había sugerido que la tarea de evitación activa podía adquirirse sin la participación del hipocampo. Tras varias investigaciones al respecto, comienza a establecerse claramente una relación entre hipocampo y conducta de evitación debido principalmente a que la ejecución en *shuttle box* es sensible a los efectos de la lesión en esta estructura cerebral, señalando que la formación hipocampal facilita el aprendizaje de la conducta de evitación activa en *shuttle box* (Gray y McNaughton, 1983; Gray, 1993; Van der Borght y cols., 2005). El estudio de dicha relación adquirió gran importancia al observarse que animales considerados *malos aprendedores* en este condicionamiento, muestran un mayor número de fibras musgosas en el hipocampo que sinaptan en las capas intra e infrapiramidales de CA3 (Lipp y cols., 1988). En este sentido, se ha comprobado la correlación negativa entre la habilidad mostrada por las ratas en la tarea de evitación activa y la plasticidad sináptica hipocampal, especialmente en el giro dentado (Roman y cols., 1999). Esta correlación también se ha observado en ratones DBA que muestran una buena ejecución en evitación y proyecciones más cortas en las fibras hipocampales así como mayores densidades en receptores de kainato en estriado y corteza que la cepa C57 (peores en *shuttle-box*). En esta última cepa, la potenciación a largo plazo en el hipocampo resultó ser de mayor duración que en los DBA. En este sentido y en un estudio reciente, Van der Borght y colaboradores (2005) ponen de manifiesto que, tras el entrenamiento en la tarea de evitación activa (durante 1 o 4 días), no se altera ni la proliferación ni la supervivencia celular en la zona subgranular del hipocampo; parece que tras la realización de la tarea de evitación no se producen efectos en la neurogénesis hipocampal.

Es muy posible que las modificaciones en el circuito intrahipocampal influyan en los procesos moduladores de la conducta de evitación de doble sentido (Lipp y cols., 1988). La facilitación en la adquisición de esta tarea provocada por lesiones hipocampales se ha interpretado como resultado de la falta de procesamiento de la información espacial que permite al animal volver al compartimento donde se ha recibido una descarga eléctrica con anterioridad

(Packard y Knowlton; 2002; Torras-García, 2003). Es decir, lo que permitiría la lesión hipocampal o el menor número de fibras musgosas en CA3, es que no se condicione aversivamente el contexto y el animal cambie de lado de la caja. Guillazo-Blanch y colaboradores (2002) observan tras lesiones de la fimbria-fórnix (principal *input* subcortical del hipocampo) el mismo efecto facilitador y lo relacionan con un déficit en la capacidad de recordar el contexto de miedo. Se ha señalado que, generalmente, las lesiones septales deterioran la ejecución en una amplia variedad de tareas, entre ellas la evitación inhibitoria y la evitación de un sentido. Sin embargo, parece que estas lesiones incrementan la evitación de doble sentido (Torras-García y cols., 2003). En este mismo trabajo experimental se demostró que tras la lesión de una zona anterodorsal medial del septum (no relacionada con la ansiedad) también mejoraba la ejecución en *shuttle box*. Estos autores descartan que los efectos facilitadores se relacionen con un aumento en la actividad motora, o con un descenso de la conducta exploratoria o de la ansiedad, considerando más plausible que el efecto de mejora se deba a un déficit en el aprendizaje del contexto de miedo, probablemente a través de la vía septo-hipocampal vía fimbria-fórnix (Torras-García y cols., 2003). Estos resultados coinciden con los señalados anteriormente por Pouzet y colaboradores, (1999) que indicaban que tras una lesión en dicha estructura realizada con radiofrecuencia, se apreciaba una pérdida completa de AChE en todo el hipocampo y como consecuencia, una facilitación de la conducta de evitación, un aumento de la actividad y un deterioro en la adquisición del laberinto de agua. Gutiérrez-Figueroa y colaboradores (1997) señalan que la lesión del córtex entorrinal (principal fuente de inputs al hipocampo junto con la fimbria-fórnix) mediante NMDA administrado en dos momentos diferentes de entrenamiento del condicionamiento de evitación activa (pre- y post-entrenamiento) produjo un deterioro en la adquisición de la tarea en *shuttle box*.

En cuanto a otras estructuras implicadas en este condicionamiento, Packard y Knowlton (2002) en una extensa revisión acerca de las funciones de los ganglios basales en el aprendizaje y la memoria, aportan que las lesiones pre-entrenamiento del núcleo caudado deterioran la adquisición de la tarea de evitación activa de dos

sentidos. Se ha sugerido que el papel de los ganglios basales, y especialmente del estriado dorsal, en el aprendizaje y la memoria tiene que ver con una función mediadora en el aprendizaje estímulo-respuesta y de hábitos (McGaugh, 2004). La función del estriado dorsal en la conducta de evitación parece depender de sus aferencias dopaminérgicas. Recientemente, un estudio de Da Cunha y colaboradores (2002) han mostrado como la lesión de la *pars compacta* de la sustancia negra con una neurotoxina que provoca una importante depleción de dopamina en el estriado dorsal, impide el aprendizaje y la retención de una tarea de evitación activa de dos sentidos. La integración sensoriomotora (dependiente de la dopamina) que se produce en esta estructura es necesaria para este tipo de aprendizaje. En este mismo sentido, un estudio para investigar los efectos de los posibles tratamientos de Parkinson en el aprendizaje y memoria, también señalan que una lesión de la *pars compacta* de la sustancia negra (con la consiguiente pérdida de dopamina y de sus metabolitos en el estriado) causa un deterioro en la memoria de la tarea de evitación que no consiguió ser revertido por el tratamiento con L-Dopa (Gevaerd y cols., 2001).

La autoestimulación eléctrica intracraneal (AEIC) en el hipotálamo lateral (HL), mejoró la adquisición y la retención de la tarea de *shuttle box* tanto administrada pre como post-entrenamiento en ratas Wistar jóvenes (Segura-Torres y cols., 1988; Massanés-Rotger y cols., 1998), facilitación que fue mayor en las ratas con menor nivel de condicionamiento y más débil en las *buenas evitadoras* (Aldavert-Vera y cols., 1996). La AEIC también mejoró la adquisición en ratas viejas (Aldavert-Vera y cols., 1997). En otro estudio se ha demostrado que a mayor número de trenes de AEIC, más evitaciones aprendían a realizar las ratas y sugieren que dicha estimulación provoca una activación general del SNC que facilitaría el aprendizaje de la tarea (Segura-Torres y cols., 1991). Redolar-Ripoll y colaboradores (2003) observan que la AEIC del HL facilita la consolidación de la memoria en ratas jóvenes y viejas, además de revertir el déficit en sujetos viejos o con una lesión del núcleo parafascicular (PF), pero no afecta la recuperación. Previamente estos mismos autores habían señalado que la AEIC provocaba efectos de facilitación más potentes sobre la consolidación de la memoria que la

propia experiencia (adición de 20 ensayos al entrenamiento) (Redolar-Ripoll y cols., 2002). También la AEIC del haz prosencefálico medial (HPM) ha resultado útil para acelerar la retención de la tarea de evitación activa (Morgado, 2002) en ratas normales, de edad avanzada o neurológicamente dañadas. La mejora se aprecia más en aquellos sujetos que aprenden peor la tarea, igualando la ejecución de ambos grupos de ratas diferenciadas por una alta o baja capacidad de aprendizaje de evitación (Aldavert-Vera y cols., 1996). Los efectos de mejora producidos por la AEIC en el condicionamiento de evitación, además de por la estimulación en la zona concreta, también podrían deberse a la consiguiente activación del sistema de recompensa cerebral, incrementando la liberación de dopamina en el sistema mesolímbico (Aldavert-Vera y cols., 1997).

La estimulación del núcleo PF, estructura talámica que recibe *inputs* principalmente colinérgicos, parece tener efectos moduladores en la evitación de doble vía, puesto que si se estimula la zona posterior se incrementa la adquisición; en cambio, la estimulación central deteriora el aprendizaje (Guillazo-Blanch y cols., 1995a; Vale-Martínez y cols., 1998). Dicho núcleo parece tener un papel modulador en la adquisición del condicionamiento de evitación por ser funcionalmente heterogéneo (Vale-Martínez y cols., 1998) y podría contribuir a la consolidación del aprendizaje (Guillazo-Blanch y cols., 1995ab). Se ha observado que animales con lesión en este núcleo que se aplicaron AEIC superaron en evitaciones a las ratas normales sanas, sin ningún tipo de lesión cerebral y hasta animales viejos recuperaron la capacidad de recuerdo tras la AEIC y realizaron una ejecución comparable a la de los jóvenes (Morgado, 2002). Massanés-Rotger y colaboradores (1998) encuentran deterioro tanto en la adquisición como en la retención tras lesiones del núcleo PF, más acusado cuanto mayor es el tamaño de la lesión y no reversibles por la estimulación del hipotálamo lateral, que necesita del núcleo PF intacto para ejercer sus efectos facilitadores. Sos-Hinojosa y colaboradores (2003) también observan deterioro en la retención del aprendizaje de evitación en el día 11 tras la lesión del núcleo basal magnocelular, pero este daño sí es revertido por la estimulación del PF posterior, probablemente por la

modulación producida en la consolidación a largo plazo de la tarea. También se han observado efectos de facilitación en el aprendizaje de evitación tras lesiones en el núcleo reticular rostral del tálamo, que probablemente dependan del tipo de tarea, debido a que en otros aprendizajes tal lesión provoca efectos deteriorantes (Tenas-Huerga y cols., 1998).

Diversos *sistemas de neurotransmisión* se han investigado en el condicionamiento de evitación activa, aunque un examen detallado de los datos indica que uno de los más estudiados ha sido la dopamina porque la tarea de evitación se utiliza ampliamente como modelo en la prueba de nuevos antipsicóticos, aunque recientemente se ha empezado a prestar atención a otros sistemas entre los cuales el colinérgico presenta para nosotros un especial interés. A continuación pasamos a describir brevemente algunos de los resultados más destacados en los principales sistemas estudiados.

Acetilcolina: Las lesiones del núcleo pedúnculo pontino tegmental (PPTg), estructura que pertenece al complejo colinérgico mesencefálico, y tiene un papel esencial en respuestas de alerta y mecanismos de entrada de estimulación sensorial, deterioran gravemente la adquisición de la tarea de doble vía en *shuttle box*, sugiriéndose que parte de los déficits ocasionados se deben a la interrupción colinérgica entre esta estructura y el tálamo (Satorra-Marín y cols., 2001). En este sentido, la lesión electrolítica (Sos-Hinojosa y cols., 2003; Vale-Martínez y cols., 2002) o con ácido iboténico (Vale-Martínez y cols., 2002) del núcleo basal magnocelular (NBM) previas al entrenamiento, provocan deterioros en la retención a largo plazo del condicionamiento de evitación activa de doble sentido, aunque no se observan efectos en la adquisición. Nakamura e Ishihara, (1990) también aportan un deterioro en el condicionamiento de evitación tras la lesión del NBM. Consistentemente y siguiendo la misma línea de investigación, Montero-Pastor y colaboradores (2004) encuentran que la activación del NBM mediante la estimulación eléctrica intracraneal (EIC) facilita la adquisición y también la

consolidación de la tarea de evitación activa de doble sentido. Apuntan que la mejora en la adquisición puede deberse a una potenciación en los niveles corticales de ACh, aunque no puede descartarse que la EIC también active sistemas como el GABA que potencien la facilitación del aprendizaje. Para explicar la mejoría en la consolidación sugieren un probable incremento en la actividad cortical y/o subcortical, en concreto de la amígdala, en los períodos críticos de la consolidación de la memoria.

Se ha observado que varios inhibidores de la AChE como la fisostigmina en un amplio rango de dosis (Sansone y cols., 1993) y la tacrina en la dosis de 2mg/kg (Pavone y cols., 1998) facilitan la adquisición de la tarea de *shuttle box*. La administración de glucosa con tacrina también incrementó el número de evitaciones, lo que no consiguió la glucosa por sí sola (Pavone y cols., 1998). En un estudio con un nuevo derivado de la tacrina, el THA-C8 (inhibidor reversible de la AChE), se han observado significativos incrementos en la adquisición de la tarea en *shuttle box*, diez veces mayores que los obtenidos con tacrina que no pueden ser explicados por una activación psicomotora general (Capone y cols., 1999). En este sentido, en otro estudio posterior del mismo equipo de investigación, administrando glucosa y estimulantes como la nicotina y la anfetamina, encontraron que la glucosa aisladamente tampoco logró mejorar el porcentaje de evitaciones realizado por los ratones. En cambio, la nicotina sí mejoró el aprendizaje de evitación de ratones CD-1 en la dosis 0.5 mg/kg pero no en la dosis de 0.25 mg/kg (Sansone y cols., 2000) y también la anfetamina por sí sola. En combinación con la glucosa, la dosis de 0.25 mg/kg tanto de anfetamina como de nicotina (inefectivas por sí solas), mejoraron la adquisición en combinación con la glucosa. Dicha facilitación no parece relacionada con una activación general sino que es más plausible que se encuentre relacionada con las interacciones entre la activación del sistema colinérgico y dopaminérgico producida por la glucosa y los estimulantes (Sansone y cols., 2000).

Dopamina: La implicación de la dopamina y los receptores dopaminérgicos (particularmente los D₂) en el condicionamiento de evitación se halla ampliamente documentada (Misane y Ogren, 2000). La neurotransmisión dopaminérgica regula los factores sensoriomotores y/o motivacionales implicados en la adquisición de la tarea de evitación (Ogren y cols., 1996) e incluso dicha tarea se ha utilizado como modelo animal para evaluar la potencia antipsicótica de los fármacos. En general, se acepta que todos los neurolépticos producen disminuciones en la conducta de evitación. La disminución de catecolaminas cerebrales produce un déficit en la respuesta de evitación condicionada y, en este efecto, la dopamina parece ser la más relevante, ya que una disminución o bloqueo de los sistemas dopaminérgicos producen un deterioro en la adquisición de la respuesta de evitación (Aguilar y cols., 2004) y los agonistas dopaminérgicos incrementan el número de evitaciones realizado por los animales (Sansone y cols., 2000). Su perfil se caracteriza por una notable reducción de las evitaciones, sin afectar (excepto a dosis muy altas) la conducta de escape. A título de ejemplo algunos estudios como el de Ogren y Archer (1994) en el cual que el haloperidol impidió la adquisición y la retención de la tarea de evitación, como también sucedió en el estudio de Arenas y colaboradores (1993). El raclopride y el sulpiride también disminuyen la evitación (Redolat y cols., 1994).

GABA: Como hemos comentado, en los primeros ensayos de adquisición de la tarea de evitación, la ansiedad juega un papel fundamental, y así se indica por el hecho que los fármacos ansiolíticos pueden mejorar o los ansiogénicos empeorar la ejecución inicial de los animales (Ferré y cols., 1994). Fernández-Teruel y colaboradores (1991b) señalan que fármacos como el pentobarbital, el alprazolam, diazepam y adinazolam facilitan, a determinadas dosis, la tarea de evitación activa en dos sentidos. En cambio, fármacos ansiogénicos como el Ro 15-4513 y el FG 7142 deterioran significativamente la adquisición de la tarea. Sin embargo, en un estudio respecto a los efectos moduladores de los receptores GABA en la conducta de evitación, Getova y Bowery (1998) encuentran que tras el tratamiento con tres antagonistas del receptor GABA_B la conducta de evitación se vio

favorecida. En uno de los últimos artículos publicados acerca de esta relación, se señala que normalmente las benzodiazepinas presentan propiedades ansiolíticas pero también amnésicas; mientras que los antagonistas GABA ejercen un efecto ansiogénico y aumentan el aprendizaje (Savic y cols., *in press*). Estos autores señalan que el midazolam (agonista GABA no selectivo) produjo efectos ansiolíticos en la adquisición del paradigma de evitación activa, sin embargo el zolpidem (agonista selectivo α_1) no lo consiguió. También hay que tener en cuenta las diferencias entre adquisición y retención del aprendizaje de evitación, ya que se ha observado que el diazepam aumenta la adquisición pero atenúa la retención después de 24 horas (Pereira y cols., 1989). Por último, señalar que los estudios respecto al neurotransmisor GABA, la ansiedad y la conducta de evitación no son concluyentes, puesto que se han encontrado resultados contradictorios, siendo una tarea sensible tanto a los efectos ansiolíticos (Boix y cols., 1988; Fernández-Teruel y cols., 1991 ab; Escorihuela y cols., 1993) como a los efectos ansiogénicos (Fernández-Teruel y cols., 1991a).

Serotonina: Driscoll y colaboradores (1983) encontraron una reducción en el metabolismo de la 5-HT post-entrenamiento en las ratas RHA (*buenas evitadoras*) en el hipocampo, hipotálamo y en la corteza cerebral. Sugieren que la serotonina probablemente juega un papel modulador en la conducta de evitación y que este rol sería activo o pasivo en función del estado emocional del sujeto. Se ha encontrado que la administración pre-entrenamiento de agonistas serotoninérgicos como la p-cloroanfetamina, produce un marcado deterioro tanto en la adquisición como en la retención de tareas de evitación tanto de una vía (*one-way*) como de doble sentido (*two-way*) (Ogren, 1982). En un experimento posterior, el mismo equipo de investigación sugiere que dicho deterioro puede estar mediado por la estimulación de los receptores 5-HT y señalan que en el caso de la evitación activa, estarían implicados los 5-HT_{2A} y en la evitación pasiva los 5-HT_{1A} (Misane y Ogren, 2000). Además, la liberación de 5-HT ha mostrado tener una regulación tónica en la transmisión dopaminérgica en el estriado e incrementar la síntesis de DA vía receptores 5-HT_{2A}, lo que tendría una implicación en la

regulación locomotora, de amplia importancia en la ejecución de la tarea en *shuttle box*.

Otros sistemas de neurotransmisión: En un estudio para observar los efectos de diferentes dosis del MK-801, antagonista NMDA, en el condicionamiento de evitación activa en ratones, Redolat y colaboradores (1998) observaron un deterioro en el aprendizaje con la dosis 0,3 mg/kg (la más alta usada en el estudio) aunque también provocó estereotipias e hiperactividad. Con una dosis más baja (0,1 mg/kg) se evitaron efectos tóxicos, pero la latencia de respuesta también aumentó, aunque no se observaron deterioros significativos en la respuesta de evitación ni en otros parámetros conductuales. Recientemente, Savonenko y colaboradores (2003) en un estudio con otro antagonista NMDA, el APV (ácido 2-amino-5-fosfonopentanoico) en la amígdala basolateral también observan un deterioro en el aprendizaje de evitación de doble sentido.

Por otro lado, la activación de los receptores μ incrementa el aprendizaje de la evitación condicionada y la naloxona disminuye el número de evitaciones. Aunque con la morfina, los resultados en el aprendizaje de evitación son contradictorios tras su administración y se ha considerado que puede dar falsos positivos en este modelo (Aguilar y cols., 2004). Los autores que han encontrado que la morfina provoca incrementos en las evitaciones sugieren la implicación del sistema dopaminérgico (Aguilar y cols., 1998) y la influencia del aumento en la actividad locomotora inducido por esta sustancia.

También se ha observado que los efectos de la noradrenalina en la tarea de evitación parecen ser facilitadores, aunque dependen de la dosis (Costa-Miserachs y cols., 1993). En cuanto a la epinefrina, en la retención de la tarea, no mejoró a las 24 horas pero sí lo hizo pasados 20 días de la última sesión de entrenamiento, lo que parece sugerir que dicha catecolamina necesitaría un período más largo para ser efectiva y que la consolidación del aprendizaje de evitación es compleja y requiere de un periodo para su elaboración (Costa-Miserachs y cols., 1994).

En suma podemos concluir este apartado remarcando que el condicionamiento de evitación activa es una tarea no declarativa compleja, que comprende aspectos del condicionamiento clásico y del condicionamiento instrumental, y en la que los aspectos emocionales parecen jugar un papel de gran relevancia.

4.- AISLAMIENTO SOCIAL, APRENDIZAJE Y EMOCIONALIDAD

Tal como ha quedado expuesto a lo largo del presente trabajo, es ampliamente conocido que el aislamiento social puede inducir cambios tanto a nivel neuroquímico como conductual (Hall, 1998; Heidbreder y cols., 2000), tener efectos duraderos en la respuesta de estrés, e incluso producir alteraciones en la función inmune (Avitsur y cols., 2003). A nivel de comportamiento, se ha observado que el aislamiento provoca un incremento en la actividad locomotora en respuesta a ambientes novedosos (Sahakian y cols., 1977; Jones y cols., 1990). Hay que señalar, sin embargo, que estos efectos conductuales del aislamiento dependen principalmente de la cepa estudiada (Gendreau y cols., 1998, 2000) y de la duración del periodo de aislamiento (Palanza, 2001).

Las condiciones de alojamiento también pueden inducir cambios en el nivel de emocionalidad de los animales. La *emocionalidad* es un concepto multidimensional y actualmente se utiliza una amplia diversidad de medidas fisiológicas y conductuales para indicar los estados emocionales en animales, aunque todas ellas presentan limitaciones (Paul y cols., 2005). Se ha descrito que el aislamiento provoca un incremento del nivel de ansiedad en los roedores (Morinan y Parker, 1985; Wright y cols., 1991; Haller y Halász, 1999), aunque existen resultados contradictorios (Fone y cols., 1996). Además, en múltiples investigaciones se ha comprobado que el aislamiento social en ratones incrementa la conducta agresiva (Brain y cols., 1989; Redolat y cols., 1991, 2005) y, de hecho, el aislamiento es uno de los modelos más utilizados para provocar la conducta de lucha en roedores (Sandnabba, 1996; Mikcek y cols., 2001).

A pesar de estas evidencias sobre la influencia que el aislamiento social puede tener sobre variables de tipo emocional muy pocos estudios han

abordado la cuestión de cómo las diferencias individuales en el nivel de ansiedad o agresividad mostrado por los animales tras un periodo de alojamiento individual podrían modificar la conducta del animal. Por ello, expondremos brevemente a continuación los estudios sobre el perfil conductual en animales que difieren en estas variables emocionales y como tales diferencias se relacionarían con su capacidad de aprendizaje.

Perfil conductual en animales que difieren en su nivel de agresividad

Diversas investigaciones en roedores han llevado a proponer que los animales seleccionados por sus diferencias en agresión también diferirán en rasgos conductuales, neuroquímicos y fisiológicos (Benus y cols., 1991a; Veenema y cols., 2003). En los roedores agresivos se observa un estilo de confrontación *proactivo* (consistente en la defensa de su territorio), caracterizado fisiológicamente por incrementos en la concentración sérica de testosterona y noradrenalina, elevada reactividad del sistema simpático, junto con elevación de catecolaminas y de la presión sanguínea. Por el contrario, frente a la invasión de su territorio, los machos sumisos tienen un comportamiento más tolerante; se quedan inmóviles y no evitan activamente la estimulación aversiva, reaccionando con un incremento de la actividad del eje HPA y menor incremento en el nivel de testosterona que los dominantes (Valencia-Alfonso y cols., 2004). Por tanto, las diferencias individuales en agresividad y estilos de afrontamiento se han asociado con una reactividad diferencial de los sistemas autónomo/neuroendocrino debido a que los animales más agresivos muestran una mayor reactividad simpática ante las situaciones difíciles que los no agresivos (de Boer y cols., 2003). En ratones macho seleccionados en base a latencias de ataque cortas (*short attack latency* o SAL) o largas (*long attack latency* o LAL) se han descrito diferencias neuroendocrinas y de respuesta al estrés. Los ratones LAL tienen problemas de afrontamiento ante la presencia continua de un co-específico agresivo, y muestran una respuesta incrementada en los marcadores fisiológicos y

moleculares de estrés (Veenema y cols., 2003). A nivel neuroquímico, los receptores postsinápticos 5-HT_{1A} poseen mayor sensibilidad en ratones agresivos, lo que podría ser un mecanismo compensatorio del organismo, ya que generalmente los individuos agresivos tienen una neurotransmisión serotoninérgica baja (Van der Vegt y cols., 2001), aunque existen resultados contradictorios (Van der Vegt y cols., 2003). También se ha puesto de manifiesto que los ratones macho SAL poseen un menor tamaño de las terminaciones de las fibras musgosas del hipocampo en comparación con los LAL, sugiriendo que ello podría estar relacionado con diferencias en su capacidad de aprendizaje espacial (Sluyter y cols., 1994). Señalar que los resultados de las investigaciones llevadas a cabo por Prior y colaboradores (2004) no sustentan la hipótesis de que a mayor nivel de agresividad, menor tamaño de las fibras musgosas hipocampales. También se ha aportado información sobre diferencias de expresión génica entre estas dos cepas de ratones (SAL y LAL), en las que podrían basarse sus características diferenciales de comportamiento y neuroendocrinas (Feldker y cols., 2003), aunque las implicaciones de tales diferencias deben ser interpretadas con cautela.

En cuanto a la ejecución en tareas de aprendizaje, se ha informado de un mejor aprendizaje de tareas de laberintos en los animales más agresivos, tanto en machos (Lagerspetz, 1964) como en hembras (Kvist, 1992) mientras los ratones no agresivos muestran una mejor ejecución en una tarea de evitación pasiva (Kvist, 1989). En la tarea de evitación activa, los ratones con bajas latencias de ataque presentaron mejor repuesta que los ratones con alta latencia (Benus y cols., 1989, 1991b). En general, se ha descrito la utilización de estrategias más activas en los ratones más agresivos (ratones SAL), y de estrategias más pasivas en los animales LAL (Benus y cols., 1991a). Actualmente se sugiere que las diferencias en la latencia de ataque de los animales formarían parte de un patrón de funcionamiento general con estrategias de afrontamiento diferenciadas según el nivel basal de agresividad (Redolat y cols., 2005).

Perfil conductual en animales que difieren en su nivel de ansiedad

El aislamiento social también provoca cambios en conductas relacionadas con la ansiedad (Rodgers y Cole, 1993; Guo y cols., 2004). En general, se ha propuesto que el aislamiento incrementa el nivel de ansiedad en roedores (Morinan y Parker, 1985; Wright y cols., 1991; Haller y Halász, 1999), aunque existen resultados contradictorios (Fone y cols., 1996; Manzanique y cols., 2002). Se ha sugerido además que pueden existir diferencias entre ratas con alto o bajo nivel de ansiedad en el afrontamiento de situaciones novedosas o estresantes: aquellos con menor nivel de ansiedad muestran mayor capacidad de adaptación y enfrentamiento a esos estresores (Henniger y cols., 2000). También se ha informado que ratas consideradas no ansiosas, clasificadas de acuerdo al porcentaje del tiempo en los brazos cerrados del laberinto elevado, mostraron una peor retención que sus controles en el aprendizaje tanto de una tarea de evitación inhibitoria como de evitación activa (Ribeiro y cols., 1999). En este sentido, moderados incrementos en ansiedad se han asociado con un efecto facilitador del aprendizaje, ya que desde los trabajos de Yerkes y Dodson se conoce que la ansiedad puede ser adaptativa promoviendo la vigilancia y el aprendizaje (Morgan y Pfaff, 2002).

Se han descrito también diferencias a nivel neuroquímico dependiendo del nivel de ansiedad. Por ejemplo, existen diferencias en los niveles de 5-HT en el núcleo estriado en las ratas ansiosas y poco ansiosas (Schwartz y cols., 1998) así como en el núcleo accumbens (Ho y cols., 2004). En el laberinto elevado en forma de cruz los efectos del MDMA también difirieron según el nivel de ansiedad de los sujetos. Estas diferencias parecen ser paralelas a otros cambios fisiológicos, como cambios en la temperatura corporal (que fue mayor en ratas con baja ansiedad que en ratas con alta ansiedad) y la reactividad a otras pruebas como la evitación activa (Ho y cols., 2004).

A nivel etológico está bien establecido que la agresividad y la ansiedad están relacionadas, por lo que se ha señalado el interés de abordar la posible

interacción entre estas conductas (Beuzen y Belzung, 1995), aunque el modo de interacción entre ambos factores dependerá de la situación concreta que se estudie y de su valor adaptativo (Ferrari y cols., 1998; López-Mendoza y cols., 1998). Diferentes investigaciones indican que los ratones macho de diferentes cepas que muestran mayor nivel de conducta agresiva son también los más ansiosos (Guillot y Chapouthier, 1996). Blanchard y colaboradores (2001) señalan que, en ratones, la relación entre ansiedad y agresión es aún más compleja, puesto que se observa que los ratones aislados o dominantes agrupados muestran una ansiedad elevada en el laberinto elevado, aunque animales con experiencia de derrota también comparten el mismo perfil (Ferrari y cols., 1998).

Capacidad de aprendizaje y emocionalidad

Actualmente se considera que las relaciones entre emoción y cognición desempeñan un papel muy relevante también en la investigación con animales (Savic y cols., *in press*). Numerosos hallazgos, tanto en estudios realizados con roedores como en sujetos humanos, proporcionan evidencia de que la ansiedad y la memoria son dos entidades íntimamente relacionadas (Beuzen y Belzung, 1995; McGaugh, 2004). Se ha sugerido, además, que la formación de la memoria y los procesos de ansiedad podrían interaccionar uno con otro utilizando sistemas neurales comunes o interaccionando de forma adaptativa (Ribeiro y cols., 1999).

En este contexto, es importante destacar que, tanto en el aprendizaje espacial (evaluado en laberinto de agua) como en el aprendizaje del condicionamiento de evitación activa, los animales se encuentran en una situación altamente emocional: en el laberinto de agua deben aprender a escapar del agua subiéndose a una plataforma; en la tarea de evitación activa aprenden a evitar el lugar donde ha ocurrido una experiencia aversiva. También se ha indicado que todos los paradigmas conductuales que implican *shocks*

eléctricos, como el condicionamiento de evitación activa, tienen un fuerte componente emocional, haciendo difícil diferenciar entre efectos directos e indirectos de la ansiedad sobre la memoria (Beuzen y Belzung, 1995). Investigaciones previas han indicado que las ratas Wistar seleccionadas como *no ansiosas*, en base a la conducta mostrada en el laberinto elevado, muestran una retención peor que las ratas normales en una tarea de evitación activa (Ribeiro y cols., 1999). Un estudio reciente también indica que ratas tratadas con una dosis ansiolítica de midazolam presentaban una peor ejecución en la adquisición de una tarea de evitación activa (Savic y cols., *in press*). Por esta razón, aunque la relación entre memoria y emocionalidad sea compleja (Rolls, 2000), es necesaria tenerla en cuenta cuando se valora el efecto de fármacos en este tipo de tareas (Beuzen y Belzung, 1995).

Diversos estudios han demostrado la importancia del nivel de ansiedad y estrés de los animales en la ejecución de tareas de aprendizaje espacial (Prior y cols., 1997; Hölscher, 1999; Micheau y Van Marrewijk, 1999). Las variables ambientales pueden predisponer e incrementar la responsividad de un animal ante cualquier situación novedosa o estresante para el animal (Wiedenmayer, 2004). Las diferencias en aprendizaje espacial mostradas por sujetos con distinto patrón emocional o de afrontamiento pueden explicarse, en parte, debido a que la ejecución en la tarea del laberinto de agua, que tiene efectos potencialmente estresantes, puede verse influida por diversos factores ambientales y biológicos (Perrot-Sinal y cols., 1996). Investigaciones publicadas muy recientemente indican que una situación de estrés agudo en ratas (como la exposición a un predador) puede deteriorar la memoria espacial en el laberinto de agua (Sandi y cols., 2005). También se han puesto de manifiesto la importancia de evaluar las diferencias individuales en la respuesta a esta tarea al encontrarse que el estrés psicosocial produce un déficit en la tarea espacial en ratas con alta reactividad motora a un nuevo ambiente pero no en aquellas que mostraban baja reactividad (Touyarot y cols., 2004).

En cuanto al aprendizaje en el condicionamiento de evitación, se ha demostrado que las cepas de ratones que muestran estrategias de afrontamiento más activas también presentan una mejor ejecución en esta tarea (Stiedl y cols., 1999). Estudios anteriores habían señalado que los ratones agresivos, en comparación con ratones no agresivos, aprenden más eficientemente una tarea de evitación activa en dos sentidos (Benus y cols., 1990). También se ha observado que cuanto más ansioso es un animal ejecuta mejor tareas de memoria emocional (Beuzen y Belzung, 1995; Ribeiro y cols., 1999). Sin embargo, Ho y cols., (2004) encuentran que las ratas tratadas con vehículo y que habían mostrado un alto nivel de ansiedad en el *plus maze* (HA) adquirirían la tarea de aprendizaje de evitación de una manera menos eficiente que las ratas con bajo nivel de ansiedad (LA). Este resultado sugiere que el paradigma de escape-evitación es especialmente sensible para detectar diferencias entre ratas con diferentes niveles de ansiedad (Ho y cols., 2002, 2004). La explicación que aportan es que estas diferencias podrían ser debidas a que las ratas HA son más emocionales en respuesta al *shock* que las ratas LA y eso dañaría la adquisición de la tarea de evitación en la *shuttle box*.

Nicotina, aprendizaje y emocionalidad

Tal como se ha expuesto en el Capítulo II de la presente Tesis, la nicotina tiene un amplio rango de efectos conductuales y es importante tener en cuenta que tanto las características emocionales de los animales como el nivel previo de ansiedad y de agresividad pueden interaccionar con los efectos de esta sustancia en diversos modelos animales (Lamberty y Gower, 1991b; Ouagazzal y cols., 1999). Hay que destacar el hecho de que las acciones de la nicotina sobre la conducta emocional son principalmente de tipo modulador (Ouagazzal y cols., 1999), por lo que sus efectos pueden depender de la línea base de la conducta evaluada. Este posible papel modulador de la nicotina es consistente con la localización presináptica de receptores nicotínicos y con que esta sustancia estimule la liberación de dopamina, glutamato y GABA en diversas

áreas cerebrales, incluyendo el hipocampo, estructura clave en los procesos de memoria (Gould y Wehner, 1999; Laviolette y Van der Kooy, 2004). Además, recientemente, Bannerman y cols., (2004) han señalado que la región dorsal del hipocampo juega un relevante papel en la ansiedad. Los efectos de la nicotina sobre la ansiedad podrían estar mediados por diferentes sustratos neuroanatómicos como el núcleo dorsal del rafe, el septum lateral o el hipocampo dorsal (File y cols., 2000).

Por otra parte, los modelos animales no han ofrecido hasta el momento una explicación consistente acerca de los efectos de la nicotina sobre el aprendizaje y la memoria. Se ha sugerido que la nicotina mejora algunas tareas de aprendizaje y memoria, aunque no están dilucidados completamente los mecanismos que subyacen a este efecto facilitador. Resultados de investigaciones recientes han sugerido que esta mejora podría estar causada por un incremento en la función colinérgica (Uzum y cols, 2004). Sin embargo, tal como ha sido expuesto anteriormente, también hay estudios que muestran que la nicotina no afecta e incluso puede deteriorar la adquisición y recuerdo de algunas tareas cognitivas (Bernal y cols., 1999; Vaglenova y cols., 2004). Hay que destacar el hecho de que en estas investigaciones con animales generalmente no se han considerado los posibles efectos de la nicotina sobre factores de tipo emocional que podrían influir en los cambios observados en la ejecución de tareas de aprendizaje y memoria.

Actualmente se desconoce hasta qué punto factores como el aislamiento social pueden ser una variable importante cuando se valoran los efectos de la nicotina sobre la conducta. Por ello, determinar si existen diferencias en los efectos de la nicotina sobre el aprendizaje según el tipo de alojamiento de los animales puede ser relevante en la comprensión de las propiedades farmacológicas y conductuales de esta sustancia. Esta línea de investigación ha sido escasamente desarrollada y por ello consideramos que el análisis sistemático que se propone en la presente Tesis Doctoral puede arrojar luz

acerca del papel modulador de la nicotina en la relación entre aprendizaje y emocionalidad.

***III.- OBJETIVOS E
HIPÓTESIS
EXPERIMENTALES***

1.- OBJETIVOS

El objetivo general de la presente Tesis Doctoral es delimitar los efectos del aislamiento social y de la administración de nicotina sobre el aprendizaje en ratones, así como el papel modulador de la emocionalidad en dichas acciones. El interés de este objetivo se basa en el hecho de que las características del ambiente social a una edad temprana pueden provocar cambios a nivel neurobiológico y conductual, que podrían verse reflejados en la ejecución de los animales en diversas tareas de aprendizaje.

Los objetivos concretos que nos planteamos en esta investigación son los siguientes:

- 1) Evaluar los efectos del aislamiento social sobre la actividad motora espontánea y el nivel de ansiedad en ratones.
- 2) Estudiar la interacción entre variables emocionales y capacidad de aprendizaje. Esta evaluación se realizará tomando en consideración los efectos del aislamiento social sobre dos variables emocionales: agresividad y ansiedad. Diversas investigaciones sugieren que ambas variables podrían interactuar con los procesos de aprendizaje y memoria. El interés de este objetivo se fundamenta en la escasez de investigaciones que han abordado la interacción entre componentes de la conducta emocional y tareas cognitivas.
- 3) Con el fin de poder cumplir el objetivo anterior nos proponemos realizar una evaluación conductual que permita clasificar a los animales según su nivel basal de ansiedad y agresividad utilizando criterios objetivos. Respecto al nivel de ansiedad, el presente estudio intenta establecer un sistema de clasificación de los animales considerando el porcentaje de tiempo pasado en los brazos abiertos del laberinto elevado en forma de

cruz, un modelo muy utilizado para valorar la ansiedad en roedores. En cuanto al grado de agresividad, la clasificación se basará en la latencia de ataque mostrada hacia un co-específico en una prueba de confrontación agonística en un test de interacción social.

- 4) Establecer posibles diferencias en la capacidad de aprendizaje, en el laberinto de agua y en el condicionamiento de evitación activa, relacionadas con el nivel de agresividad de los animales, comparando la ejecución en estas tareas entre grupos de ratones agresivos (con una latencia corta de ataque a un co-específico en un test de interacción social), y ratones no agresivos (con latencia larga de ataque).
- 5) Determinar posibles diferencias en la capacidad de aprendizaje (espacial y de condicionamiento de evitación activa) relacionadas con el nivel de ansiedad de los animales. Para ello se comparará la ejecución en estas tareas de ratones que difieren en su nivel de ansiedad (alto, bajo o moderado) clasificados de acuerdo con la conducta mostrada en el laberinto elevado en forma de cruz.
- 6) Examinar el papel modulador que la nicotina pudiera ejercer en la interacción entre los factores emocionales estudiados (nivel de ansiedad y agresividad) y la capacidad de aprendizaje mostrada por los animales en las tareas cognitivas evaluadas (laberinto de agua y condicionamiento de evitación activa).

2.- HIPÓTESIS

1) Efectos del aislamiento social sobre la actividad motora espontánea en ratones

Estudios previos en roedores han mostrado que las condiciones de alojamiento pueden alterar la actividad motora espontánea e incrementar el nivel de emocionalidad de los animales (Brain y cols., 1989; Rilke y cols., 1998b; Haller y cols., 2002). Investigaciones realizadas en nuestro laboratorio con ratones demuestran que los animales aislados presentan un mayor índice de actividad motora y un incremento en el nivel de agresión en comparación con los animales agrupados (Moragrega y cols., 2002; Redolat y cols., 2002, 2005). Una cuestión que todavía no ofrece datos concluyentes es si el nivel de agresión de los animales puede incidir en su actividad motora espontánea. Cuando se han valorado cepas de ratones criados selectivamente por su nivel de agresividad se ha hallado que los ratones más agresivos son más activos que los no agresivos (Kvist y cols., 1997; Sandnabba, 1996). Sin embargo, otros trabajos con ratones no criados selectivamente no han podido demostrar concluyentemente que el nivel de agresión modifique la actividad motora (Moragrega y cols., 2002).

Por otra parte, las condiciones de alojamiento podrían modular el nivel de ansiedad, mostrando los animales ansiosos un índice de actividad motora mayor que los animales no ansiosos. Es posible que la hiperactividad descrita en los animales aislados tuviera correspondencia con su nivel de ansiedad. Existen datos que sugieren una posible relación entre nivel de ansiedad y actividad motora, aunque no existe unanimidad en los resultados. Ratas muy activas presentan puntuaciones bajas en pruebas de ansiedad (Courvoisier y cols., 1996). Recientemente, Ducottet y Belzung (2005) han señalado la posible relación entre la conducta mostrada en el laberinto elevado en forma de cruz y el tiempo de inmovilidad en el test de natación forzada en ratones agrupados, encontrando que

los animales más ansiosos están más tiempo inmóviles en este test de depresión. No obstante, en roedores los resultados podrían estar en función de las características de la especie y de la cepa, así como del procedimiento utilizado para evaluar la actividad motora (Liebsch y cols., 1998; Henniger y cols., 2000).

En el presente trabajo **hipotetizamos** que las condiciones de alojamiento podrían modular tanto la actividad locomotora como el nivel de agresividad y de ansiedad mostrado por los ratones NMRI. Consideramos que el aislamiento social modificaría la actividad motora espontánea de animales, en el sentido de que los ratones aislados serán más activos que sus homólogos agrupados. También esperamos que los ratones más ansiosos tengan un menor índice de actividad que aquellos animales cuyo perfil conductual es menos ansioso. Además, hipotetizamos que el nivel de agresividad mostrado por los animales podría influir en su actividad motora. Sin embargo, debido a que nuestro estudio se va a realizar con ratones NMRI, y no con una cepa de ratones selectivamente criados para ser agresivos, estas diferencias en el nivel de actividad en función de las variables emocionales no serían extremas.

2) Efectos del aislamiento social sobre la ansiedad

Diversos trabajos sobre la influencia de las condiciones de alojamiento indican que el aislamiento social puede modificar el nivel de ansiedad de los roedores (Rodgers y Cole, 1993; Guo y cols., 2004), aunque su influencia parece depender de diversos factores como el paradigma conductual utilizado para evaluar la ansiedad o la administración de fármacos (Haller y cols., 2000; Manzaneque y cols., 2002). Por ejemplo, el aislamiento durante 7 días incrementó la ansiedad en el test de interacción social, pero no alteró la conducta mostrada por los animales en el laberinto elevado en forma de cruz (Haller y cols., 2000). En otra investigación que evaluó a ratones aislados durante una semana y sus homólogos agrupados no se encontraron diferencias entre ambos grupos en el laberinto elevado, aunque dicho periodo de aislamiento alteró significativamente

la conducta mostrada en este modelo en aquellos animales tratados con clozapina (Manzaneque y cols., 2002).

Por otra parte, existe evidencia de que el nivel de agresión en roedores puede tener relación con la ansiedad que presentan los animales (Maestriperi y cols., 1991; Ferrari y cols., 1998; Kudrayavtseva y cols., 2002), aunque el sentido de esta relación dependería de la especie estudiada. Así, se ha comprobado que ratas poco ansiosas son más agresivas que aquellas con un nivel de ansiedad mayor (Henniger y cols., 2000). Sin embargo, en ratones se observa que aquellos animales más agresivos son los que presentan un perfil más ansiógeno (Ferrari y cols., 1998). Además, una experiencia repetida de agresión en ratones macho induce un repertorio conductual ansiógeno (Kudryavtseva y cols., 2002, 2004). Hay que tener en cuenta que tanto la especie como las características de la cepa de animales constituyen variables importantes cuando se evalúa la ejecución de los animales en el laberinto elevado (Rodgers y Cole, 1993; Trullas y Skolnick, 1993; Ferrari y cols., 1998). En concreto, en los ratones de la cepa NMRI se ha observado que tienen un índice bajo de evitación a los brazos abiertos del aparato (Griebel y cols., 2000; Carrasco y cols., 2004).

Considerando lo anteriormente señalado, nuestra **hipótesis** es que el aislamiento no induciría un claro efecto ansiógeno o ansiolítico, dadas las características de la cepa (NMRI) y el modelo de ansiedad (laberinto elevado en forma cruz) a estudiar. No obstante, el nivel de agresión de los animales puede modular el repertorio conductual en el laberinto elevado, presentando los ratones más agresivos un perfil más ansiógeno que los animales menos agresivos.

3) *Efectos del aislamiento social y del nivel de agresividad en el aprendizaje del laberinto de agua y el condicionamiento de evitación activa*

Se ha demostrado que el aislamiento social puede alterar la capacidad de aprendizaje de distintas tareas, aunque no existe consenso en los resultados encontrados ya que se han hallado tanto efectos positivos como negativos, e incluso ausencia de cambios. Por ejemplo, en ratas el aislamiento social puede facilitar tanto el aprendizaje espacial (Wongwitdecha y Marsden, 1996a) como no espacial (Harmer y Phillips, 1998ab), aunque en la tarea del laberinto radial se ha detectado un deterioro en la memoria de trabajo en ratas criadas en condiciones de privación social temprana (Einson, 1980; Juraska y cols., 1984). En ratones, Coudereau y colaboradores (1997b) no observaron mejor ejecución en el laberinto de agua en los animales que habían sido alojados en condiciones de aislamiento social. En el modelo de condicionamiento de evitación activa, Essman (1971) encontró que el aislamiento no modificaba las respuestas de escape, pero indujo un deterioro en las respuestas de evitación condicionada. Estos resultados sugieren que los efectos del aislamiento no sólo pueden depender de las características de la especie sino también de los requerimientos concretos la tarea experimental.

Es conocido que las diferencias individuales en la respuesta agresiva de los animales también se relaciona con diferentes estrategias de afrontamiento a un nuevo ambiente (Benus, 1991b; Sandnabba, 1995). En roedores se considera que el tiempo que tarda un animal en atacar a su oponente durante un encuentro agonístico como un índice que reflejaría la capacidad de adaptación a cambios en el ambiente (deBoer y cols., 2003). En ratones también se han descrito diferencias endocrinas y de respuesta al estrés en función del nivel de agresividad que podrían influir en su capacidad de aprendizaje (de Boer y cols., 2003; Veenema y cols., 2003). En general, los ratones agresivos aprenden mejor las tareas de laberintos (Selander y Kvist, 1991; Kvist, 1992; Barnard y Luo, 2002) y de condicionamiento de evitación activa (Benus y cols., 1991b) que los no agresivos. En este condicionamiento, los ratones con bajo nivel de agresividad muestran en

general la típica conducta de *freezing* o inmovilización, mientras que los animales más agresivos tienen una respuesta conductual más activa, saltando de un lado a otro de la *shuttle box* (Benus y cols., 1989). Sin embargo, estas diferencias en el aprendizaje según nivel de agresión parecen depender de las características de la tarea, ya que en pruebas espaciales como el laberinto de agua o el laberinto radial no se han hallado diferencias entre ratones agresivos y no agresivos (de Boer y cols., 2003).

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, nuestra **hipótesis** es que las condiciones de alojamiento pueden influir en el aprendizaje, y que éste puede estar modulado por el nivel de agresión de los animales. Dado que el aislamiento social induce un incremento de la conducta agresiva, consideramos que diferencias en la capacidad de aprendizaje se evidenciarán al tener en cuenta el nivel basal de agresividad de los animales. En este sentido es esperable que en el condicionamiento de evitación activa los animales más agresivos tendrán una mejor ejecución, mientras que estas diferencias no serán tan evidentes en el modelo del laberinto de agua.

4) Efectos del aislamiento social y del nivel de ansiedad en el aprendizaje del laberinto de agua y el condicionamiento de evitación activa

Los estudios que han valorado los efectos de las condiciones de alojamiento sobre la ansiedad señalan que el aislamiento social puede provocar cambios en el nivel de ansiedad en roedores (Rodgers y Cole, 1993; Haller y Halász, 1999; Guo y cols., 2004), aunque los resultados no son unánimes (Fone y cols., 1996). También se ha evidenciado que el nivel de ansiedad puede influir en el afrontamiento a estímulos nuevos o estresantes, ya que las ratas con menor nivel de ansiedad son más adaptativas y se enfrentan mejor a las situaciones novedosas o estresantes (Henniger y cols., 2000). Además, en roedores se ha observado que este distinto nivel de emocionalidad puede influir en la ejecución de tareas de aprendizaje, sugiriendo que las diferencias individuales en ansiedad podrían

modular la capacidad de aprendizaje (Beuzen y Belzung, 1995; Ribeiro y cols., 1998; Krazem y cols., 2001; Bert y cols., 2002).

La relación entre ansiedad y memoria ha sido puesta de manifiesto en diferentes modelos animales que evalúan tanto la memoria espacial (Prior y cols., 1997; Hölscher, 1999) como la no espacial (Escorihuela y cols., 1999; Ribeiro y cols., 1999), aunque el sentido de esta relación no está determinada. Por ejemplo, en la tarea de condicionamiento de evitación activa, Ribeiro y colaboradores (1999) encontraron que las ratas no ansiosas tuvieron peor ejecución, mientras que Ho y colaboradores (2002) encontraron que las ratas más ansiosas fueron las que peor realizaron la tarea. En el modelo del laberinto de agua, las ratas menos ansiosas fueron las que peor realizaron esta tarea espacial (Perrot-Sinal y cols., 1996). Por tanto, aunque potencialmente la ansiedad puede modular la capacidad de aprendizaje en roedores, los resultados encontrados sugieren que esta relación es compleja y podría depender del procedimiento con el que se ha evaluado la ansiedad de los animales, así como de los requerimientos de la propia tarea de aprendizaje.

Teniendo en cuenta lo anteriormente señalado, nuestra **hipótesis** es que las diferencias emocionales inducidas por el aislamiento social modularan la capacidad de aprendizaje, mostrando los animales con distinto nivel basal de agresión o/y ansiedad patrones diferenciales de ejecución tanto en la tarea del laberinto de agua como la tarea de escape-evitación.

5) Papel modulador de la nicotina en la interacción entre factores emocionales (agresión y ansiedad) y capacidad de aprendizaje en ratones aislados y agrupados

La línea base conductual constituye un factor crítico en la valoración de los efectos conductuales de los fármacos, habiéndose demostrado que aquellos animales que tienen diferentes formas de afrontamiento al ambiente presentan

también una sensibilidad diferencial a los tratamientos farmacológicos (Cheeta y cols., 2001; Manzanique y cols., 2002; Redolat y cols., 2005). El estado emocional puede modular la capacidad de aprendizaje en los animales, habiéndose observado que la nicotina puede inducir cambios en el nivel de emocionalidad y en la capacidad de aprendizaje en diferentes modelos animales (Vaglenova y cols. 2004). Se ha descrito que la nicotina altera el nivel de agresión (Johnson y cols., 2003) y de ansiedad (Ouagazzal y cols. 1999) de los animales, y puede tener un efecto facilitador del aprendizaje (Levin y Rezvani, 2000), aunque sus efectos dependen de la especie, cepa, edad, régimen de tratamiento, nivel basal de ejecución de la tarea, tipo de tarea experimental, entre otros factores. En ratones, se ha encontrado que la administración de nicotina no siempre induce mejoras en el aprendizaje del laberinto de agua (Lamberty y Gower, 1991b; Bernal y cols., 1999; Vicens y cols., 2003b). Los efectos de la nicotina en el condicionamiento de evitación activa en ratones han sido escasamente estudiados, observándose una mejora en la adquisición de este tipo de condicionamiento únicamente en los ratones aislados (Essman, 1971). Una cuestión que todavía no ha sido contestada es si el perfil emocional de los animales, como el nivel de ansiedad y agresividad, interacciona con los efectos de la nicotina en el aprendizaje de tareas que son sensibles a las manipulaciones ambientales como el laberinto de agua y el condicionamiento de escape-evitación.

Nuestra **hipótesis** es que los efectos moduladores de la nicotina diferirán entre ratones aislados y agrupados, pudiéndose esperar que esta influencia sea más evidente en los ratones aislados. El sentido de estas diferencias en la acción de la nicotina es difícil de determinar, ya que muy pocos estudios han evaluado los efectos de la nicotina en tareas de aprendizaje comparando ratones aislados y agrupados. Es plausible considerar que la nicotina pueda mejorar la capacidad de aprendizaje en los ratones aislados, aunque sus efectos estén modulados por la dosis de nicotina administrada y el nivel basal emocional de los animales.

***IV.- DESCRIPCIÓN DE
LOS ESTUDIOS
EXPERIMENTALES***

***ESTUDIO 1: EFECTOS DEL
AISLAMIENTO SOCIAL Y
DE LA NICOTINA SOBRE EL
APRENDIZAJE EN
RATONES NMRI QUE
DIFIEREN EN EL NIVEL DE
AGRESIÓN***

INTRODUCCIÓN A LOS EXPERIMENTOS I y II: “APRENDIZAJE ESPACIAL Y EVITACIÓN ACTIVA EN RATONES NMRI QUE DIFIEREN EN EL NIVEL DE AGRESIÓN: EFECTOS DE LAS CONDICIONES DE ALOJAMIENTO Y DE LA ADMINISTRACIÓN DE NICOTINA”.

Tal como ha quedado expuesto en el marco teórico que antecede a la presente investigación, las evidencias experimentales indican que las condiciones de alojamiento pueden tener complejas consecuencias neurobiológicas y conductuales en roedores (Hall, 1998; Heidbreder y cols., 2000). En ratones, es conocido que el aislamiento modifica la actividad locomotora y el nivel de agresividad. De hecho, el aislamiento social es el método usado con más frecuencia para inducir conducta agresiva en ratones (Miczek y cols., 2001). Diferencias individuales en agresión pueden reflejar estrategias alternativas de ajuste a demandas medioambientales, ya que ratones agresivos muestran un comportamiento más activo, y los machos no agresivos responden con mayor pasividad (Benus y cols., 1991b) pese a que permanecen flexibles a cualquier cambio en su entorno (Sandnabba, 1995). Por ello, y debido a que el aislamiento social incrementa el comportamiento agresivo, podría ser de interés evaluar como interactúan las condiciones de alojamiento de los animales (y sus posibles efectos sobre el nivel de agresión) en diferentes tareas de aprendizaje.

Estudios previos sugieren que ratones macho seleccionados en base a su nivel de agresividad muestran importantes diferencias en rasgos de comportamiento, neuroquímicos y fisiológicos (Veenema y cols., 2003). Las diferencias en la latencia de ataque se consideran parte de una distinción más general en la estrategia conductual de los roedores frente a los cambios ambientales (Benus y cols., 1989). La tendencia a iniciar un comportamiento agresivo podría ser predictora del comportamiento de un individuo en otras pruebas conductuales. En experimentos con laberintos, los ratones agresivos crean fácilmente rutinas como patrones de comportamiento, mientras los machos poco agresivos son más flexibles y adaptativos (Benus y cols., 1989, 1991b). De

hecho, los ratones más agresivos tienden a desarrollar estrategias impulsivas de comportamiento, una menor exploración y son más temerosos que los no agresivos (Prior y cols., 2004). Trabajos previos han encontrado que los ratones agresivos tuvieron una mejor ejecución en tareas de aprendizaje en el laberinto que los no agresivos (Kvist, 1989; Selander y Kvist, 1991; Barnard y Luo, 2002). Por ejemplo, en dos cepas seleccionadas por sus niveles de alta y baja agresividad se hallaron diferencias en la ejecución de tareas de aprendizaje activo y pasivo (Lagerspetz, 1964; Kvist, 1989; Sandnabba, 1996). Los ratones no agresivos *Turku* también fueron mejores en la adquisición de una tarea de evitación activa en la *shuttle box* (Kvist, 1989), sugiriendo que estos ratones no agresivos normalmente presentaban una inclinación a reaccionar con un comportamiento exitoso en las situaciones que incluían refuerzos negativos (Sandnabba, 1996). Por el contrario, en otros estudios que comparan ratones seleccionados según su latencia de ataque (ratones SAL, con corta latencia de ataque, y ratones LAL, con larga latencia de ataque) los ratones con mayor nivel de agresividad (SAL) fueron mejores evitadores en la caja de doble sentido (Benus y cols., 1991b). Sin embargo, en otras tareas que miden fundamentalmente aprendizaje espacial como el laberinto de agua o el laberinto radial el comportamiento de los ratones agresivos y no agresivos ha sido descrito como similar (de Boer y cols., 2003).

A pesar de estas investigaciones, no se han realizado hasta el momento estudios que hayan evaluado si existen diferencias entre ratones agresivos y no agresivos en la ejecución de tareas espaciales en ratones no seleccionados genéticamente. Tampoco se conoce claramente cómo el aislamiento social puede interaccionar con el nivel de agresividad en la ejecución de tareas de aprendizaje espacial o de evitación activa, aunque se ha demostrado previamente que el aislamiento social en ratas aumenta el aprendizaje en el laberinto de agua (Wongwitdecha y Marsden 1996a) mientras deteriora el aprendizaje del condicionamiento de evitación activa en ratones (Essman, 1971). En ninguna de estas investigaciones anteriores se valoró el nivel basal de agresividad, factor que fue evaluado en todos los animales experimentales utilizados en nuestros experimentos.

Se ha propuesto que la nicotina mejora las tareas de aprendizaje y memoria aunque no están totalmente aclarados qué aspectos de la cognición son susceptibles de mejora (Uzum y cols., 2004). Resultados recientes indican que esta mejoría en las funciones cognitivas podría estar relacionada con el incremento de la actividad colinérgica (Uzum y cols., 2004). La nicotina puede facilitar la memoria en tareas de evitación pasiva (Levin y Christopher 2003; Uzum y cols., 2004). En tareas de evitación activa se han obtenido resultados contradictorios. En general se observa que dosis bajas de nicotina (0,5 mg/kg. o menores) facilitan las tareas de aprendizaje mientras dosis más altas no tienen efecto e incluso empeoran la memoria (Sansone y cols., 1991).

El objetivo principal de los dos primeros experimentos de la presente Tesis fue evaluar la influencia de las condiciones de alojamiento y del nivel de agresividad en la adquisición y la retención de una tarea espacial como el laberinto de agua de Morris (Morris, 1984) así como de una tarea no espacial (evitación activa en dos sentidos). Ha sido propuesto que los ratones más agresivos son más activos y su comportamiento contiene más elementos de actividad motora (Sandnabba, 1995; 1996). Por ello, nos interesaba también determinar si variables que podían afectar la ejecución en estas tareas de aprendizaje, tales como la actividad locomotora o la ansiedad (la cual se podía modificar por las condiciones de alojamiento empleadas), podían modular la relación entre agresión y aprendizaje.

El hecho de que la acción de la nicotina dependa en gran medida de la especie y cepa utilizada hace necesario realizar estudios iniciales sobre los efectos conductuales de esta sustancia con los animales elegidos para la presente investigación (ratones de la cepa NMRI). Esta cepa ha sido seleccionada ya que investigaciones previas realizadas en nuestro laboratorio han sugerido la posible relación entre su capacidad de aprendizaje y sus características emocionales (Vicens y cols., 1999). Por otra parte, la cepa NMRI también ha sido utilizada en otros estudios que muestran su idoneidad para evaluar las acciones conductuales de diferentes fármacos (Van der Heyden y cols., 1987; Griebel y cols., 2000).

1.- EXPERIMENTO I: “APRENDIZAJE ESPACIAL EN RATONES NMRI QUE DIFIEREN EN EL NIVEL DE AGRESIÓN: EFECTOS DE LAS CONDICIONES DE ALOJAMIENTO Y DE LA ADMINISTRACIÓN DE NICOTINA”.

1.1.- MATERIAL Y MÉTODO

SUJETOS

En la realización de este experimento se utilizaron 210 ratones de la cepa NMRI, con un peso entre 20 y 24 gramos, y procedentes de IFFA CREDO (CRIFFA, Barcelona). A su llegada al laboratorio los ratones se acomodaron según dos condiciones de alojamiento diferenciales: la mitad de los animales se alojaron individualmente en jaulas de plástico transparente de 24 x 13,5 x 13 cm (condición de Aislados) y el resto se acomodaron de 5 en 5 en jaulas de plástico opacas cuyas dimensiones eran de 25 x 25 x 15 cm (condición de Agrupados).

Todos los animales permanecieron en un período de aislamiento durante 30 días antes del primer test, un encuentro agonístico con un ‘oponente estándar’ con la finalidad de clasificar a los animales según su nivel de agresión. El aislamiento social es uno de los métodos más utilizados para incrementar el nivel de agresividad en una amplia variedad de especies, entre ellas los ratones de laboratorio, en los que su uso se encuentra muy establecido.

Todos los animales se mantuvieron en condiciones estándar de laboratorio, con agua y comida *ad libitum* y con un ciclo de luz/oscuridad invertido (12:12hr) con las luces apagadas a las 20hr (hora local). La temperatura del animalario se mantuvo constante (20 ± 2 °C). En todas las fases del experimento se siguieron los principios sobre el cuidado de los animales de laboratorio de acuerdo a las guías nacionales e internacionales (ECC Council Directive 86/609, -JL 358, 12 de

Diciembre, 1987; Real Decreto 223/1988 del 14 de Marzo sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos).

APARATOS

1.- Jaula neutral: Los encuentros agresivos se realizaron en un área neutral. Para ello se utilizaron dos jaulas de metacrilato transparentes con un tamaño de 66 x 36 x 30 cm (ver Figura 1-1). Antes de iniciar cada prueba, tanto el animal experimental como su oponente permanecían 1 minuto en la arena, separados por una barrera abatible, con el fin de que se habituaran a dicho ambiente. Los encuentros fueron realizados con luz blanca. La latencia de ataque del animal fue medida por el experimentador con un cronómetro digital.



Figura 1-1: Caja de agresión (66 x 36 x 30 cm) utilizada para los encuentros agonísticos entre los ratones aislados, agrupados y los oponentes estándar .

2.- Actímetro: Para examinar la actividad motora de los animales se utilizó el modelo ACTISYSTEM II (Panlab. S.L. Barcelona) que consiste en 4 sensores de 35 x 35 cm (pb 46603) que registran la actividad de los animales a través de un sistema electromagnético. Los datos se registraron y almacenaron con el programa DAS 16 (versión 1.0), un ordenador PC y un interfase (pb 40035). Antes del inicio del registro de la actividad motora, los ratones tuvieron un periodo de 30 min de adaptación a las cajas experimentales que iban a ser utilizadas en la prueba (ver Figura 1-2).

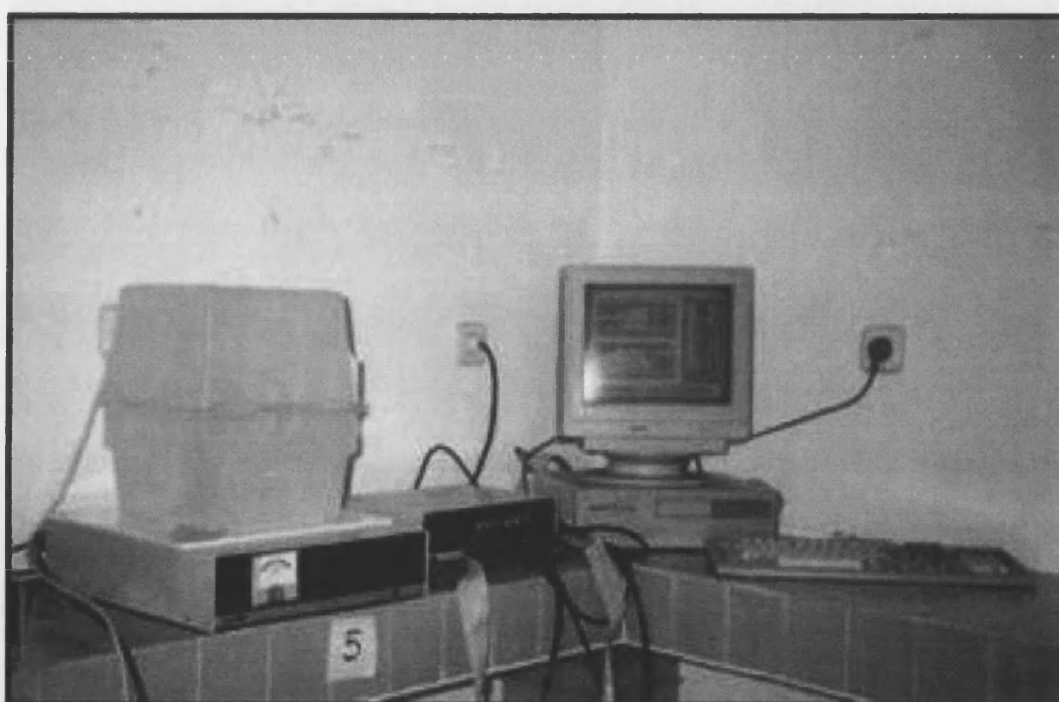


Figura 1-2: Actímetro de placas y ordenador para medir la actividad locomotora (ACTYSYSTEM II, Panlab).

3.- Laberinto elevado en forma de cruz: Consiste en dos brazos abiertos (30 x 5 cm) y dos brazos cerrados (30 x 5 x 15 cm) que forman una plataforma central (5 x 5 cm). El suelo de los brazos y del centro es de plástico gris oscuro y las paredes de los brazos cerrados son de plástico transparente. Los brazos abiertos poseen un pequeño alzado (0,25 cm) para permitirles a los animales un

punto de agarre adicional, evitando caídas durante la realización del test. El laberinto estaba elevado del suelo 45 cm (ver Figura 1-3).

Todos los tests se realizaron con una iluminación roja tenue y se grabaron para su posterior análisis con una vídeo-cámara (*Panasonic M7 VHS*). Estas pruebas se visualizaron en un monitor de televisión (*ELBE*) y se analizaron con la ayuda de un ordenador (*Pentium MMX 166*), mediante el programa informático *Ratón Time*, adaptación para PC del programa *Mouse-time* (Brain y cols., 1989) que permite valorar la conducta de los animales gracias al uso de distintas claves para cada categoría conductual. Mediante este procedimiento se valoró el tiempo que los animales pasaron en los brazos del laberinto y en la plataforma central para su posterior análisis estadístico.

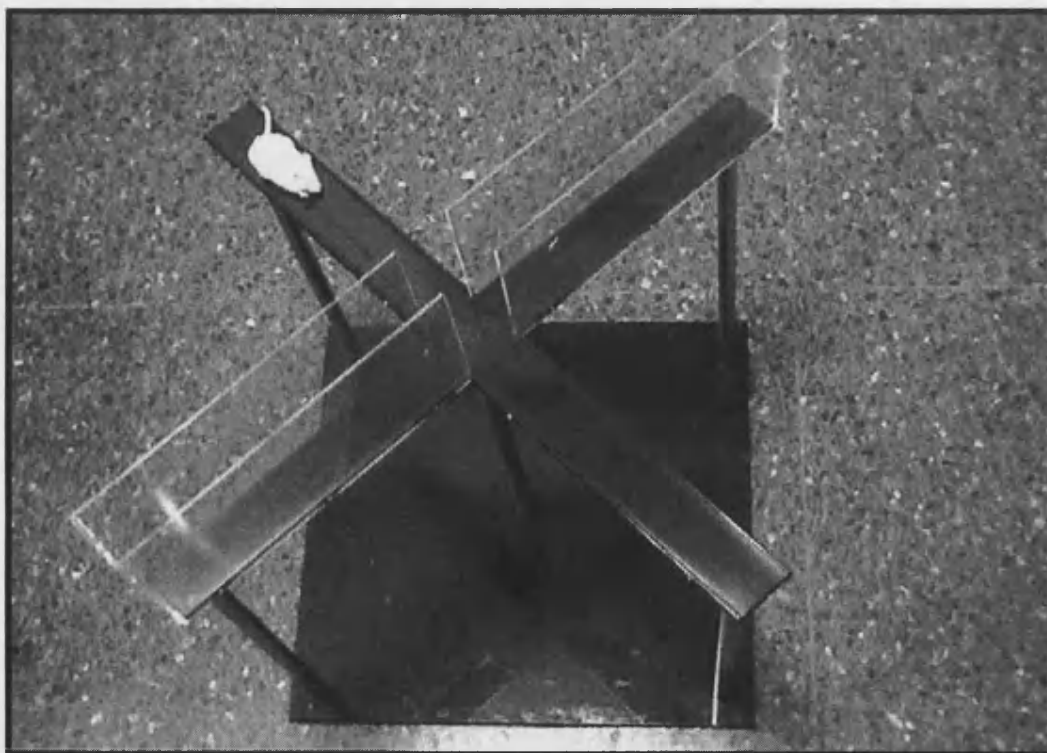


Figura 1-3: Laberinto elevado en forma de cruz (*plus maze*) utilizado para evaluar el nivel de ansiedad de los ratones NMRI.

4.- Laberinto de agua: Se utilizó una versión adaptada a ratones del laberinto descrito por Morris (1984) y utilizada previamente en nuestro laboratorio en estudios con la cepa NMRI (Vicens y cols., 2003b). El aparato consiste en una piscina circular cuyas dimensiones eran de 1 m de diámetro y 30 cm de altura. El tanque era de metacrilato, sus paredes negras y el fondo transparente. El tanque se encontraba situado encima de una estructura de metacrilato blanco en la que estaban marcados los cuatro cuadrantes en que se dividía el área de la piscina (NO, NE, SE, SO) (ver Figura 1-4).

La piscina se llenó de agua hasta una altura de 15 cm. Se usó agua del grifo, sin hacerla opaca, debido a que el animal nada con la cabeza por encima de la cabeza y la plataforma, que se sitúa a un nivel más bajo, no puede ser vista por el animal. El agua se mantuvo a una temperatura constante de $24 \pm 1^\circ\text{C}$. La plataforma de escape tenía unas medidas de 6 x 6 cm y se sitúo 1 cm por debajo de la superficie del agua en una posición fija de la piscina (NO). Se utilizaron tres posiciones de salida equidistantes a lo largo del perímetro de la piscina, exceptuando el cuadrante en el que estaba situada la plataforma (Dellu y cols., 1997; Vicens y cols., 2003b).

El tanque se colocó en una habitación iluminada artificialmente y en la que estaban presentes numerosas claves extra-laberinto: varias figuras geométricas de cartulina en las paredes, pósters, luces, equipamiento de laboratorio, la vídeo-cámara, etc.

Las latencias de escape de los animales fueron medidas por el experimentador mediante un cronómetro digital. El experimentador siempre se colocaba en el mismo lugar de la habitación. Las pruebas finales sin plataforma (*probe trials*) se grabaron mediante una vídeo-cámara (*Panasonic M7 VHS*) situada en una esquina de la piscina de manera que se pudiera grabar toda el área del tanque. Estas pruebas se visualizaron en un monitor de televisión (*ELBE*) y fueron analizadas mediante el *Ratón Time* (descrito anteriormente). Mediante este procedimiento se valoró el porcentaje de tiempo que los animales pasaron en cada

uno de los cuadrantes en que se dividió la piscina durante la prueba final (*probe trial*) sin plataforma, cuya duración era de 60 seg.

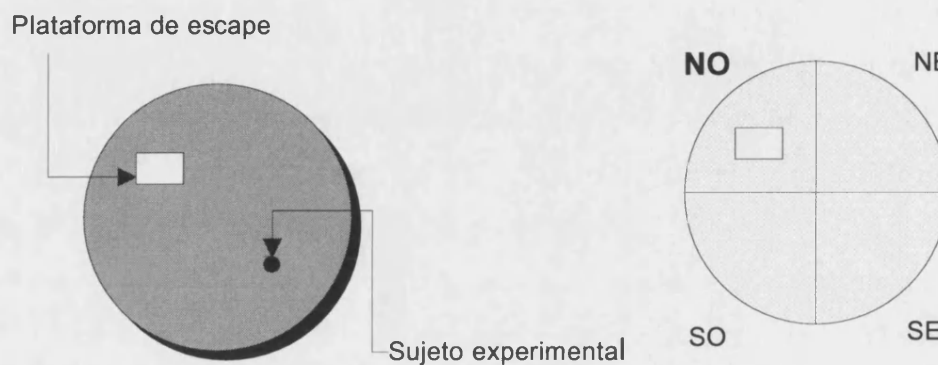


Figura 1-4: Esquema del laberinto de agua de Morris donde pueden apreciarse los cuadrantes en que se dividía la piscina.

PROCEDIMIENTO

1.- Pre-test de agresión: Finalizados los 30 días en que cada animal había permanecido en su condición de alojamiento (Aislado o Agrupado), 171 ratones macho NMRI fueron confrontados con un oponente con el fin de determinar su nivel basal de agresividad. Como oponentes estándares se utilizaron animales agrupados. Estos animales fueron *anosmiados* mediante la instilación de un volumen de 0,025 ml de sulfato de zinc en cada fosa nasal, utilizando para ello una aguja despuntada y evitando la entrada de líquido en la boca del animal. La anosmia se realizó el día anterior al encuentro agonístico. Esta práctica se utiliza para eliminar temporalmente el sentido del olfato con el fin de que estos animales sean capaces de provocar una conducta de ataque, pero no la inicien, al no percibir una feromona (presente en la orina de los ratones macho) que en condiciones normales provocaría una conducta agresiva (Brain, 1981; Redolat y cols., 2000, 2002).

El pre-test de agresión consistió en situar a los dos ratones en una pecera de metacrilato transparente separados por una barrera móvil durante un minuto de adaptación a la caja de agresión; seguidamente se quitaba la barrera y se les dejaba como máximo un tiempo de 5 minutos si no se había iniciado el ataque. En el momento en que sucediera el ataque, se separaba a los animales y el experimentador contabilizaba el tiempo de latencia al primer ataque con el crónometro digital. Esta medida tenía la finalidad de clasificar a los animales en dos grupos experimentales: los de baja latencia de ataque (*short attack latency o SAL*) con menos de 150 segundos de latencia y los de alta latencia de ataque (*long attack latency o LAL*) con más de 240 segundos de latencia de ataque. Este criterio de selección había sido validado previamente en nuestro laboratorio para ratones NMRI (Moragrega y cols., 2002). Después de este pre-test quedaron seleccionados 95 animales para conformar los siguientes grupos: Aislados-Corta latencia de ataque (AIS-SAL); Aislados-Larga latencia de ataque (AIS-LAL); Agrupados-Larga latencia de ataque (AGR-LAL) que fueron asignados aleatoriamente a cada uno de los tratamientos farmacológicos empleados (ver Figura 1-5).

Como puede observarse en la distribución de los grupos, no aparece el grupo de *Agrupados-Corta latencia de ataque* debido a que muy pocos de los ratones que se evaluaron en el pre-test y que habían sido mantenidos en esta condición de alojamiento, atacaron al oponente anónimo antes de los 5 minutos. Por tanto, no obtuvimos el suficiente número de animales para conformar un grupo experimental de dichas características.

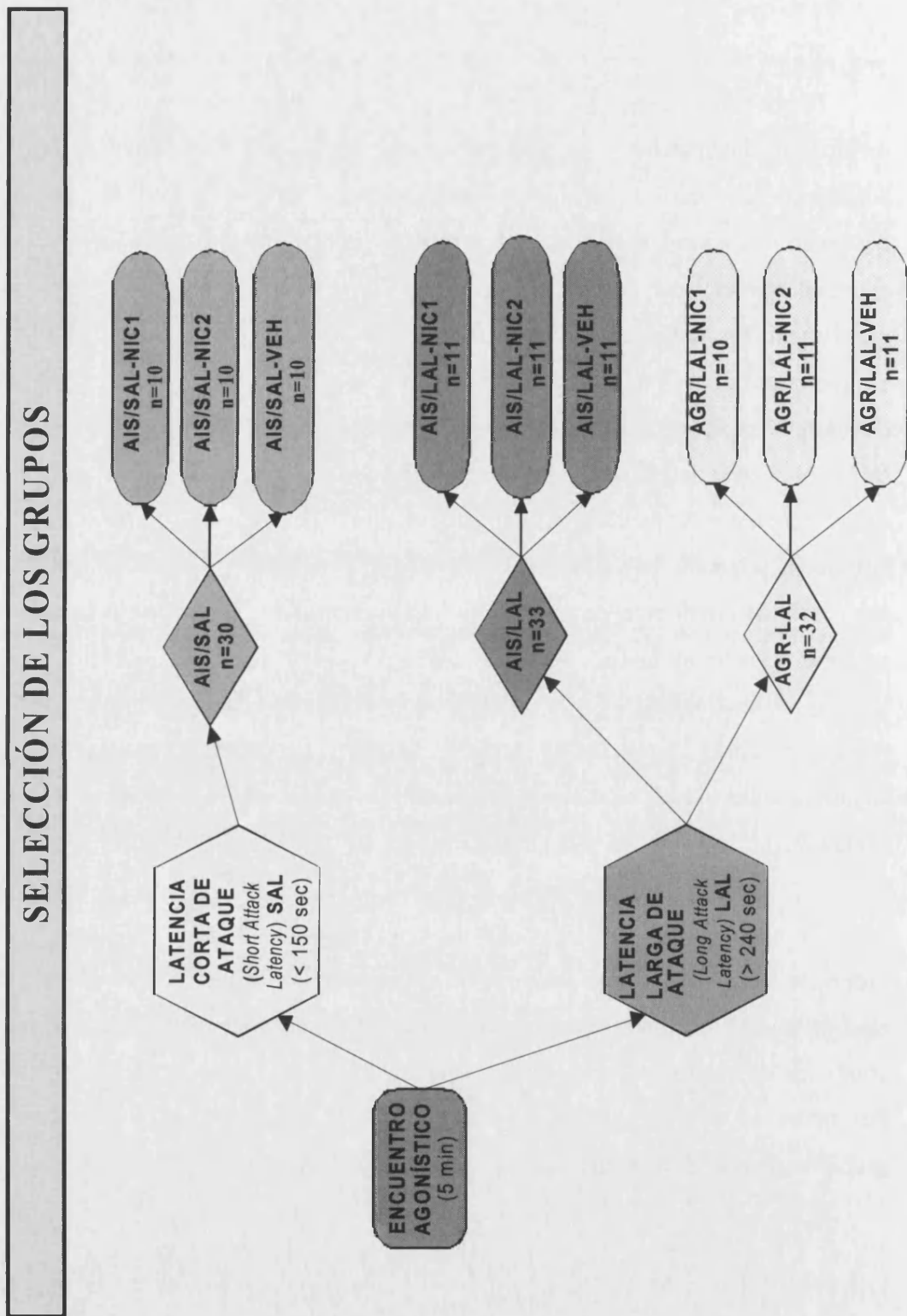


Figura 1-5: Selección de los grupos experimentales según su conducta de ataque en un encuentro agonístico.

2.- Medidas de actividad motora: Trascurridas 48 horas desde el pre-test de agresión, los animales fueron evaluados en el actímetro durante un período total de 30 min, considerándose 6 muestras de 5 min cada una para su posterior análisis. Previamente al inicio de la medida, los animales dispusieron de un período de adaptación a la caja experimental de 30 minutos. Los tests se realizaron entre las 9:00-14:00 hr y después de cada ensayo las cajas eran limpiadas cuidadosamente. Las medidas de actividad motora se efectuaron sin que los animales recibieran tratamiento farmacológico, previamente a la evaluación de cada animal en las tareas del laberinto elevado en forma de cruz y del laberinto de agua, con objeto de determinar si una posible hiperactividad de los animales influía en estas tareas.

3.- Laberinto elevado en forma de cruz (*plus maze*): 24 hr después de haber pasado la prueba de actividad motora, los animales fueron testados en el *plus maze*. Se trasladaron 1 hr antes a la sala experimental para minimizar los efectos del estrés por el transporte y facilitar su adaptación a las condiciones de la sala experimental. Con cada animal el laberinto se limpiaba cuidadosamente con un trapo húmedo para eliminar restos de olor del animal anterior.

El test tuvo una duración de 5 min y se iniciaba colocando al animal en la plataforma central mirando hacia un brazo abierto y se permitía que el animal explorara libremente el aparato. La prueba se llevó a cabo con los animales libres de fármaco y el orden en que pasaron los animales de las distintas condiciones experimentales fue aleatorio. El experimento se grabó con vídeo-cámara para su posterior análisis en el que se valoraron las entradas del animal en brazos abiertos, cerrados y plataforma central, así como el porcentaje de tiempo pasado en cada uno de estos lugares y la latencia total de entradas a brazos.

4.- Laberinto de agua: Cada animal recibió 4 sesiones a lo largo de 5 días. En cada sesión los animales se colocaban durante 30 seg en la plataforma antes del primer ensayo y después se les dejaba nadar libremente durante 60 segundos o hasta que alcanzasen la plataforma de escape. Los animales que no tenían éxito en encontrar la plataforma durante este tiempo eran colocados en la misma por el experimentador y permanecían en ella durante 30 seg. El intervalo entre ensayos (ITI) fue también de 30 seg durante los cuales el animal permanecía en una jaula individual al lado de la piscina hasta el siguiente ensayo.

Las posiciones de salida se asignaron de manera pseudoaleatoria de modo que ningún animal saliera desde la misma posición en dos ensayos consecutivos. El experimentador registraba el tiempo que el animal tardaba en encontrar la plataforma (latencia de escape). Tras el cuarto ensayo del último día se realizó una prueba final (*probe trial*) durante la cual se eliminó la plataforma y se dejó a los animales nadar libremente durante 60 segundos, registrándose el tiempo que los animales pasaban en cada uno de los cuatro cuadrantes en los que se dividía la piscina (ver Figura 1-6).

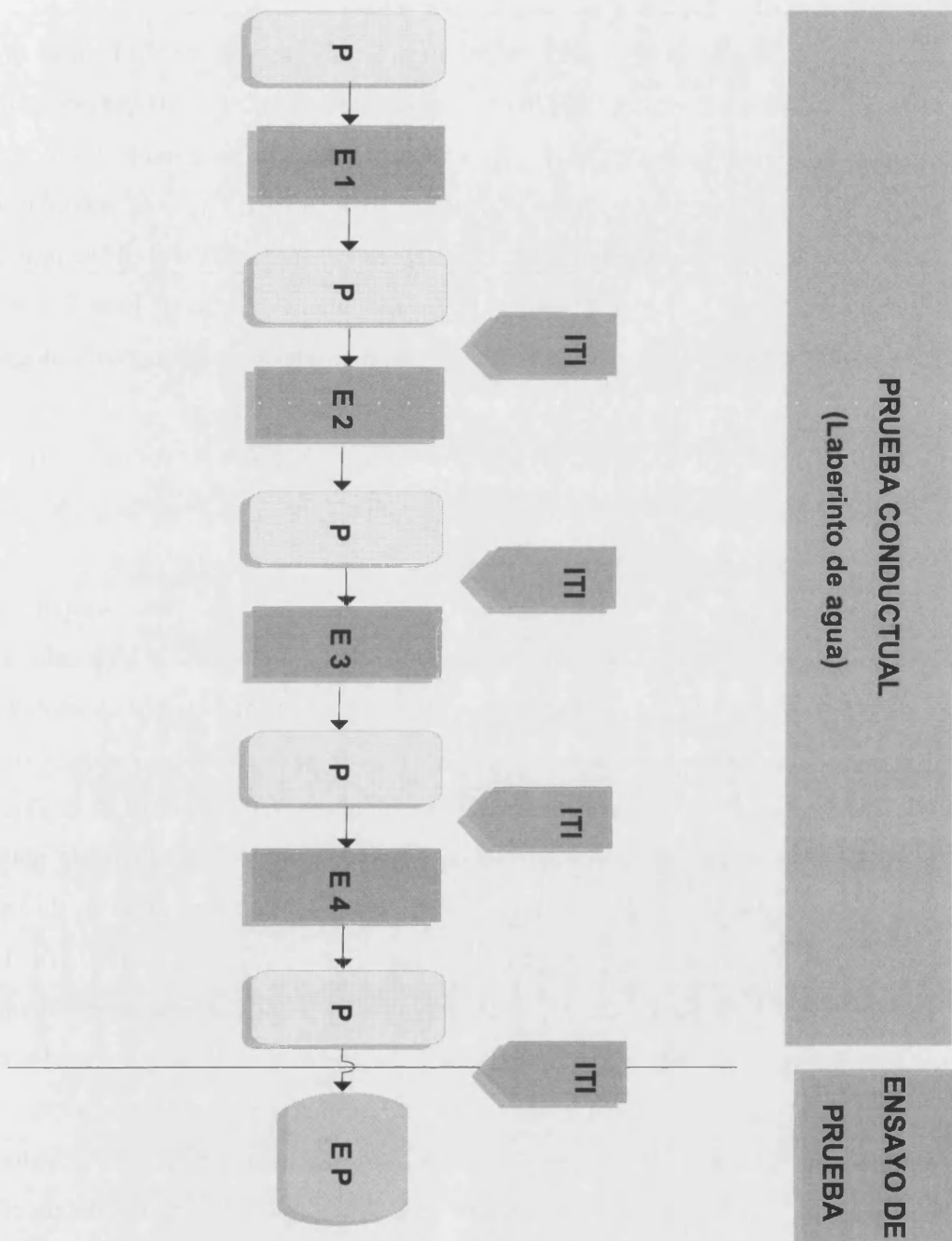


Figura 1-6: Procedimiento de la prueba del laberinto de agua. P = Plataforma (30 seg) E = Ensayo (60 seg); ITI = Intervalo entre ensayos (30 seg); EP = Ensayo de prueba sin plataforma (*probe trial*) (60 seg)

FÁRMACO

Los animales recibieron tratamiento farmacológico con nicotina [(-)-Nicotine hydrogen di-(+)-tartrate SALT] (SIGMA-Aldrich. Madrid) que por su alta toxicidad tuvo que ser manipulada en condiciones de riguroso control. La nicotina se pesó en una balanza de precisión (METTLER AJ50). Una vez medidas las dosis, la nicotina se disolvió en suero fisiológico (0,9% NaCl) y el pH se ajustó a 7 con hidróxido de sodio (NaOH). Las dosis utilizadas en forma de base fueron de 0,35 mg/kg y 0,175 mg/kg de nicotina. El grupo control recibió suero fisiológico. Todas las dosis fueron administradas en un volumen de 10 ml/kg. Estas sustancias se administraron subcutáneamente 15 minutos antes de la sesión diaria de entrenamiento en el laberinto de agua a lo largo de 5 días (ver Figuras 1-7 y 1-8).

Los grupos se determinan por las condiciones de Alojamiento (Aislado/Agrupado) y por el Tratamiento (Nicotina 1; Nicotina 2; Vehículo. Los grupos resultantes de dicha combinación son los siguientes: ratones aislados de corta latencia de ataque tratados con 0,35 mg/kg de nicotina (AIS/SAL-NIC1) (n=10); ratones aislados de corta latencia de ataque tratados con 0,175 mg/kg de nicotina (AIS/SAL-NIC2) (n=10); ratones aislados de corta latencia de ataque tratados con suero fisiológico (AIS/SAL-VEH) (n=10); ratones aislados de larga latencia de ataque tratados con 0,35 mg/kg de nicotina (AIS/LAL-NIC1) (n=11); ratones aislados de larga latencia de ataque tratados con 0,175 mg/kg de nicotina (AIS/LAL-NIC2) (n=11); ratones aislados de larga latencia de ataque tratados con suero fisiológico (AIS/LAL-VEH) (n=11); ratones agrupados de larga latencia de ataque tratados con 0,35 mg/kg de nicotina (AGR/LAL-NIC1) (n=10); ratones agrupados de larga latencia de ataque tratados con 0,175 mg/kg de nicotina (AGR/LAL-NIC2) (n=11); ratones agrupados de larga latencia de ataque tratados con suero fisiológico (AGR/LAL-VEH) (n=11) (ver Figuras 1-5 y 1-7).

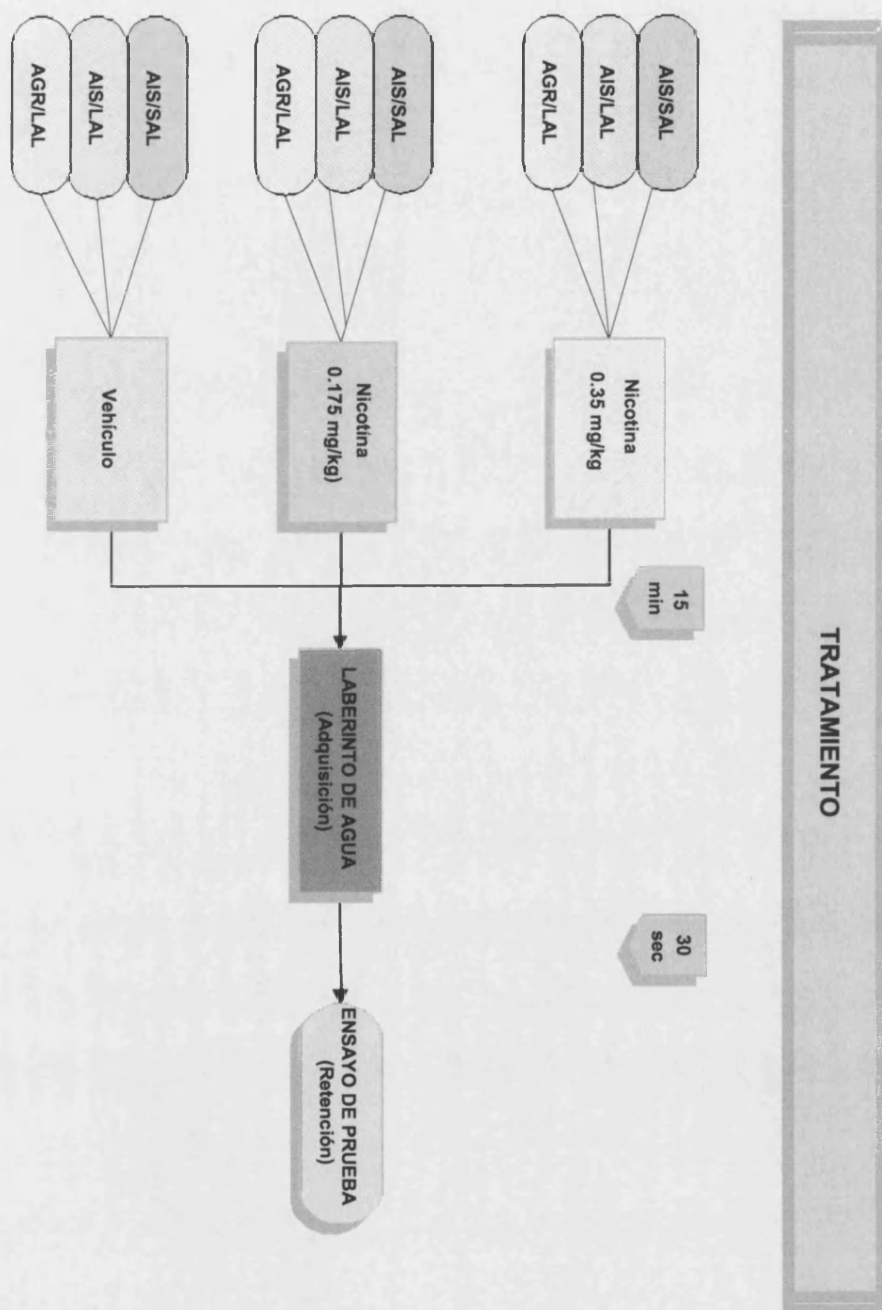


Figura 1-7: Procedimiento de la administración del fármaco previa a la sesión de entrenamiento durante 5 días.

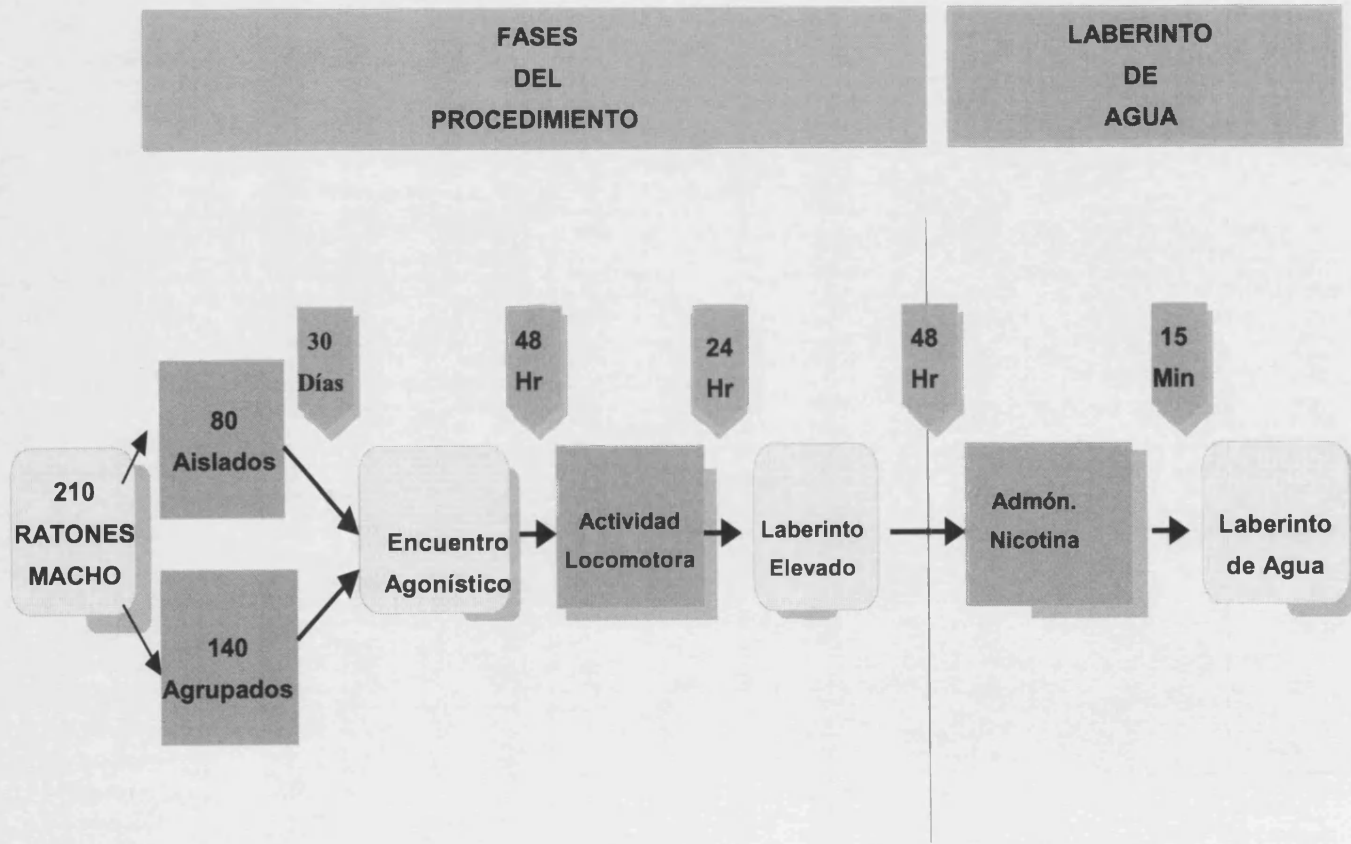


Figura 1-8: Esquema de las fases del procedimiento del presente experimento.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

1.- Actividad motora: Para examinar la actividad motora de los animales se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía tomando como variable dependiente el índice global de actividad (índice de actividad motora) y como variables entre-sujeto el factor Grupo (con 3 niveles de tratamiento: AIS-SAL; AIS-LAL y AGR-LAL).

Para obtener información de las 6 muestras temporales en que se dividió el periodo total de medida (30 min) se realizó un ANOVA de medidas repetidas en el que se consideró el factor Grupo como variable entre-sujeto (con 3 niveles) y el factor Muestra como variable intra-sujeto (con 6 niveles). Para ambos tipos de análisis, en los casos apropiados, se llevaron a cabo las pruebas post-hoc de Newman-Keuls. Se consideró $p < 0.05$ como nivel de significación estadística.

2.- Laberinto elevado en forma de cruz: Se realizó un ANOVA con el factor Grupo como variable entre-sujeto (con 3 niveles) y el factor Localización como variable intra-sujeto con 3 niveles: brazos abiertos, brazos cerrados y plataforma central. En los casos apropiados se realizaron pruebas post-hoc de Newman-Keuls.

Para las otras variables dependientes tomadas en el presente experimento: entradas totales a brazos, tiempo en plataforma central y porcentaje de tiempo en plataforma central, se realizó un ANOVA multivariado con el factor Grupo como variable entre-sujeto (con tres niveles), así como los análisis post-hoc pertinentes. En ambos casos el nivel de significación fue de $p < 0.05$

3.- Laberinto de agua: En la adquisición de la tarea de aprendizaje espacial se realizó un ANOVA para analizar las latencia de escape durante la adquisición del laberinto con el factor Día (de 5 niveles correspondientes a los 5 días de

entrenamiento) y el factor Ensayo (4 niveles correspondientes a los 4 ensayos de cada sesión) como variables intra-sujeto. En la retención del laberinto de agua se analizó el tiempo que los ratones pasaron en cada cuadrante en el ensayo de prueba (factor Cuadrante: 4 niveles).

El complejo diseño de nuestro estudio indicaría que los factores que podrían influir en la adquisición y/o retención del laberinto de agua son: Alojamiento; Agresividad; Tratamiento y Día de entrenamiento. Estos factores hubieran requerido un ANOVA mixto de medidas repetidas considerando todos los grupos. Sin embargo, como ya hemos comentado anteriormente, en nuestra selección según el nivel de agresividad de los animales no obtuvimos ratones agrupados de corta latencia de ataque. Este diseño incompleto requiere, por tanto, dos tipos de ANOVAs para evaluar la adquisición del laberinto de agua: un primer ANOVA que analizaría los factores Alojamiento, Tratamiento y Día, manteniendo el nivel de Agresividad constante (sólo se considerarían los ratones LAL); un segundo ANOVA en el que los factores implicados serían Agresividad, Tratamiento y Día, manteniéndose el factor Alojamiento constante (sólo se consideran los ratones aislados).

Además, con el fin de obtener una visión más global de los datos obtenidos y para evaluar posibles diferencias entre los 9 grupos formados en el presente experimento, posteriormente analizamos los resultados para cada grupo considerando los cuatro factores de nuestro diseño: Alojamiento; Agresividad; Tratamiento y Día, así como el factor Grupo como variable entre-sujeto (con 9 niveles). En todo los casos apropiados se realizaron pruebas post-hoc adecuadas y se consideró como nivel de significación $p < 0.05$.

1.2.- RESULTADOS

1.- Actividad motora:

1.1.- Análisis global de la actividad motora: el ANOVA mostró diferencias significativas entre los grupos [$F(2,92)=13.48$; $p<0.001$]. Las pruebas post-hoc señalaron que los ratones AIS/SAL y AIS/LAL tuvieron un mayor número de cuentas de actividad que los AGR/LAL ($p<0.05$) (ver Figura 1-9A).

1.2.- Análisis con las 6 muestras temporales: el factor Grupo resultó significativo [$F(2,92)=13,48$; $p<0.001$]. Las pruebas post-hoc señalaron que ambos grupos de ratones aislados, SAL y LAL, se movieron significativamente más que los agrupados ($p<0.05$). El factor Muestra [$F(5,460)=36,95$; $p<0.05$] también resultó significativo, indicando un descenso de la actividad motora en el transcurso temporal (ver Figura 1-9B)

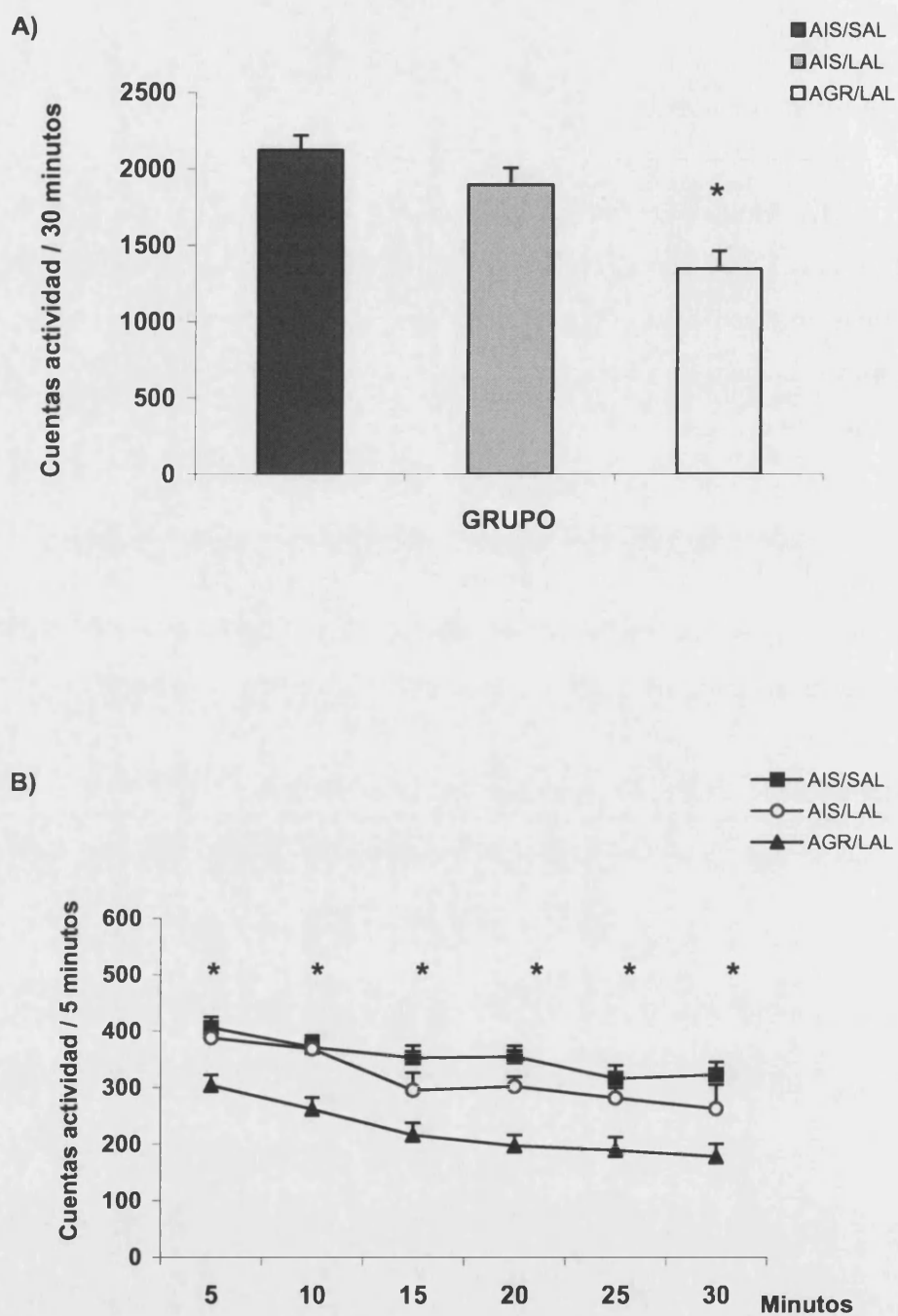


Figura 1-9: Medias (\pm SEM) de la actividad locomotora mostrada por los tres grupos de animales: AIS/SAL (n=30), AIS/LAL (n=32) y AGR/LAL (n=33). A) N° total de cuentas para 30 min * $p < 0.05$ AGR/LAL vs ambos grupos de aislados. B) Cuentas para cada periodo de 5 min * $p < 0.05$ AGR/LAL vs los otros dos grupos de aislados.

2.- Laberinto elevado en forma de cruz: El ANOVA mostró que el factor Grupo fue significativo en las siguientes variables: número de entradas en brazos abiertos [$F(2,94)=6,25$; $p<0.003$]; número de entradas en brazos cerrados [$F(2,94)=6,8$; $p<0.002$]; número total de entradas a brazos [$F(2,94)=11,14$; $p<0.001$] y porcentaje de tiempo en plataforma central [$F(2,94)=3,23$; $p>0.05$]. Las pruebas a posteriori señalaron que los grupos aislados de corta latencia de ataque y aislados de larga latencia de ataque realizaron un mayor número de entradas totales a brazos, de entradas a brazos abiertos y de entradas a brazos cerrados que los agrupados de larga latencia de ataque ($p<0.05$). El porcentaje de tiempo en la plataforma central fue menor en los agrupados que en los grupos aislados tanto de corta como de larga latencia de ataque ($p<0.05$). El factor Grupo no resultó significativo en el porcentaje de entradas en brazos abiertos ni en el porcentaje de tiempo en brazos abiertos (ver Tabla 1).

Categorías	GRUPOS		
	AIS/SAL	AIS/LAL	AGR/LAL
Entradas totales	24 ± 1.4	22.3 ± 1.1	16.5 ± 0.9**
Entradas brazos abiertos	11.5 ± 0.9	11.2 ± 0.8	7.9 ± 0.6*
Entradas en brazos cerrados	12.5 ± 0.9	11.1 ± 0.7	8.7 ± 0.6*
% Entradas en brazos abiertos	48 ± 2.6	49.7 ± 2.5	48.1 ± 3
% Tiempo en brazos abiertos	36.4 ± 2.6	39.4 ± 2.5	38.1 ± 3
% Tiempo en plataforma central	30.2 ± 1.7	26.2 ± 1.4	32.3 ± 2.2 +

TABLA 1: Efectos del aislamiento y el nivel de agresividad en la ejecución en el laberinto elevado en forma de cruz en ratones macho NMRI. Los datos se presentan como los valores de la media ± SEM. AIS/SAL: ratones aislados de corta latencia de ataque; AIS/LAL: ratones aislados de larga latencia de ataque; AGR/LAL: ratones agrupados de larga latencia de ataque.

** $p<0.001$ vs los otros dos grupos.

* $p<0.005$ vs los otros dos grupos.

+ $p<0.05$ vs AIS/LAL.

3.1- Adquisición: los factores analizados en nuestro diseño son cuatro: las condiciones de Alojamiento, la Agresividad, el Tratamiento y el Día en la adquisición del laberinto. Al no poder realizar el ANOVA mixto de medidas repetidas que requeriría este diseño, se realizaron dos ANOVAs separados.

En el primer ANOVA se consideraron los factores Alojamiento, Tratamiento y Día, manteniendo el factor Agresividad constante (sólo se consideraron los ratones LAL). El factor Día resultó significativo [$F(4,236)=57,26$, $p<0.001$] indicando un descenso en las latencias de localización de la plataforma. No hubo efectos significativos de la administración de nicotina ni de las condiciones de alojamiento (ver Figura 1-10).

En el segundo ANOVA se consideraron los factores Agresividad, Tratamiento y Día, manteniendo el factor constante (sólo se incluyeron en el análisis los ratones aislados). No encontramos diferencias según el nivel de agresividad de los ratones. Sin embargo, el factor Día [$F(4,228)=67,59$; $p<0.001$] y el Tratamiento [$F(2,57)=4,59$; $p<0.05$] resultaron significativos. Los análisis post-hoc con Newman-Keuls señalaron que los animales aislados tratados con vehículo mostraron latencias de escape más bajas que los otros dos grupos de aislados tratados con nicotina ($p<0.05$).

En un intento de analizar los datos con mayor profundidad y no perder información a causa de lo incompleto del diseño, realizamos un ANOVA para los 9 grupos incluidos en el presente experimento (considerando las 4 variables de nuestro diseño experimental). En este ANOVA general no observamos diferencias significativas entre los grupos en las latencias de escape correspondientes a las sesiones de entrenamiento para la adquisición de la tarea espacial. Sí apreciamos que las latencias de escape fueron descendiendo progresivamente durante los días de entrenamiento desde una media de 53,8 ($\pm 2,56$) seg el Día 1 hasta los 24,17 ($\pm 4,26$) seg el Día 5

[F(4,344)=92,02; $p<0.001$] (ver Figura 1-9), indicando que todos los animales aprendieron a localizar la plataforma de escape. El factor Ensayo [F(3,258)=14,47; $p<0.001$] y la interacción Grupo x Ensayo [F(24,258)=1,82; $p<0.01$] también fueron estadísticamente significativas. Las interacciones Grupo x Día, y Grupo x Día x Ensayo no indicaron diferencias significativas entre los grupos.

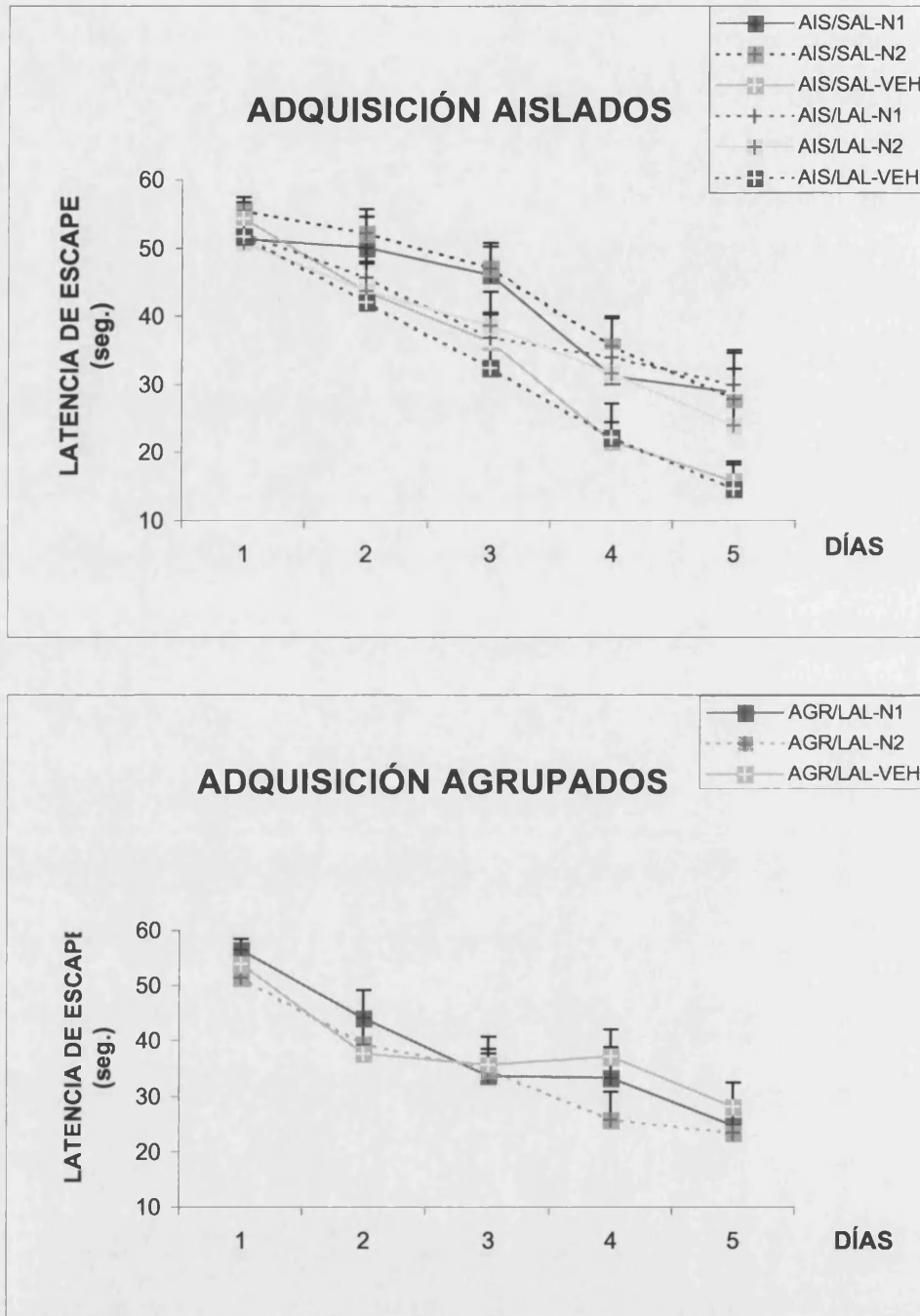


Figura 1-10: Medias \pm SEM de las latencias de escape en el laberinto de agua durante los 5 días de entrenamiento de los ratones de distinta condición de aislamiento y nivel de agresividad.

A) Adquisición de los ratones macho NMRI aislados: aislados de corta latencia de ataque tratados con 0,35 mg/kg de nicotina (AIS/SAL-N1), tratados con 0,175 mg/kg de nicotina (AIS/SAL-N2), o bien con vehículo (AIS/SAL-VEH); aislados de larga latencia de ataque tratados con 0,35 mg/kg de nicotina (AIS/LAL-N1), con 0,175 mg/kg de nicotina (AIS/LAL-N2) o con vehículo (AIS/LAL-VEH);

B) Adquisición de los ratones macho NMRI agrupados: agrupados de larga latencia de ataque tratados con 0,35 mg/kg de nicotina (AGR/LAL-N1), con 0,175 mg/kg de nicotina (AGR/LAL-N2) o con vehículo (AGR/LAL-VEH).

3.2- Retención: Para obtener los datos de la retención de la tarea espacial del laberinto de agua, se analizó el tiempo que cada animal pasó en el cuadrante noroeste (NO), en el cual había estado situada la plataforma de escape durante la adquisición de la tarea.

En el primer ANOVA para analizar los datos del ensayo de prueba se consideraron los factores Alojamiento, Agresividad y Día. El factor Agresividad se mantuvo constante y sólo se tuvieron en cuenta los ratones LAL. En este análisis el factor Alojamiento no alcanzó la significación estadística. Sin embargo, al observar cuidadosamente las gráficas y las medias de los datos se apreciaba una amplia diferencia entre animales aislados y agrupados en el tiempo pasado en el cuadrante NO. Para poner a prueba dicha diferencia se llevó a cabo una *Prueba t* con el ajuste de Bonferroni (para controlar la tasa de error tipo I). Esta comparación confirmó que los animales aislados controles pasaron más tiempo en el cuadrante de la plataforma que los animales agrupados controles $t=2.57$, $p<0.05$.

El segundo ANOVA, considerando únicamente los ratones LAL teniendo en cuenta los factores Agresividad, Tratamiento y Día (manteniendo el factor Alojamiento constante), indicó que no había diferencias en la retención según el nivel de agresividad pero sí resultó significativo el factor Tratamiento [$F(2,57)=3,8$; $p<0.05$]. Las pruebas post-hoc señalaron que los animales aislados tratados con la dosis más alta de nicotina (0.35 mg/kg) pasaron menos tiempo en el cuadrante NO que los animales tratados con vehículo ($p<0.05$).

Cuando analizamos la retención de la tarea espacial tomando en consideración los 9 grupos incluidos en el estudio, el factor Cuadrante [$F(3,84)=67,38$; $p<0.001$] y la interacción Grupo x Cuadrante [$F(24,258)=1,83$; $p<0.01$] resultaron significativas. Análisis a posteriori revelaron que los ratones pasaron más tiempo en el cuadrante noroeste que en el sureste y noreste ($p<0.01$). Los grupos de aislados tratados con suero fisiológico tanto de corta como de larga latencia de ataque (AIS/SAL-VEH y AIS/LAL-VEH) pasaron más tiempo en el

cuadrante de entrenamiento (NO) que los agrupados controles (AGR/LAL-VEH). El porcentaje de tiempo pasado en la zona NO del laberinto fue del 42,5% para los AIS/SAL-VEH, del 43,8% para el grupo AIS/LAL-VEH y del 26,5% para el grupo AGR/LAL-VEH (ver Figura 1-11).

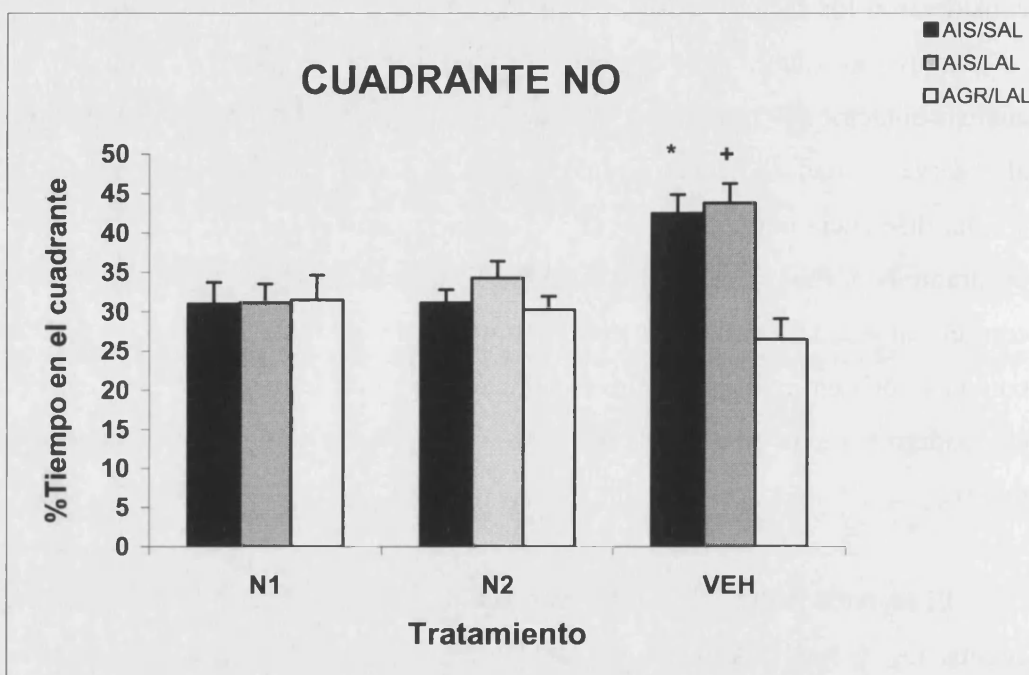


Figura 1-11: Media del porcentaje de tiempo en el cuadrante de la plataforma durante el ensayo de prueba en ratones aislados de corta latencia de ataque (AIS/SAL), de larga (AIS/LAL) y agrupados de larga latencia (AGR/LAL) tratados con 0,35 mg/kg de nicotina (N1), con 0,175 mg/kg (N2) o con suero salino (VEH).

*ISO/SAL-VEH vs AGR/LAL-VEH.

+ISO/LAL-VEH vs AGR/LAL-VEH

1.3.- DISCUSIÓN

El principal objetivo de esta investigación fue evaluar la posible modulación de las condiciones de alojamiento y el nivel de agresividad en el aprendizaje de una tarea espacial en ratones macho NMRI, así como estudiar si la actividad motora y/o la ansiedad, las cuales pueden ser modificadas por las condiciones de alojamiento, pueden influir en la relación entre agresión y aprendizaje. Adicionalmente, nos interesaba examinar si los factores sociales modulan los efectos conductuales de la nicotina en el laberinto de agua de Morris.

Efectos de las condiciones de alojamiento y del nivel de agresividad en la actividad motora espontánea

Nuestros resultados indican que los animales aislados muestran hiperactividad motora frente a sus homólogos agrupados, confirmando estudios anteriores (Hilakivi y cols., 1989; Gariépy y cols., 1995; Rilke y cols., 1998b) y ampliando observaciones realizadas en nuestro laboratorio con ratones de la misma cepa (Moragrega y cols., 2002). Esta hiperactividad locomotora parece ser independiente del nivel basal de agresividad de los animales, ya que no se observaron diferencias significativas entre ratones aislados de corta o larga latencia de ataque. Este dato concuerda con los obtenidos en investigaciones previas en las que grupos de ratones con diferente nivel de agresión mostraron una actividad motora espontánea similar (Moragrega y cols., 2002). Nuestros resultados, sin embargo, contrastan con otros estudios en los que los ratones más agresivos muestran mayor actividad que los no agresivos (Sandnabba, 1996; Kvist y cols., 1997; Gariépy, y cols., 2002). Una de las razones para tal discrepancia podría ser que estos estudios están realizados con cepas de ratones criados selectivamente por su nivel de agresividad.

Efectos de las condiciones de alojamiento y del nivel de agresividad en las medidas de ansiedad

Uno de los resultados más relevantes en este experimento es que el alojamiento en aislamiento social en la cepa NMRI no parece inducir claros efectos ansiolíticos o ansiógenos en el laberinto elevado en forma de cruz (*plus maze*). En nuestro estudio no hallamos diferencias significativas entre ratones aislados y agrupados ni en el porcentaje de entradas ni en el tiempo pasado en los brazos abiertos del laberinto. La investigación previa sobre las consecuencias del aislamiento social en los paradigmas de ansiedad aporta resultados contradictorios. Haller y colaboradores (2000) observaron que un periodo de aislamiento de 7 días incrementó la ansiedad en el test de interacción social, pero no afectó los niveles de ansiedad en el *plus maze*. En este sentido, otro estudio que comparó la ejecución de ratones aislados y agrupados en el laberinto elevado también señaló que una semana de aislamiento no inducía efectos ansiolíticos ni ansiógenos en los animales controles. Sin embargo, dicho periodo de aislamiento modificó algunas respuestas en los ratones tratados con clozapina (Manzaneque y cols., 2002).

Considerando los datos obtenidos en nuestro trabajo, las variables que mejor discriminan entre ratones aislados y agrupados en el laberinto elevado son las entradas a brazos abiertos, a brazos cerrados y la suma total del número de entradas a brazos abiertos y cerrados. No hubo diferencias, sin embargo, en el porcentaje de tiempo pasado en brazos abiertos. Estos resultados sugerirían que el aislamiento no demostró tener un efecto específico en la ansiedad porque aumentaron todas las conductas activas. De hecho, el número total de entradas tanto a brazos abiertos como cerrados en el laberinto se considera una medida de actividad locomotora (Espejo, 1997; Zarrindast y cols., 2001) y dichas medidas aumentaron significativamente en los animales alojados individualmente. Nuestros resultados, además, confirman el conocido fenómeno de hiperactividad inducida por aislamiento, y evidencian que dicho fenómeno también se puede ser observado en el laberinto elevado, un modelo animal utilizado generalmente para

detectar efectos ansiógenos o ansiolíticos de los fármacos o de manipulaciones conductuales (Pellow y cols., 1985; Lister, 1987).

Estudios previos han mostrado relaciones entre el nivel de agresión de los roedores y sus niveles de ansiedad (Maestriperi y cols., 1991; Ferrari y cols., 1998; Kudrayavtseva y cols., 2002), aunque se han aplicado diferentes procedimientos para evaluar cómo los factores sociales podrían afectar la ejecución de los animales en las pruebas de ansiedad. Por ejemplo, se ha observado que una experiencia repetida de agresión provoca el desarrollo de conductas ansiógenas en ratones macho, dependiendo de la duración del encuentro agresivo y de la cepa estudiada (Kudryavtseva y cols., 2002, 2004). Ratas con un nivel de ansiedad bajo han mostrado ser más agresivas que aquellas con un nivel de ansiedad mayor (Henniger y cols., 2000). Sin embargo, ratones que exhiben mayor conducta ofensiva (lucha y amenaza) en los encuentros diádicos también despliegan un perfil más ansiógeno, enfatizando la influencia del estatus social (Ferrari y cols., 1998). También se ha observado un perfil ansioso en el *plus maze* en ratas previamente expuestas al olor de gato (Zangrossi y File, 1992) o en ratas macho con experiencia de derrota (Heinrichs y cols., 1992). En ratones, la exposición previa a estresores sociales también aumenta las conductas relacionadas con la ansiedad: disminuye el porcentaje de tiempo en brazos abiertos, de entradas a los mismos e incrementa algunos aspectos específicos del repertorio defensivo (Rodgers y Cole, 1993). Es importante resaltar que las diferencias entre cepas pueden ser relevantes al establecer un perfil conductual en el laberinto elevado (Rodgers y Cole, 1993; Trullas y Skolnick, 1993; Ferrari y cols., 1998). En este sentido, se ha descrito que los ratones de la cepa NMRI expresan niveles bajos de respuestas de evitación a los brazos abiertos (Griebel y cols., 2000; Carrasco y cols., 2004). Es posible que el bajo nivel de ansiedad de los ratones NMRI, la cepa utilizada en el presente experimento, pueda haber influido en la ausencia de diferencias en el nivel de ansiedad entre animales agrupados y animales sometidos a un periodo de aislamiento social.

Cuando consideramos las conductas mostradas por los animales aislados con diferente nivel de agresividad (AIS/SAL y AIS/LAL), nuestros datos reflejan que el nivel de agresividad no moduló las medidas de ansiedad obtenidas en el laberinto en cruz. No observamos diferencias significativas tanto en actividad global (medida por el total de entradas y el número de entradas en brazos cerrados) como en las entradas a brazos abiertos entre AIS/SAL y AIS/LAL. Este resultado estaría en concordancia con otras investigaciones que no encuentran diferencias en la conducta mostrada en el *plus maze* entre ratas ganadoras o perdedoras tras un encuentro agonístico (Peres y Leite, 2002). Las discrepancias entre nuestros resultados y estudios previos pueden deberse, en parte, a la distinta metodología empleada. Otros autores, por ejemplo, han investigado la influencia del estatus social (Ferrari y cols., 1998) o de la experiencias de victoria o derrota repetidas en confrontaciones agonísticas en ratones (Kudryavtseva y cols., 2002). En el presente estudio, los ratones fueron clasificados por las puntuaciones medias de las latencias de ataque mostradas en un test de pre-selección según el nivel de agresión. En esta prueba únicamente se contabilizó el tiempo hasta que el primer ataque tenía lugar, obviando un encuentro agonístico completo e innecesario para nuestros fines. Es posible, por tanto, que la latencia al primer ataque esté reflejando la reactividad de los ratones frente a una situación social novedosa.

Efectos de las condiciones de alojamiento y del nivel de agresividad en la adquisición y retención del laberinto de agua

El principal objetivo en esta investigación fue evaluar si el aislamiento social tenía un efecto diferencial sobre el aprendizaje espacial en ratones con distinto nivel de agresividad. Si estas diferencias individuales en comportamiento agresivo están relacionadas con estrategias alternativas de afrontamiento al ambiente (Benus y cols., 1991b; Sandnabba, 1995) podría esperarse que en los distintos grupos emergieran patrones diferenciales de aprendizaje de la tarea espacial. En la primera parte de nuestro experimento encontramos que, en ratones NMRI, el nivel de agresión no parecía estar relacionado con las diferencias en

actividad motora o ansiedad. Los datos también indicaron que el alojamiento en condición de aislamiento social mejoró ligeramente la retención de la tarea espacial únicamente en los animales tratados con vehículo (AIS/SAL-VEH y AIS/LAL-VEH). Aunque las condiciones de alojamiento no afectaron significativamente la adquisición de la prueba espacial en los ratones controles, si se observa con detenimiento la Figura 1-10, se aprecia que los dos grupos de aislados que recibieron suero fisiológico tuvieron latencias de escape más cortas en el día 5 que sus homólogos agrupados. Estos resultados apoyan, al menos en parte, los hallados por Wongwitdecha y Marsden (1996a) en ratas, en los que el aislamiento demostró ejercer un efecto facilitador sobre el aprendizaje espacial en el laberinto de Morris. Además, la ausencia de diferencias entre animales aislados y agrupados en la adquisición de la tarea espacial concuerda con los resultados obtenidos previamente por Coudereau y colaboradores (1997b) en ratones NMRI con periodos de aislamiento de 15 y 30 días. En este sentido, Molina-Hernández y colaboradores (2001) tampoco han encontrado diferencias entre aislados y agrupados en una tarea de *auto-shaping*.

Nuestros resultados sugieren que el nivel de agresividad en ratones no influye en la ejecución del laberinto de agua, en contraste con estudios que han empleado otras tareas de aprendizaje como por ejemplo un laberinto lineal (Kvist, 1989) o el condicionamiento de evitación activa (Benus y cols., 1991b). También han sido descritas diferencias entre ratones SAL y LAL en respuesta a algunos fármacos. Así, se ha encontrado un aumento del efecto antiagresivo de algunas sustancias que actúan a nivel de sistema dopaminérgico en ratones LAL comparados con los SAL (Felip y cols., 2001). Sin embargo, en nuestro estudio no se hallaron efectos diferenciales de la nicotina en ambos grupos de ratones, lo que sugiere que el nivel de agresividad no modula directamente los efectos conductuales de esta sustancia en el laberinto de agua.

En el presente experimento, la nicotina no mejoró la ejecución del laberinto de agua ni en ratones aislados ni agrupados. De hecho, el ANOVA realizado considerando únicamente los animales aislados, señala que ambas dosis de

nicotina (0,35 y 0,175 mg/kg) deterioraron la adquisición de la tarea espacial e incluso, la dosis más alta empeoró también la retención. Investigaciones anteriores han evaluado los efectos de la nicotina únicamente en ratones agrupados y se han encontrado algunas divergencias en los resultados. En ratones hembra de la cepa NMRI, tratadas con nicotina durante 3 días antes de un entrenamiento diario en el laberinto de agua, no se encontró una mejora significativa (Lamberty y Gower, 1991b). No obstante, en ratones C57 tratados durante 9 días mejoraron la ejecución en la tarea de aprendizaje espacial (Bernal y cols., 1999). Una explicación plausible para la ausencia de efectos de la nicotina encontrados en nuestro estudio podría ser que la cepa de ratones NMRI, en comparación con la cepa C57, adquiere la tarea del laberinto acuático más rápidamente (Vicens y cols., 1999; Van der Vegt y cols., 2001) y es menos reactiva a ambientes novedosos (Lamberty y Gower, 1996). Otra explicación complementaria a la ausencia de efectos facilitadores de la nicotina en el laberinto de agua, es que en los animales podría existir una falta de tolerancia a los efectos motores e hipotérmicos de la nicotina debido a la corta duración del tratamiento, ya que la administración de nicotina se llevó a cabo sólo durante los 5 días de entrenamiento en la prueba de aprendizaje espacial.

En conclusión, el resultado más destacable de esta investigación es que las condiciones de alojamiento afectan claramente a las conductas mostradas por los ratones NMRI en el laberinto elevado en forma de cruz. En ratones aislados se observa un aumento en las conductas que reflejan actividad locomotora y este efecto parece ser independiente del nivel de agresividad (medido como la latencia de ataque durante el encuentro agonístico). La ejecución en la tarea de laberinto de agua parece estar influida por las condiciones de alojamiento ya que los animales aislados tratados con vehículo realizaron mejor esta tarea espacial. Estos resultados confirman la necesidad de prestar atención a las condiciones de alojamiento, debido a que podrían desempeñar un papel importante en la evaluación de cualquier agente farmacológico en pruebas de aprendizaje.

2.- EXPERIMENTO II: “CONDICIONAMIENTO DE EVITACIÓN ACTIVA EN RATONES NMRI QUE DIFIEREN EN EL NIVEL DE AGRESIÓN: EFECTOS DE LAS CONDICIONES DE ALOJAMIENTO Y DE LA ADMINISTRACIÓN DE NICOTINA”.

2.1.- MATERIAL Y MÉTODO

SUJETOS

En la realización de este experimento se utilizaron 280 ratones de la cepa NMRI, con un peso a su llegada al laboratorio entre 20 y 24 gramos, procedentes de Charles River (Barcelona, España). Los ratones se acomodaron según dos condiciones de alojamiento distintas: 150 animales se alojaron individualmente en jaulas de plástico transparente de 24 x 13,5 x 13 cm (condición de Aislados) y los animales restantes se alojaron de 5 en 5 en jaulas de plástico opacas cuyas dimensiones eran de 25 x 25 x 15 cm (condición de Agrupados).

El período de aislamiento fue de 30 días hasta la realización de un encuentro agonístico cuya finalidad era clasificar a los animales según su nivel basal de agresividad. Como oponentes estándar en estos encuentros agonísticos se utilizaron animales agrupados anósmicos. Todos los animales se mantuvieron en las condiciones estándar de laboratorio descritas para el Experimento I de la presente Tesis.

APARATOS

1.- Jaula neutral: Los encuentros agresivos se realizaron en un área neutral anteriormente descrita en el Experimento I.

2.- Caja de escape-evitación (*shuttle-box*): La caja de evitación tiene unas medidas de 45 x 24,5 x 19 cm y se halla dividida en dos partes iguales de 24,5 cm separadas por una puerta para dar acceso a ambos compartimentos. Cuatro sensores invisibles de infrarrojos a cada lado de la caja (8 en total) registran la localización del animal en cada momento. Cada cruce del animal se detecta y graba con el ordenador y el interfaz (Shuttle Scan; Omnitech Electronics, Columbus, Ohio). El techo de la caja está dotado de 2 bombillas de luz blanca (6w), una en cada compartimento, que constituyen el estímulo condicionado para que el animal cambie de lado y evite la descarga. Desde el suelo de la caja, compuesto de 20 varillas de acero inoxidable, se transmite al animal la descarga eléctrica.

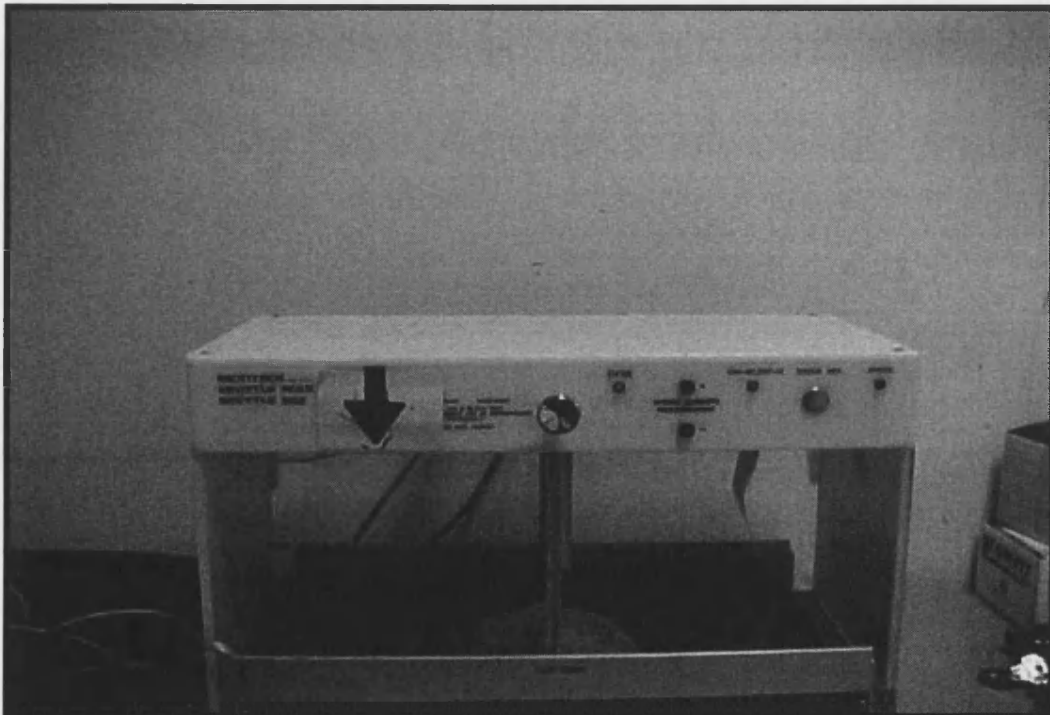


Figura 2-1: Modelo de la caja de escape-evitación en ambos sentidos (Omnitech Electronics *two-way shuttle-box*)

PROCEDIMIENTO

1.- Pre-test de agresión: Pasaron dicha prueba 146 animales aislados y 95 agrupados. El procedimiento fue el mismo que el descrito en el Experimento I. Después de este pre-test quedaron seleccionados 30 animales agrupados y 61 aislados para formar los grupos mostrados en la Tabla 2-1, utilizando el criterio de selección previamente establecido para ratones NMRI (Moragrega y cols., 2002). El experimentador midió el tiempo de latencia de los ataques con un cronómetro digital y se situó siempre en el mismo lugar de la habitación. Como puede observarse en la Tabla 2-1, en la distribución de los grupos no aparece el grupo Agrupados/SAL, ya que como que sucedió en el Experimento I con la cepa NMRI, en la clasificación en función del nivel basal de agresividad, el número de ratones agrupados que mostraron latencias cortas de ataque fue insuficiente para formar un grupo experimental.

Tabla 2-1: Grupos resultantes en el Experimento II después de la clasificación según el nivel de agresión y la aplicación del tratamiento farmacológico correspondiente (ver también el apartado posterior FÁRMACO)

Alojamiento	Agresividad	Tratamiento	Grupo	n
Aislados	SAL (<150seg)	0,35 mg/kg Nicotina	AIS/SAL-NIC1 (G1)	11
		0,175 mg/kg Nicotina	AIS/SAL-NIC2 (G2)	10
		Suero fisiológico	AIS/SAL-VEH (G3)	10
Aislados	LAL (>240seg)	0,35 mg/kg Nicotina	AIS/LAL-NIC1 (G4)	10
		0,175 mg/kg Nicotina	AIS/LAL-NIC2 (G5)	10
		Suero fisiológico	AIS/LAL-VEH (G6)	10
Agrupados	LAL (>240seg)	0,35 mg/kg Nicotina	AGR/LAL-NIC1 (G7)	10
		0,175 mg/kg Nicotina	AGR/LAL-NIC2 (G8)	10
		Suero fisiológico	AGR/LAL-VEH (G9)	10

2.- Evitación Activa: cada animal recibió 5 sesiones de entrenamiento en el condicionamiento de evitación activa a lo largo de 5 días. La sesión comenzaba con un período de adaptación al aparato durante 3 min al que le seguían 30 ensayos. El intervalo entre ensayos (ITI) tenía una duración variable de 30 ± 10 seg. El ensayo constaba de una presentación de luz blanca (6W) durante 10 seg [estímulo condicionado (EC)], a la que le seguía la descarga eléctrica, utilizada como estímulo incondicionado (EI). Si el animal cruzaba al otro lado de la caja, ambos estímulos finalizaban. Si el animal no realizaba esta conducta ante ninguno de los dos estímulos, la descarga terminaba después de los 10 segundos. Tras varias asociaciones de ambos estímulos, el animal comenzaba a cruzar al presentarse la luz (EC), antes de la aparición del EI (*shock*), lo cual se consideró una **respuesta de evitación**; si el animal cruzaba cuando la descarga había comenzado se contabilizaba una **respuesta de escape** y si el animal no cruzaba, ni durante el EC ni durante el EI, se registraba una **no respuesta**. Se registraron también la **latencia de respuesta** (tiempo que el animal tardaba en realizar una respuesta tanto de evitación como de escape); el **número de cruces realizados en el período de adaptación** y también los **cruces en los intervalos entre ensayos** se consideraron un índice de la actividad de los sujetos (Aguilar y cols., 2004; Torras-García y cols., 2003). El número de **bolos fecales** también se tuvo en cuenta tomándose como una medida de emocionalidad (Vinader-Caerols y cols., 1996) (ver Figura 2-3 para todo el Procedimiento).

FÁRMACO

Los animales recibieron tratamiento farmacológico con nicotina [(-)-Nicotine hydrogen di-(+)-tartrate SALT] (SIGMA-Aldrich. Madrid). Las dosis utilizadas fueron de 0,35 mg/kg y 0,175 mg/kg de nicotina en forma de base. El grupo control recibió suero fisiológico. Todas las dosis fueron administradas subcutáneamente (SC) en un volumen de 10 ml/kg, 15 minutos antes de la ejecución de la tarea durante los 5 días de entrenamiento en el condicionamiento

de evitación activa. El pH de la nicotina se ajustó a 7 con hidróxido de sodio (NaOH) (ver Figura 2-2).

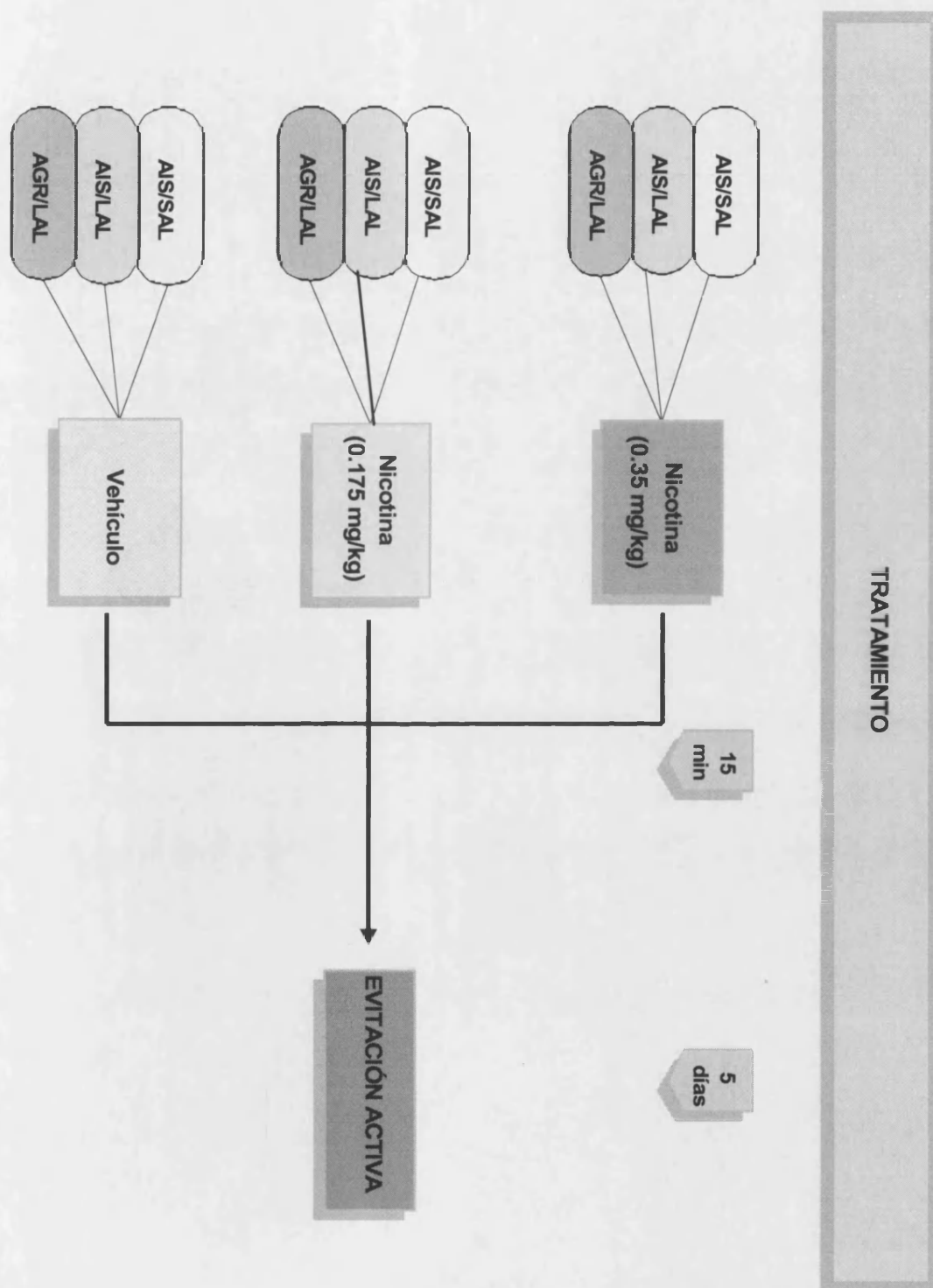


Figura 2-2: Procedimiento de administración del fármaco

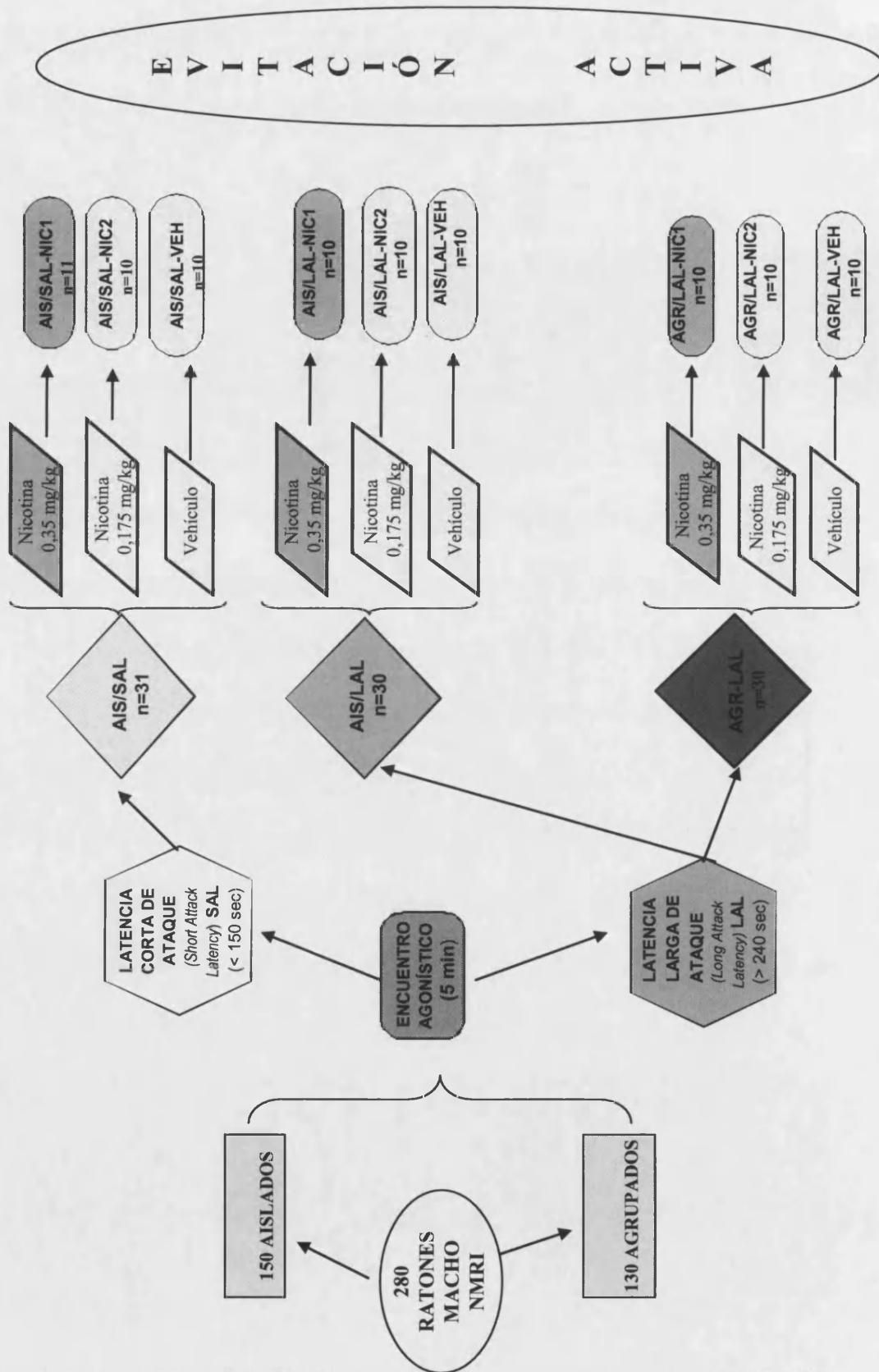


Figura 2-3: Esquema del procedimiento seguido y los grupos experimentales resultantes.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

La complejidad del diseño de este experimento en el que intervienen hasta 4 factores en la adquisición del condicionamiento de evitación activa: (Alojamiento, Tratamiento y Ansiedad como variables entre-sujeto y el factor Día como variable intra-sujeto) hubiera requerido un ANOVA mixto de medidas repetidas tomando en consideración los factores mencionados para cada una de las medidas registradas en este experimento: evitaciones, escapes, no respuestas, latencia de respuesta, nº de cruces en la adaptación, nº de cruces en el ITI y nº de defecaciones.

Además, el mismo tratamiento estadístico fue aplicado a una medida para obtener el porcentaje real de aprendizaje, que calculamos aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Evitaciones} / (\text{evitaciones} + \text{escapes} + \text{cruces en el ITI}) \times 100$$

La medida obtenida corresponde al porcentaje de evitaciones realizadas en la adquisición de la tarea desde el nº total de respuestas posibles (evitaciones + escapes + cruces = 100%) (Vinader-Caerols y cols., 1996).

Debido a que durante el pre-test de agresión no se obtuvo un “n” suficiente de animales agrupados con baja latencia de ataque (al igual que sucedió en nuestro primer experimento), algunas de las comparaciones no podían realizarse. Por esta razón, se emplearon 3 ANOVAs por separado para evaluar la adquisición del condicionamiento de evitación activa:

- 1) ANOVA de medidas repetidas manteniendo el factor Alojamiento constante (únicamente se consideraron los animales aislados): se analizaron los factores Agresividad, Tratamiento y Día. En este caso sólo se tuvieron en cuenta los animales aislados para observar las diferencias que

correspondieran al nivel de agresividad, la administración de nicotina y su posible interacción.

2) ANOVA de medidas repetidas manteniendo el factor Agresividad constante (considerando únicamente los ratones LAL): se tuvieron en cuenta los factores Alojamiento, Tratamiento y Día, únicamente en ratones de larga latencia de ataque para conocer las diferencias entre aislados y agrupados, los efectos del tratamiento de nicotina, así como su posible interacción.

3) Por último, realizamos un ANOVA mixto de medidas repetidas con el factor Grupo como variable entre-sujeto y el factor Día como variable intra-sujeto. Este ANOVA proporcionará información acerca de las diferencias entre los 9 grupos resultantes en el presente experimento.

En los casos necesarios, las comparaciones post-hoc pertinentes se realizaron con la prueba estadística Newman-Keuls o Tukey cuando se trata de variables intra-sujeto y Sidak cuando es el caso de las variables entre-sujeto.

2.2.- RESULTADOS

1) Evitaciones:

* En el primer ANOVA realizado comparando los animales aislados, el factor Agresividad y el factor Tratamiento no resultaron significativos. Sí lo fue el factor Día [F(4,220)=66,98; p<0.001]. Las pruebas post-hoc señalan que los animales aislados fueron realizando cada vez más evitaciones hasta el día 4.

* El segundo ANOVA comparando los LAL no encontramos diferencias entre aislados y agrupados en las evitaciones realizadas, así como tampoco entre los tratamientos. Sí hubo diferencias en las evitaciones según el Día [F(4,216)=78,75; p<0.001] a medida que pasan los días todos los animales aprenden a evitar el choque eléctrico (ver Figura 2-5). Ninguna interacción resultó significativa.

* En el ANOVA comparando los 9 grupos: el factor Grupo no fue significativo pero al realizar comparaciones uno a uno sí se apreciaron diferencias en las evitaciones realizadas por los aislados de baja latencia de ataque tratados con la dosis 1 de nicotina (AIS/SAL-NIC1) y los agrupados de alta latencia de ataque tratados con suero fisiológico (AGR/LAL-VEH) (ver Figura 2-4). El factor Día [F(4,328)=104,72; p<0.001] sí resultó significativo (ver Figura 2-5). Las pruebas post-hoc muestran que en el día 1 los animales realizaron menos evitaciones que en el resto de días. La interacción Grupo x Día no alcanzó la significación estadística.

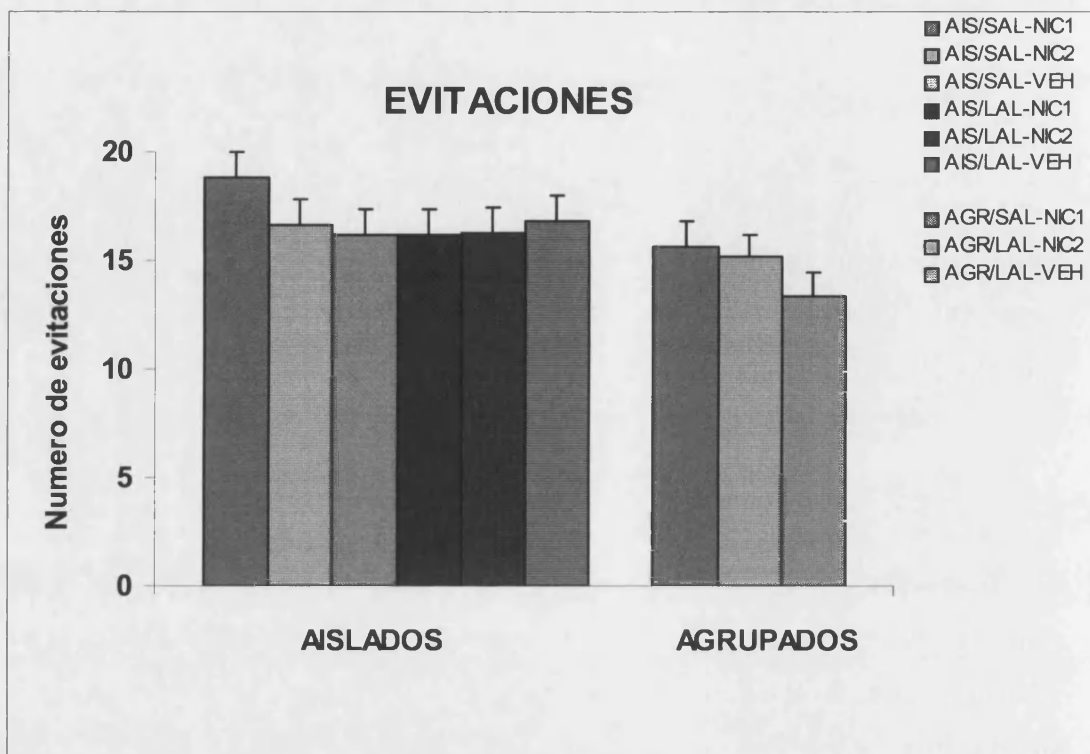


Figura 2-4: Media (\pm SEM) de las EVITACIONES realizadas durante la adquisición del condicionamiento de evitación activa en ratones NMRI que difieren en su condición de alojamiento y en su nivel basal de agresión.

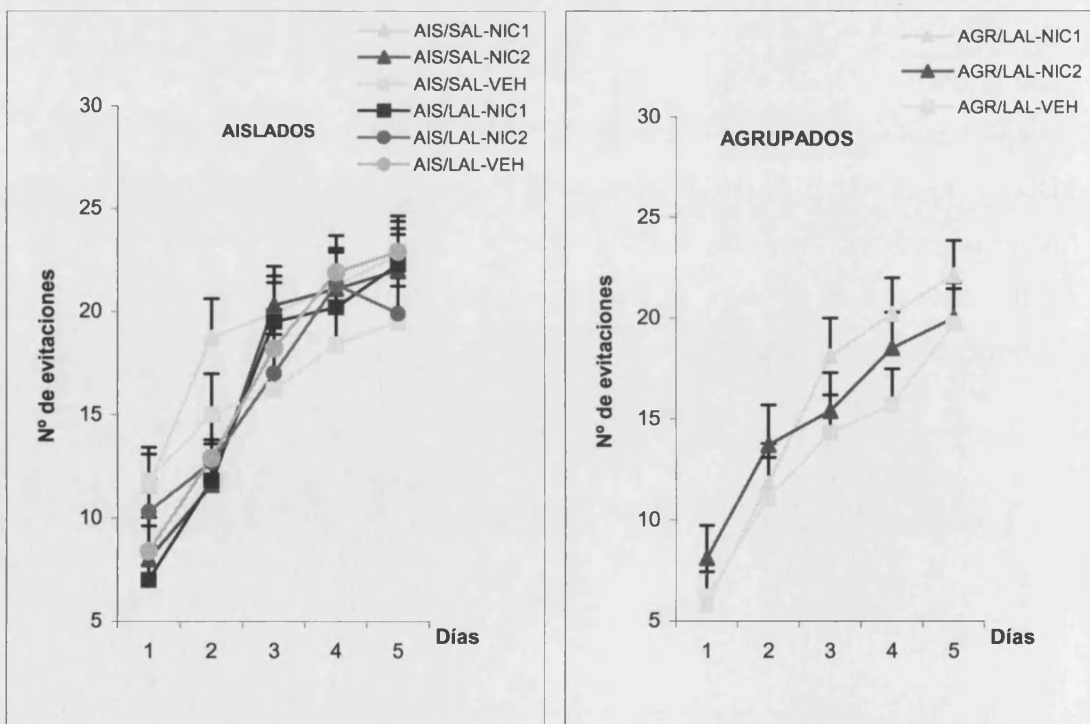


Figura 2-5: EVITACIONES realizadas durante los 5 días de adquisición del condicionamiento de evitación activa por los ratones NMRI aislados y por los agrupados.

2) Escapes:

* El primer ANOVA realizado comparando los animales aislados no señaló diferencias según los niveles de agresividad y tampoco según el tratamiento. Sí las encontramos entre los días [$F(4,220)=19,98$; $p<0.001$]. Las pruebas post-hoc señalan que los animales aislados van realizando menos escapes día a día.

* El segundo ANOVA comparando únicamente los grupos LAL, no mostró ninguna diferencia entre los ratones tratados con nicotina y suero; tampoco lo hizo para aislados y agrupados. Sí hubo diferencias en los escapes según el Día de entrenamiento [$F(4,216)=16,60$; $p<0.001$]. Las pruebas post-hoc nos indicaron que en el día 2 los animales escapan más del shock. A partir de entonces el número va en descenso, ya que aumentaron las evitaciones (ver Figura 2-6).

* El ANOVA para los 9 grupos reveló que el factor Grupo (ver Figura 2-6) no fue significativo. El factor Día [$F(4,328)=24,48$; $p>0,001$] sí lo fue y los análisis post-hoc indican que durante los dos primeros días los animales realizan menos escapes que los posteriores (ver Figura 2-7).

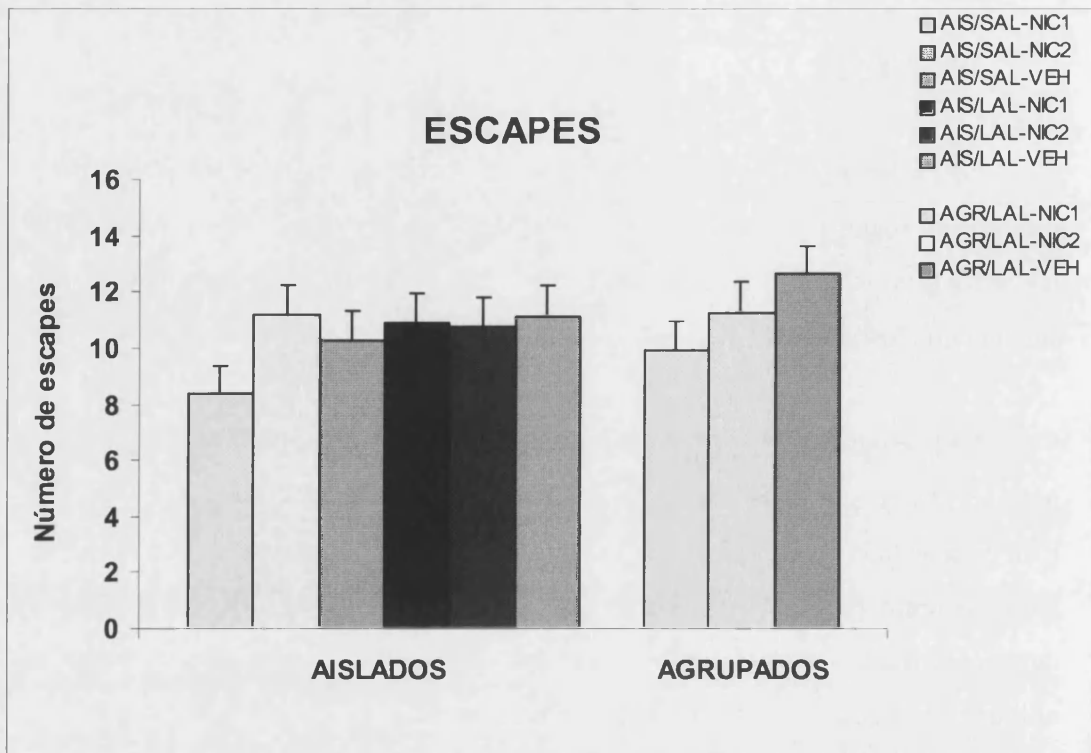


Figura 2-6: Media (\pm SEM) de los ESCAPES realizados en el condicionamiento de evitación activa en ratones NMRI que difieren en su condición de alojamiento y en su nivel basal de agresión.

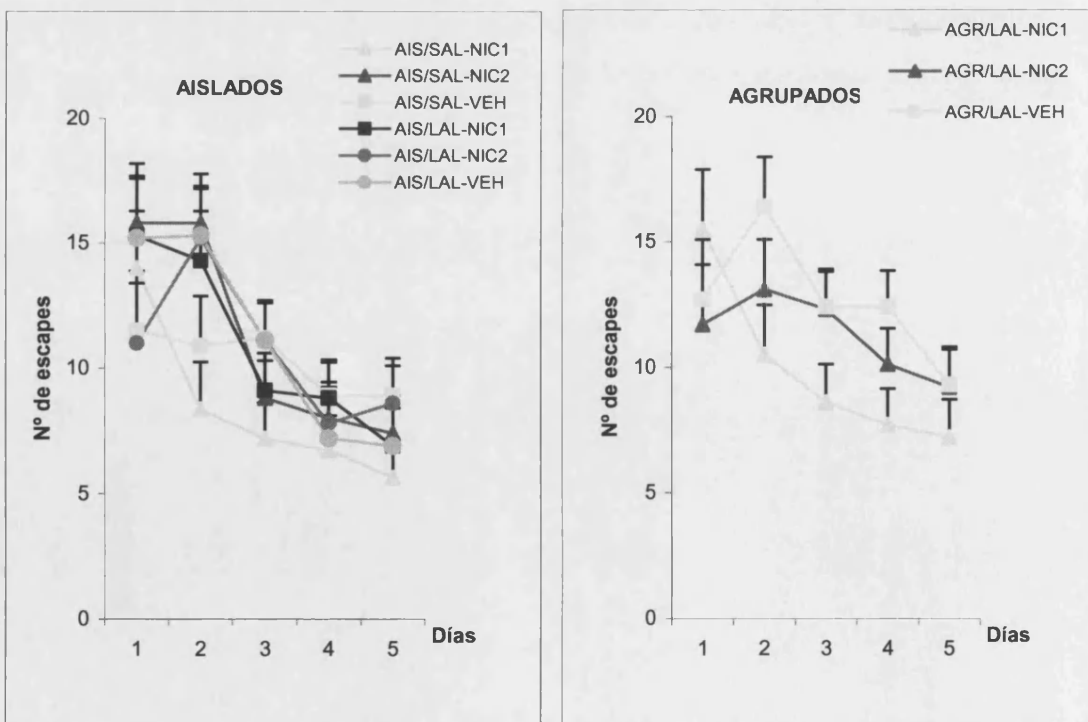


Figura 2-7: ESCAPES realizados durante los 5 días de adquisición del condicionamiento de evitación activa por los ratones NMRI aislados y por los agrupados.

3) No respuestas:

* El ANOVA realizado comparando los animales aislados, no mostró diferencias según los niveles de agresividad ni entre los tratamientos. Sí las halló entre los días [$F(4,220)=46,17$; $p<0.001$]. Las pruebas post-hoc señalan que los animales aislados realizaron más conductas de respuesta activa que conductas de inmovilidad al pasar los días, aunque el descenso más acusado fue del primer día (Media Día 1=6,64) al segundo (Media Día 2=2,90) (ver Figura 2-9).

* El ANOVA comparando los LAL, el factor Alojamiento y el factor Tratamiento no resultaron significativos. Sí hubo diferencias en los escapes según el Día de adquisición [$F(4,216)=44,00$; $p<0.001$]. Las pruebas post-hoc señalaron que en el día 5 hubo una media de casi 9 no respuestas (Media Día 1=8,75) y en cambio el último día respondieron casi los 30 ensayos (Media Día 5=0,83).

*En el ANOVA para los 9 grupos, el factor Grupo no resultó significativo (ver Figura 2-8). Para el factor Día sí se encontraron diferencias significativas [$F(4,328)=60,07$; $p<0.001$] (Figura 2-9). Pruebas post-hoc indicaron que los animales realizaron un mayor número de no respuestas el día 1 que los otros días ($p<0.05$).

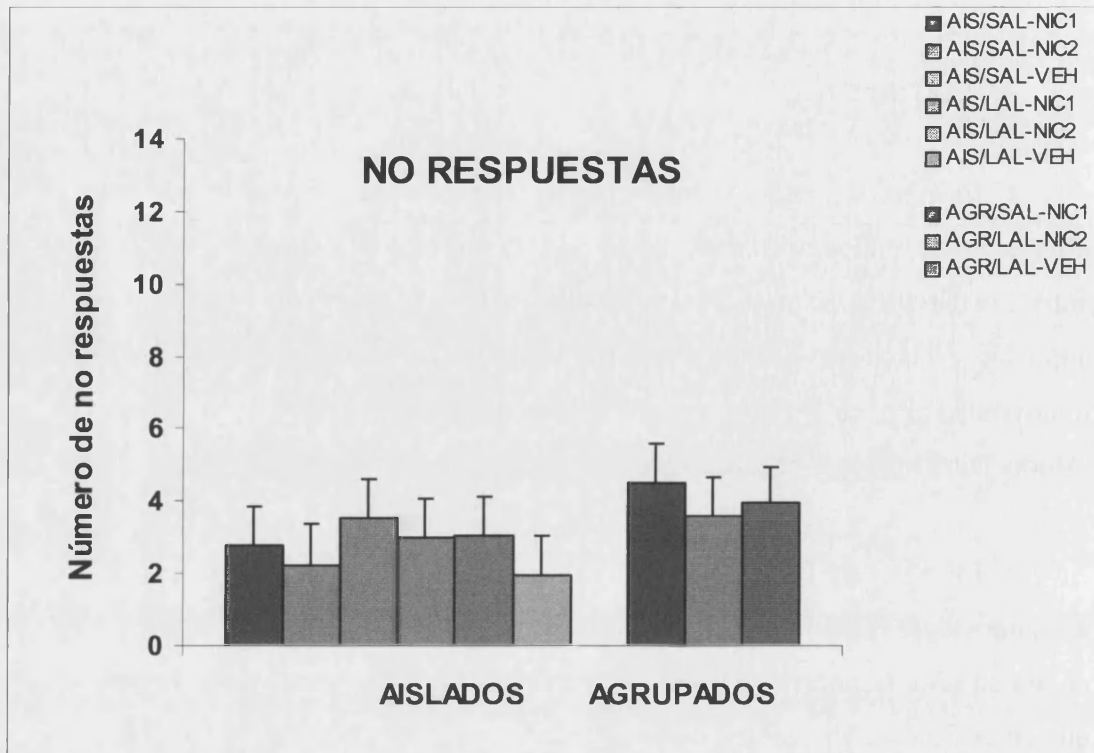


Figura 2-8: Media (\pm SEM) de las NO RESPUESTAS realizadas durante la adquisición del condicionamiento de evitación activa en ratones NMRI que difieren en su condición de alojamiento y en su nivel basal de agresión.

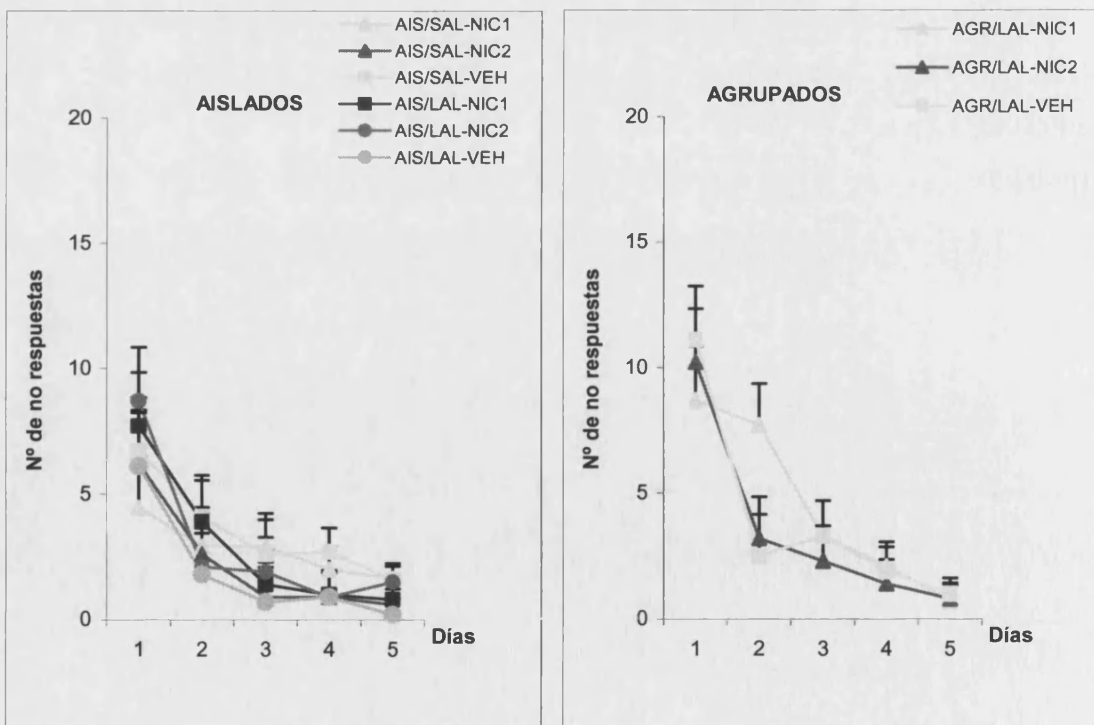


Figura 2-9: NO RESPUESTAS realizadas durante los 5 días de adquisición del condicionamiento de evitación activa por los ratones NMRI aislados y por los agrupados.

4) Latencia de respuesta:

*En el ANOVA realizado comparando los animales aislados, no encontramos diferencias en el tiempo empleado en responder a la prueba en ratones aislados con distinto nivel de agresividad y tampoco debidas al tratamiento farmacológico. Sí las encontramos entre los días [$F(4,220)=86,24$; $p<0.001$]. Las pruebas post-hoc señalan que los animales fueron disminuyendo su latencia de respuesta a lo largo de los días (ver Figura 2-11).

*En el ANOVA comparando los LAL, los animales tratados con ambas dosis de nicotina o con vehículo mostraron latencias de respuesta parecidas. Las diferencias entre ratones aislados y agrupados de baja latencia de ataque no fueron suficientes para alcanzar la significación estadística. El Día de entrenamiento [$F(4,216)=91,48$; $p<0.001$] resultó significativo. Las pruebas post-hoc indicaron que hubo un descenso progresivo del tiempo que los animales tardaron en realizar una conducta de escape o evitación a medida que pasaron los días.

*El ANOVA para los 9 grupos indicó que todos los grupos mostraron latencias de respuesta similares (ver Figura 2-10). El factor Día sí resultó significativo [$F(4,328)=126,62$; $p<0.001$]. Las pruebas post-hoc señalan que la latencia de respuesta fue disminuyendo progresivamente a medida que pasaron los días (ver Figura 2-11).

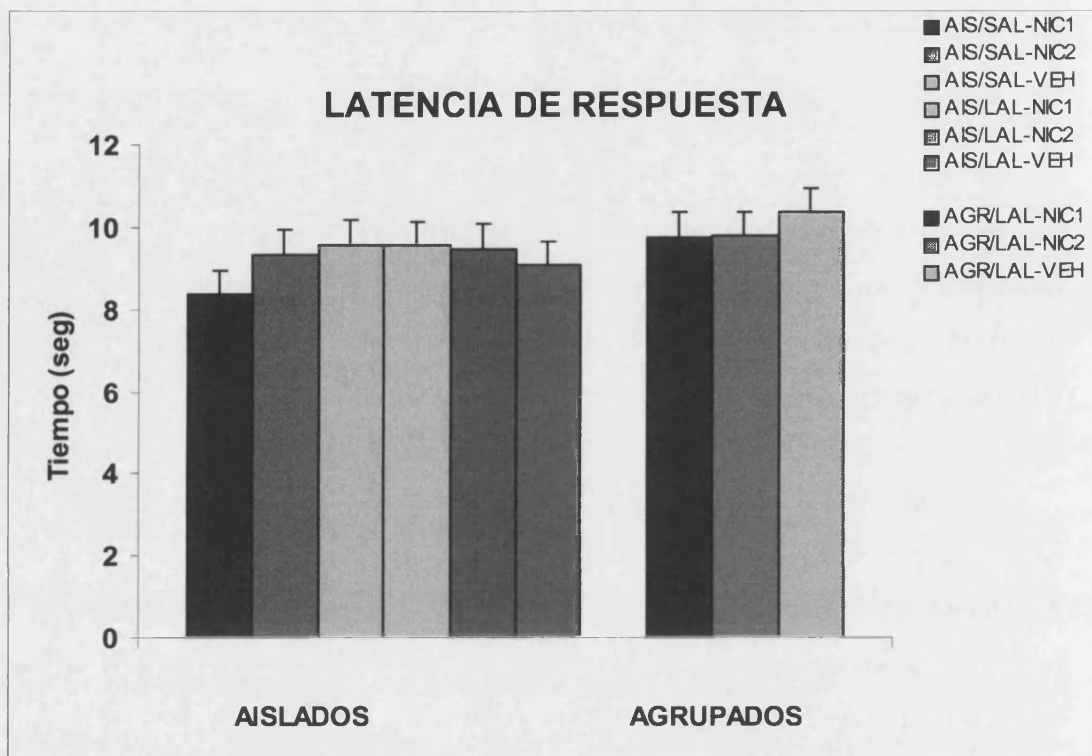


Figura 2-10: Media (\pm SEM) de la LATENCIA DE RESPUESTA durante la adquisición del condicionamiento de evitación activa en ratones NMRI que difieren en su condición de alojamiento y en su nivel basal de agresión

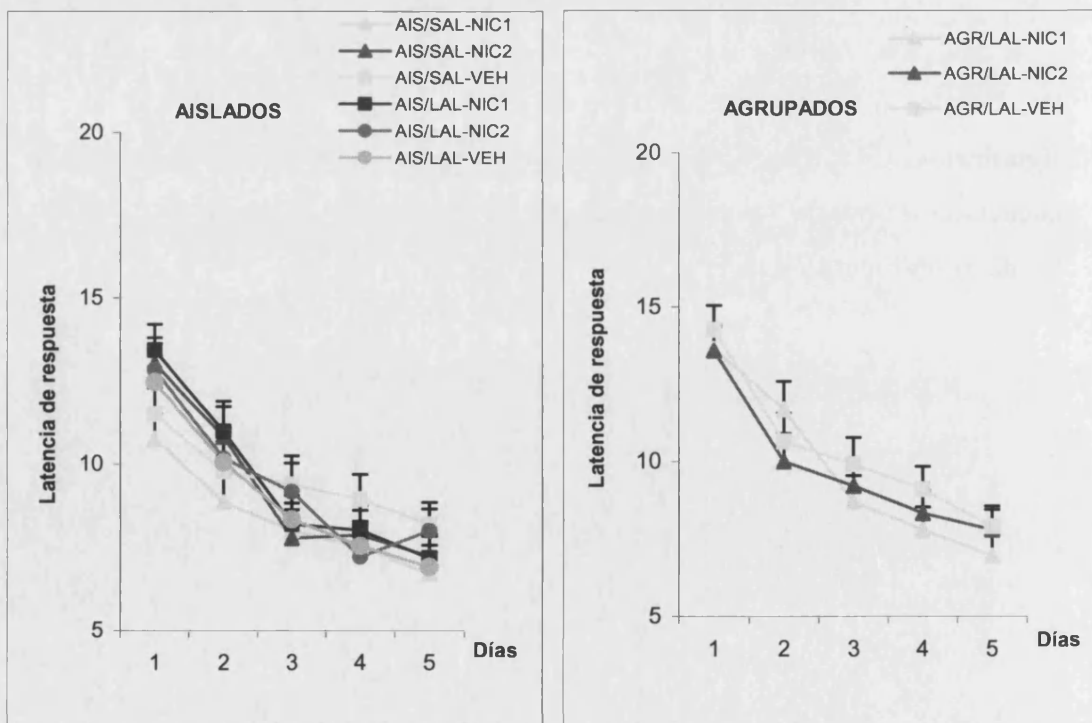


Figura 2-11: LATENCIA DE RESPUESTA durante los 5 días de adquisición del condicionamiento de evitación activa por los ratones NMRI aislados y por los agrupados.

5) Cruces en la adaptación:

* El primer ANOVA realizado comparando los animales aislados señaló que el factor Agresividad resultó significativo [$F(2,55)=10,37$; $p<0.05$]; las diferencias señalan un mayor número de cruces de los animales de baja latencia (Media SAL=20,46) en comparación con los de larga (Media LAL=17,58). La interacción Tratamiento x Agresión también resultó significativa [$F(2,55)=4,27$; $p<0.02$]. Pruebas post-hoc señalan diferencias en la condición Nicotina 1: los animales de corta latencia de ataque realizaron más cruces que los de larga latencia de ataque. También los días se diferenciaron entre ellos [$F(4,220)=32,30$; $p<0.001$]. Las comparaciones a posteriori señalaron que los aislados fueron disminuyendo progresivamente el número de cruces hasta el penúltimo día (ver Figura 2-13).

*En el segundo ANOVA comparando los LAL, los animales tratados con nicotina (ambas dosis) o con vehículo mostraron un número de cruces similar. Entre ratones aislados y agrupados el ANOVA sí señaló diferencias [$F(1,54)=4,02$; $p<0.05$]. Los aislados (Media=17,58) realizaron más cruces que los agrupados (Media=15,35). También encontramos diferencias según el Día [$F(4,216)=21,77$; $p<0.001$]; los animales cruzaron progresivamente más veces desde el primer día (Media Día 1=11,68) hasta el cuarto (Media Día 4=18,98).

*El ANOVA para los 9 grupos mostró que el factor Grupo resultó significativo [$F(8,82)=4,56$; $p<0.001$]. Las pruebas post-hoc de Newman –Keuls indican que los animales del grupo AIS/SAL-NIC1 realizaron significativamente un mayor número de cruces que los animales de los grupos AIS/LAL-NIC1, AGR/LAL-NIC1, AGR/LAL-NIC2 y AGR/LAL-VEH (ver Figura 2-12). El factor Día [$F(4,328)=39,04$; $p<0.001$] también resultó significativo; las pruebas a posteriori señalaron que el primer día los animales cruzaron menos veces que el resto de los días, aunque a partir del segundo día ya no se apreciaron diferencias (ver Figura 2-13).

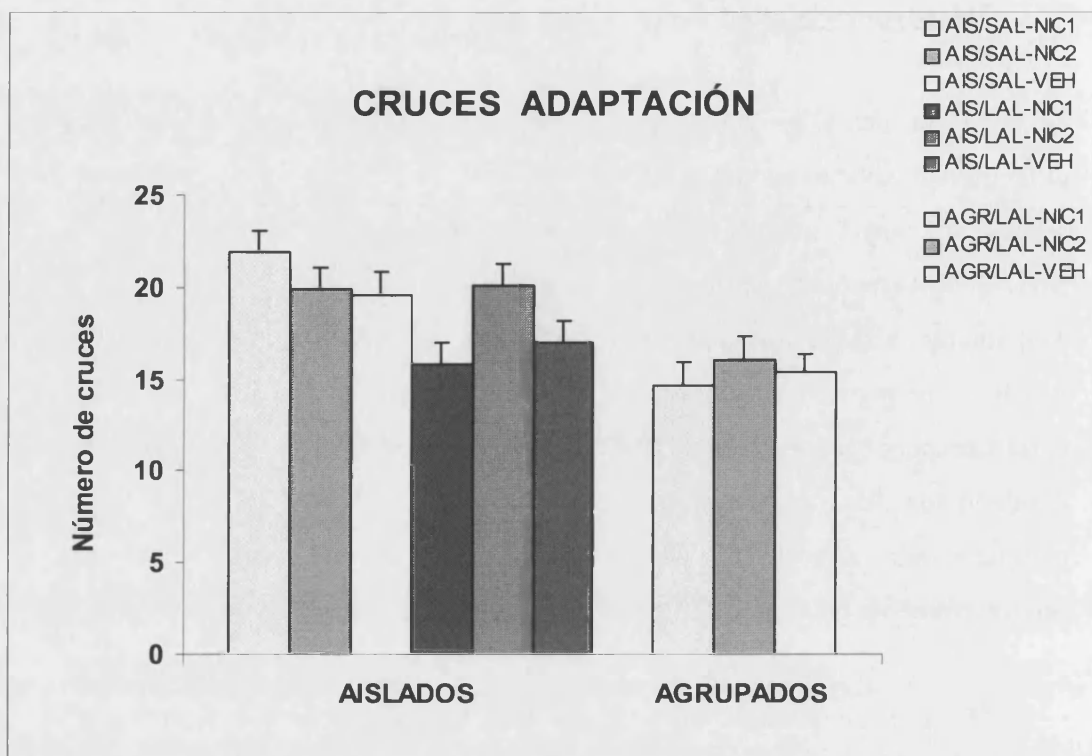


Figura 2-12: Media (\pm SEM) los CRUCES DURANTE LA ADAPTACIÓN realizados durante la adquisición del condicionamiento de evitación activa en ratones NMRI que difieren en su condición de alojamiento y en su nivel basal de agresión.

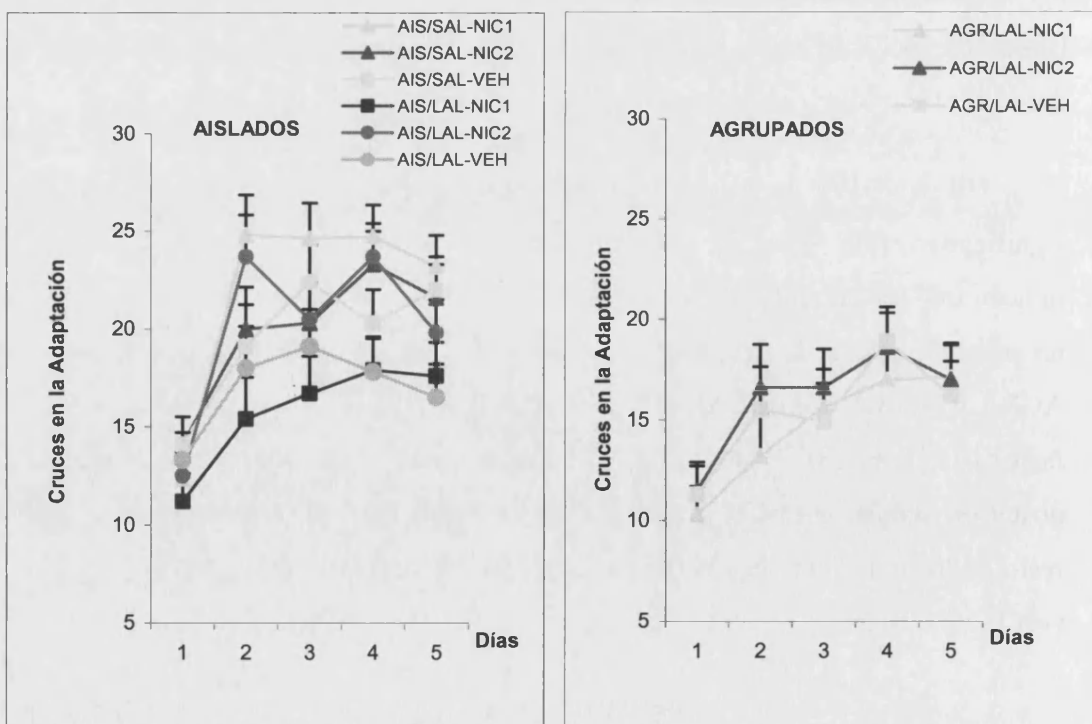


Figura 2-13: CRUCES EN LA ADAPTACIÓN durante los 5 días de adquisición del condicionamiento de evitación activa por los ratones NMRI aislados y por los agrupados.

6) Cruces ITI:

* El ANOVA realizado comparando los animales aislados indicó que el factor Agresividad fue significativo [$F(2,55)=7,91$; $p<0.05$]: los animales SAL (Media SAL=43,78) cruzaron más que los LAL (Media LAL=32,73). La interacción Tratamiento x Agresión también resultó significativa [$F(2,55)=3,98$; $p<0.05$]. Las pruebas post-hoc señalan diferencias en la condición Nicotina 1: los animales de corta latencia de ataque (SAL) realizaron más cruces que los de larga latencia de ataque (LAL). También el factor Día resultó significativo [$F(4,220)=8,74$; $p<0.001$], el número de cruces fue aumentando progresivamente (Media Día 1=30,57) hasta el último día de entrenamiento (Media Día 5=43,97) (ver Figura 2-5).

*El ANOVA comparando los LAL no señaló diferencias entre los tres tratamientos. Entre ratones aislados y agrupados de baja latencia de ataque, el ANOVA señaló diferencias [$F(1,54)=5,85$; $p<0.02$]. Los aislados (Media=37,73) realizaron más cruces que los agrupados (Media=26,64). También encontramos diferencias según el Día [$F(4,216)=21,77$; $p<0.001$]: los animales realizaron progresivamente más cruces desde el día 1 (Media Día 1=26,25) hasta el cuarto día (Media Día 4= 32,11).

*En el ANOVA para los 9 grupos el factor Grupo resultó significativo [$F(8,82)=5,40$; $p<0.001$]. Las pruebas post-hoc de Newman-Keuls indicaron que los animales de los grupos AIS/SAL-NIC1 y AIS/SAL-VEH realizaron significativamente un mayor número de cruces que los animales de los grupos AIS/LAL-NIC1, AGR/LAL-NIC1, AGR/LAL-NIC2 y AGR/LAL-VEH (ver Figura 2-14) El factor Día [$F(4,328)=12,36$; $p<0.001$] también resultó significativo; las pruebas a posteriori señalaron que los animales van cruzando progresivamente más veces entre ensayos con el paso del tiempo (ver Figura 2-15).

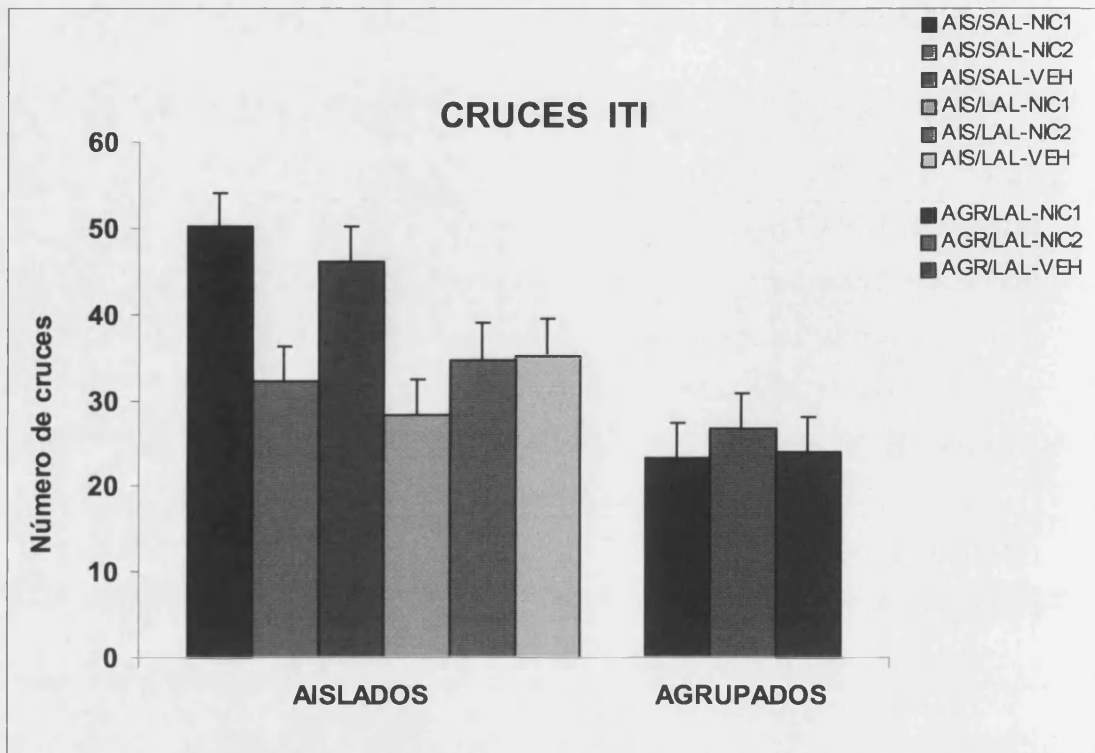


Figura 2-14: Media (\pm SEM) de los CRUCES en el ITI realizados durante la adquisición del condicionamiento de evitación activa por ratones NMRI que difieren en su condición de alojamiento y en su nivel basal de agresión.

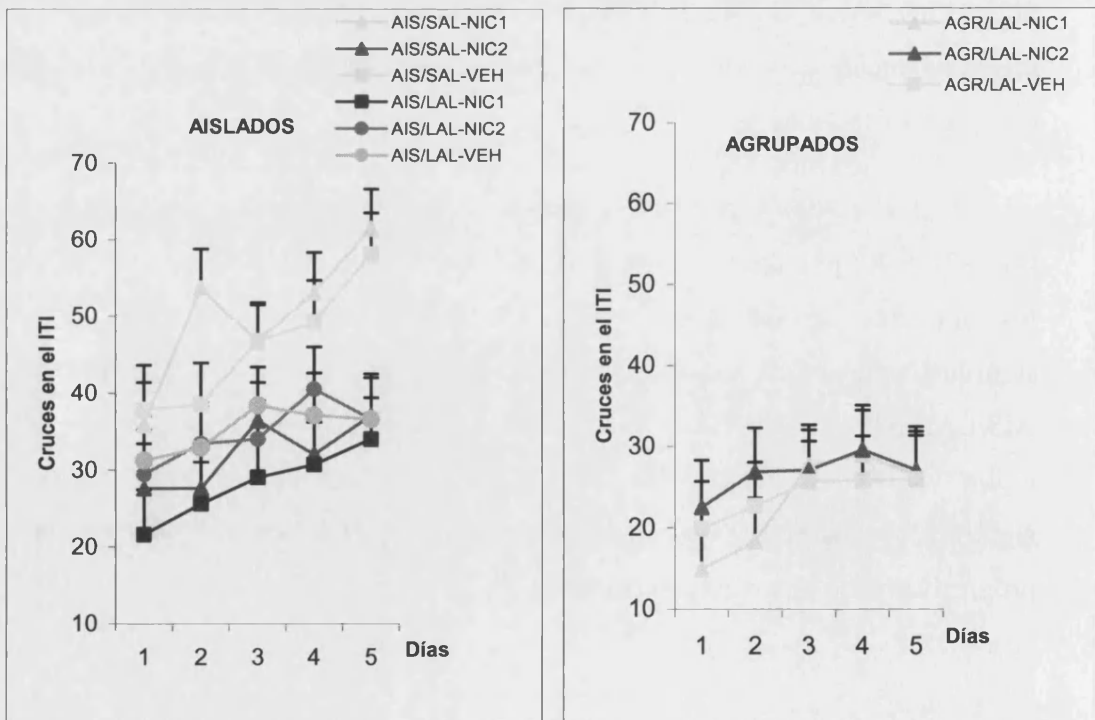


Figura 2-15: CRUCES en el ITI durante los 5 días de adquisición del condicionamiento de evitación activa por los ratones NMRI aislados y por los agrupados.

7) Defecaciones:

* El ANOVA comparando los animales aislados indicó que todos los animales aislados mostraron un número de defecaciones similar (ver Figura 2-16).

*El ANOVA comparando únicamente los LAL, no señaló diferencias en las defecaciones, en el Tratamiento ni en el factor Agresividad; sí las hubo en el factor Día [$F(4,216)=3,96$; $p<0.05$]; las pruebas post-hoc señalaron que el primer día los animales se mostraron más emocionales que el resto de los días.

*El ANOVA para los 9 grupos no mostró diferencias en esta medida (ver Figura 2-16). El factor Día en cambio resultó significativo [$F(4,328)=2,54$; $p<0.05$]. Sin embargo, las pruebas post-hoc no señalaron ninguna diferencia entre los días (ver Figura 2-17).

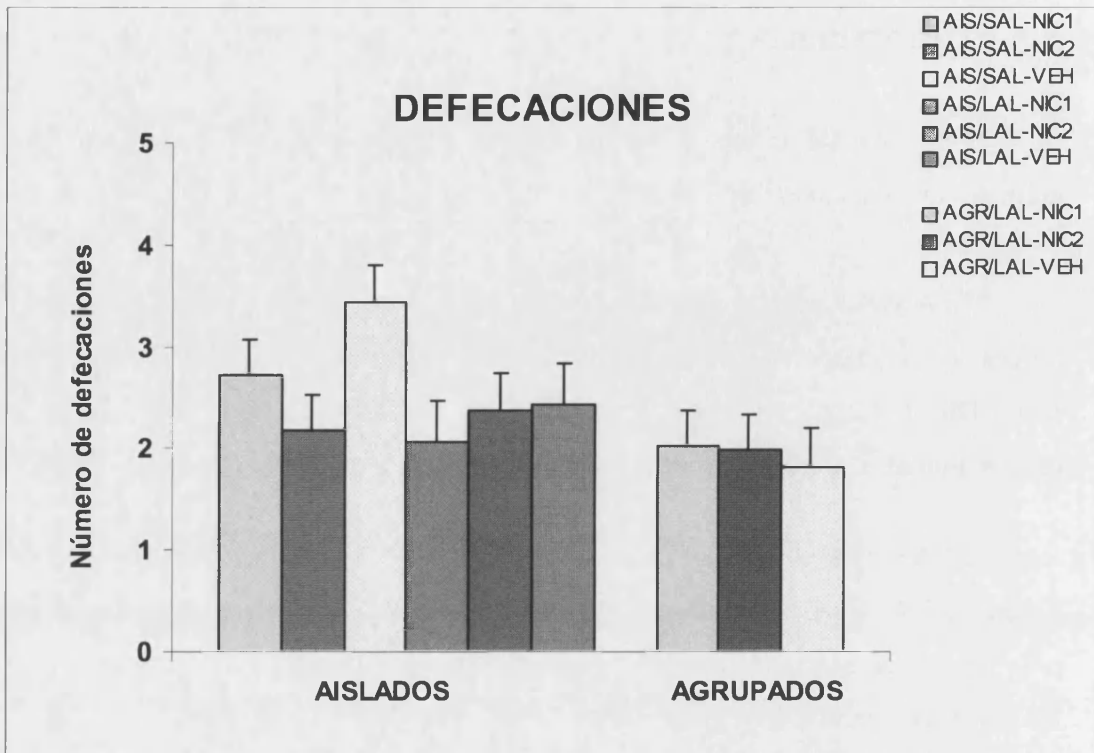


Figura 2-16: Media (\pm SEM) de las DEFECACIONES durante la adquisición del condicionamiento de evitación activa en ratones NMRI que difieren en su condición de alojamiento y en su nivel basal de agresión.

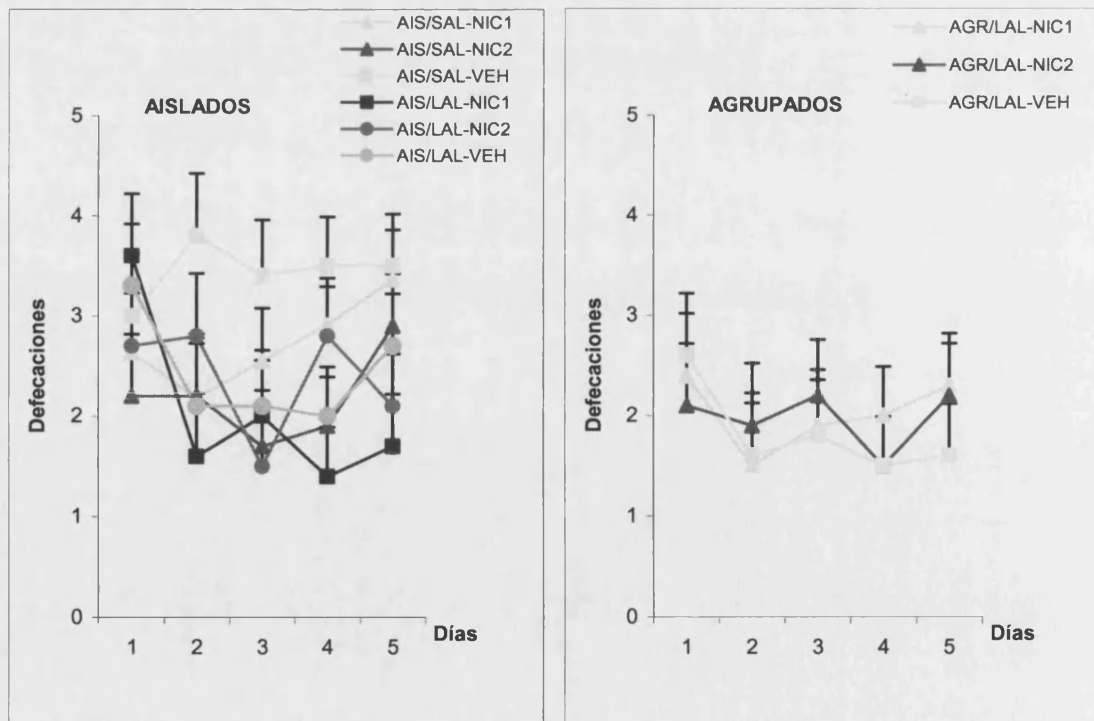


Figura 2-17: DEFECACIONES durante los 5 días de adquisición del condicionamiento de evitación activa por los ratones NMRI aislados y por los agrupados.

8) **Fórmula de aprendizaje:** como hemos indicado previamente este dato es el resultado de la siguiente fórmula para obtener una medida ponderada del aprendizaje real:

$$\text{Evitaciones} / (\text{evitaciones} + \text{escapes} + \text{cruces en el ITI}) \times 100$$

*El ANOVA comparando los animales aislados, señaló que para el factor Día [F(4,220)=45,56; p<0.001] había diferencias significativas. Las comparaciones post-hoc señalaron que la progresión del aprendizaje fue incrementándose hasta el tercer día (ver Figura 2-19).

La interacción Día x Agresividad [F(4,220)=4,66; p<0.002] fue significativa también; las pruebas post-hoc mostraron que el día 4 (p<0.05) y el día 5 (p<0.01) hubo diferencias en la tasa de aprendizaje entre ratones SAL y LAL, mostrando los LAL un mayor aprendizaje.

La interacción Día x Agresividad x Tratamiento [F(8,220)=2,99; p<0.05] alcanzó la significación estadística. Los análisis por separado para cada tratamiento señalaron que:

- ✓ En la 'Condición Nicotina 0,35mg/kg' los ratones de larga latencia de ataque (Media LAL=39,16%) se diferenciaron significativamente de los de corta latencia (Media SAL=25,74%) únicamente el último día del test
- ✓ En la 'Condición Nicotina 0,175 mg/kg' no hubo diferencias entre ratones SAL y LAL ninguno de los 5 días de entrenamiento.
- ✓ En la 'Condición Vehículo' los ratones LAL mostraron significativamente mayor tasa de aprendizaje que los SAL en el día 4 (Media LAL=35,83%; Media SAL=24,19%) y en el día 5 (Media LAL=36,89%; Media SAL=22,69%) (ver Figura 2-18).

*El segundo ANOVA comparando los LAL indicó que el tratamiento y la agresividad no resultaron significativos; sí lo fue el factor Día [$F(4,216)=50,48$; $p<0.001$]; las pruebas post-hoc señalaron que cada día los animales tuvieron una tasa de aprendizaje mayor que el día anterior.

*El ANOVA para los 9 grupos no mostró que hubiera diferencias entre los grupos en esta medida (ver Figura 2-18). El factor Día resultó significativo [$F(4,328)=65,76$; $p<0.001$] así como la interacción Grupo x Día [$F(32,328)=1,76$; $p<0.01$]. Las pruebas post-hoc indicaron que los animales fueron aprendiendo un progresivamente hasta el día 4. Las pruebas post-hoc respecto a la interacción señalaron diferencias entre los grupos el último día: el grupo AGR/LAL-NIC1 (Media=42,14%) obtuvo una tasa de aprendizaje significativamente mayor que el grupo AIS/SAL-VEH (Media=22,69%) (ver Figura 2-19).

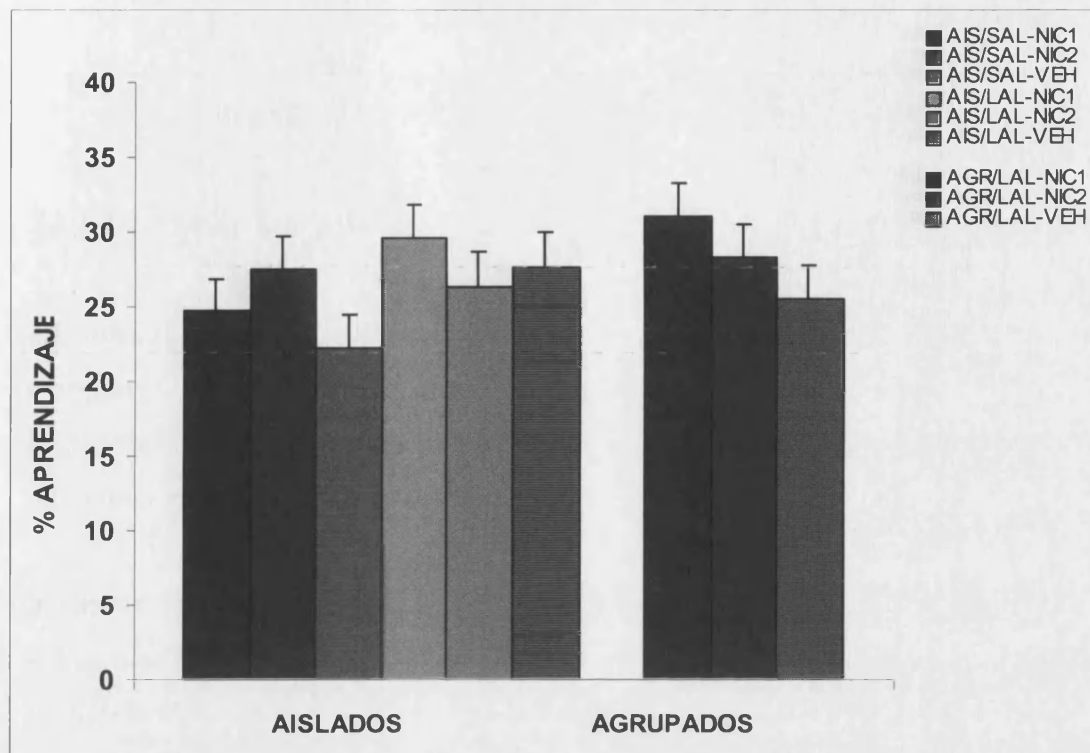


Figura 2-18: Media (\pm SEM) del % de APRENDIZAJE logrado por los ratones NMRI que difieren en su condición de alojamiento y en su nivel basal de agresión. El % de aprendizaje es el resultado de la siguiente fórmula: $[\text{n}^\circ \text{ de evitaciones} / (\text{n}^\circ \text{ evitaciones} + \text{n}^\circ \text{ de escapes} + \text{n}^\circ \text{ cruces ITI}) \times 100]$.

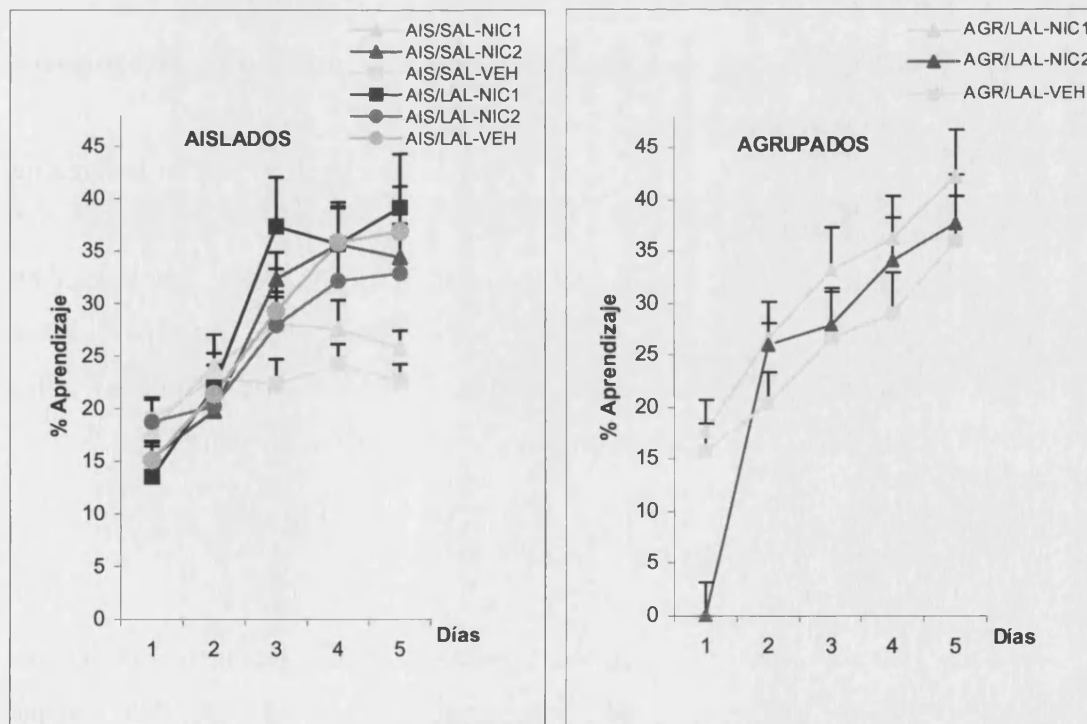


Figura 2-19: Evolución del APRENDIZAJE durante los 5 días de adquisición del condicionamiento de evitación activa por los ratones NMRI aislados y agrupados.

RESUMEN DE LOS RESULTADOS (ver Tabla 2-2).

1) Comparación entre ratones aislados SAL y LAL (ver Tabla 2-3):

- ✓ Los ratones SAL realizaron más cruces que los animales LAL tanto en el período de adaptación como en el ITI.
- ✓ Al analizar el aprendizaje real para cada condición de tratamiento, los ratones LAL mostraron mejor aprendizaje que los SAL: en el grupo control esta diferencia fue significativa el cuarto y quinto día; y en el grupo tratado con la dosis más alta de nicotina únicamente el quinto día de entrenamiento.
- ✓ La medida de aprendizaje real, las evitaciones, los cruces en adaptación y los cruces en el ITI fueron aumentando con el paso de los días. En cambio, los escapes, no respuestas y la latencia de respuesta disminuyeron con el entrenamiento en la tarea.

2) Comparación entre ratones LAL aislados y agrupados (ver Tabla 2-4):

- ✓ Los animales aislados realizaron más cruces que los agrupados durante el período de adaptación y durante el ITI.
- ✓ El factor Tratamiento no tuvo efectos significativos en la tarea de evitación activa.
- ✓ La medida del aprendizaje real, las evitaciones, los cruces en adaptación y los cruces en el ITI fueron aumentando con el paso de los días. Los escapes, no respuestas, la latencia de respuesta y las defecaciones disminuyeron con el entrenamiento en la tarea.

3) Comparación entre los 9 grupos (ver Tabla 2-5):

- ✓ El grupo AIS/SAL-NIC1 realizó significativamente más cruces durante el período de adaptación que el grupo AIS/LAL-NIC1 y que todos los agrupados (de los 3 tratamientos).

- ✓ Los grupos de AIS/SAL-NIC y VEH realizaron significativamente un mayor número de cruces en el ITI que los AIS/LAL-NIC1 y que los tres grupos de ratones agrupados.
- ✓ Con el paso de los días fueron en aumento la medida de aprendizaje real, las evitaciones y los cruces tanto en la adaptación como entre ensayos. Disminuyeron los escapes, las no respuestas, la latencia de respuesta y las defecaciones.
- ✓ El grupo AGR/LAL-NIC1 (Media=42,14%) adquirió la tarea de condicionamiento de evitación activa significativamente mejor que el grupo AIS/SAL-NIC1 (Media=22,69%)

TABLA 2-2 : Efectos diferenciales del Alojamiento (AISLADO O AGRUPADO), del nivel de Agresividad (SAL o LAL) y del Tratamiento (NICOTINA 0.35 mg/kg, NICOTINA 0,175 mg/kg o VEHÍCULO) en el condicionamiento de evitación activa en ratones macho NMRI.

GRUPOS	Aislados						Agrupados		
	AIS/SAL-NIC1	AIS/SAL-NIC2	AIS/SAL-VEH	AIS/LAL-NIC1	AIS/LAL-NIC2	AIS/LAL-VEH	AGR/LAL-NIC1	AGR/LAL-NIC2	AGR/LAL-VEH
Medidas									
% Aprendizaje	24,69 ± 2,15	27,51 ± 2,25	22,22 ± 2,25	29,54 ± 2,25	26,38 ± 2,25	27,69 ± 2,25	31,08 ± 2,25	28,25 ± 2,25	25,50 ± 2,25
Evitaciones	18,84 ± 1,13	16,60 ± 1,18	16,18 ± 1,18	16,16 ± 1,18	16,24 ± 1,18	16,86 ± 1,18	15,60 ± 1,18	15,14 ± 1,18	13,40 ± 1,18
Escapes	8,38 ± 1,01	11,16 ± 1,06	10,28 ± 1,06	10,88 ± 1,06	10,74 ± 1,06	11,14 ± 1,06	9,90 ± 1,06	11,28 ± 1,06	12,64 ± 1,06
No respuestas	2,78 ± 1,05	2,24 ± 1,10	3,54 ± 1,10	2,96 ± 1,10	3,02 ± 1,10	1,94 ± 1,10	4,50 ± 1,10	3,58 ± 1,10	3,96 ± 1,10
Latencia de Respuesta	8,37 ± 0,57	9,34 ± 0,60	9,56 ± 0,60	9,56 ± 0,60	9,48 ± 0,60	9,06 ± 0,60	9,75 ± 0,60	9,78 ± 0,60	10,36 ± 0,60
Cruces Adaptación	21,95 ± 1,17	19,86 ± 1,23	19,58 ± 1,23	15,76 ± 1,23	20,04 ± 1,23	16,94 ± 1,23	14,64 ± 1,23	16,06 ± 1,23	15,36 ± 1,23
Cruces ITI	50,15 ± 3,94	32,14 ± 4,14	46,08 ± 4,14	28,18 ± 4,14	34,78 ± 4,17	35,24 ± 4,14	23,28 ± 4,14	26,64 ± 4,14	24,02 ± 4,14
Defecaciones	2,73 ± 0,34	2,18 ± 0,36	3,44 ± 0,36	2,06 ± 0,36	2,38 ± 0,36	2,44 ± 0,36	2,02 ± 0,36	1,98 ± 0,36	1,82 ± 0,36
Peso	41,14 ± 1,04	42,25 ± 1,10	42,77 ± 1,10	41,06 ± 1,10	40,50 ± 1,10	39,58 ± 1,10	41,59 ± 1,10	41,07 ± 1,10	40,67 ± 1,10

Los datos se presentan como los valores de la MEDIA ± SEM (error estándar de la media). La medida presentada como el % de aprendizaje corresponde al resultado de la siguiente operación: [(nº de evitaciones / (nº de evitaciones + nº de escapes + nº cruces ITI) x 100]

TABLA 2-3: Efectos de la Agresividad (SAL/ LAL), el Tratamiento (NICOTINA 0,35y 0,175 mg/kg y VEHÍCULO) y de su interacción en el condicionamiento en ratones macho NMRI AISLADOS. La medida presentada como % de aprendizaje corresponde al resultado de la siguiente operación: [n° evitaciones / (n° de evitaciones + n° de escapes + n° cruces ITI) x 100].

FACTORES	Factores entre-sujeto		Factores intra-sujeto				
	AGRESIVIDAD (A) F (1, 55)	TRATAMIENTO (T) F (2, 55)	A x T F (2, 55)	DIA F (4, 220)	D x A F (4, 220)	D x T F (8, 220)	D x A x T F (8, 220)
Medidas							
%Aprendizaje	3,41 (NS)	0,69 (NS)	1,59 (NS)	45,56 (.001)	4,66 (.002)	1,25 (NS)	2,99 (.005)
Evitaciones	1,13 (NS)	0,88 (NS)	1,83 (NS)	66,98 (.001)	1,40 (NS)	0,75 (NS)	1,91 (NS)
Escapes	2,55 (NS)	1,77 (NS)	1,91 (NS)	19,98 (.001)	1,07 (NS)	1,07 (NS)	1,33 (NS)
No respuestas	0,10 (NS)	0,43 (NS)	1,10 (NS)	46,17 (.001)	2,64 (.05)	0,81 (NS)	0,73 (NS)
Latencia de Respuesta	0,49 (NS)	0,48 (NS)	1,59 (NS)	86,24 (.001)	2,05 (NS)	0,88 (NS)	1,75 (NS)
Cruces Adaptación	10,37 (.005)	1,20 (NS)	4,27 (.02)	32,30 (.001)	1,00 (NS)	1,27 (NS)	1,60 (NS)
Cruces ITI	7,91 (.01)	1,48 (NS)	3,98 (.05)	8,74 (.001)	1,21 (NS)	0,73 (NS)	0,76 (NS)
Defecaciones	2,30 (NS)	1,58 (NS)	1,21 (NS)	1,70 (NS)	2,29 (NS)	0,68 (NS)	0,95 (NS)

TABLA 2-4: Efectos del Alojamiento (AISLADO/AGRUPADO), del Tratamiento (NICOTINA 0,35 y 0,175 mg/kg y VEHÍCULO) , y de su interacción en el condicionamiento de evitación activa en ratones NMRI clasificados como LAL. La medida presentada como % de aprendizaje corresponde al resultado de la siguiente operación: $[\text{n}^\circ \text{ de evitaciones} / (\text{n}^\circ \text{ evitaciones} + \text{n}^\circ \text{ de escapes} + \text{n}^\circ \text{ cruces ITI}) \times 100]$

FACTORES

	Factores entre-sujeto		Factores intra-sujeto				
	ALOJAMIENTO (H) F (1, 54)	TRATAMIENTO (T) F (2, 54)	H x T F (2, 54)	DIA F (4, 216)	D x H F (4, 216)	D x T F (8, 216)	D x H x T F (8, 216)
Medidas							
% Aprendizaje	0,03 (NS)	1,18 (NS)	0,38 (NS)	50,48 (.001)	0,91 (NS)	0,77 (NS)	0,50 (NS)
Evitaciones	2,76 (NS)	1,19 (NS)	0,75 (NS)	78,75 (.001)	0,71 (NS)	1,25 (NS)	0,28 (NS)
Escapes	0,13 (NS)	0,83 (NS)	0,57 (NS)	16,60 (.001)	1,19 (NS)	1,61 (NS)	0,64 (NS)
No respuestas	2,00 (NS)	0,21 (NS)	0,19 (NS)	44,00 (.001)	1,00 (NS)	1,33 (NS)	0,60 (NS)
Latencia de Respuesta	1,33 (NS)	0,01 (NS)	0,46 (NS)	91,48 (.001)	0,37 (NS)	1,16 (NS)	0,32 (NS)
Cruces Adaptación	4,02 (.05)	2,28 (NS)	0,63 (NS)	21,77 (.001)	1,03 (NS)	1,18 (NS)	0,64 (NS)
Cruces ITI	5,85 (.02)	0,81 (NS)	0,29 (NS)	6,84 (.001)	0,08(NS)	0,56 (NS)	0,26 (NS)
Defecaciones	1,54 (NS)	0,83 (NS)	0,35 (NS)	3,96 (.05)	0,85 (NS)	0,72 (NS)	1,00 (NS)

TABLA 2-5 : Resumen de los resultados de los análisis estadísticos para los 9 grupos en la prueba de condicionamiento de evitación activa en ratones macho NMRI clasificados según su nivel de Agresión.. La medida presentada como el % de aprendizaje corresponde al resultado de la siguiente operación: [nº evitaciones / (nº de evitaciones + nº de escapes + nº cruces ITI) x 100].

FACTORES	Entre-sujetos	Intra-sujetos	
	GRUPO F (8, 82)	DÍA F (4, 328)	GRUPO x DÍA F (32, 328)
Medidas			
% Aprendizaje	1,39 (NS)	65,76 (.001)	1,76 (.01)
Evitaciones	1,57 (NS)	104,72 (.001)	1,11(NS)
Escapes	1,26 (NS)	24,48 (.01)	1,22 (NS)
No respuestas	0,55 (NS)	60,07 (.001)	1,37 (NS)
Latencia de Respuesta	0,86 (NS)	1,26 (.001)	1,21 (NS)
Cruces Adaptación	4,56 (.001)	42,57 (.001)	1,20 (NS)
Cruces ITI	5,40 (.001)	12,36 (.001)	0,84 (NS)
Defecaciones	1,96 (NS)	2,54 (.05)	0,90 (NS)

2.3.- DISCUSIÓN

Efectos de las condiciones de alojamiento, el nivel de agresividad y la administración de nicotina en la adquisición del condicionamiento de evitación activa.

El aprendizaje de evitación es una forma relativamente compleja de aprendizaje (Heyser y cols., 1999) que podría verse influida por las condiciones ambientales (Essman, 1971). Se ha demostrado que los ratones aislados muestran generalmente un incremento de la reactividad conductual a lo que normalmente sería una estimulación moderada y no amenazante (Gendreau y cols., 2000). Se podría sugerir que en la tarea de evitación activa ello implicaría que los ratones reaccionaran de forma más contundente a la presentación del *shock*. En el presente experimento, sin embargo, no existieron diferencias significativas entre ratones aislados y agrupados en el número de evitaciones que ejecutaron durante la tarea de evitación activa. Sin embargo, observamos que cuando aplicamos la fórmula de *aprendizaje real*, la diferencia que resultó más significativa fue que uno de los grupos de ratones mantenidos en la condición de agrupado mostró un mejor índice de aprendizaje al final de las sesiones de entrenamiento (día 5) que los ratones aislados. Esta facilitación de la evitación observada en el grupo AGR/LAL-NIC1, en comparación con uno de los grupos de ratones que habían permanecido alojados individualmente (AIS/SAL-VEH), no parece estar directamente relacionada con cambios en la actividad motora dado que no se obtuvieron diferencias entre estos dos grupos en las medidas indirectas de locomoción registradas durante el condicionamiento en la *shuttle-box* (cruces durante los ITI y cruces durante el periodo de adaptación).

Los resultados obtenidos en nuestro estudio están de acuerdo con investigaciones previas sobre los efectos del aislamiento social en ratones en otras tareas de aprendizaje como el laberinto de agua (Couderau y cols., 1997b; Schrijver y cols., 2002) en los cuales no se observaron diferencias claras respecto

a la tasa de adquisición de la tarea entre ratones aislados y agrupados. Los hallazgos actuales, sin embargo, contrastan con la mejora del aprendizaje espacial en ratas (tanto en el aprendizaje de lugar como en el aprendizaje inverso) en el laberinto de agua de Morris (Wongwitdecha y Marsden, 1996a) y en la adquisición de una tarea de aprendizaje discriminativo (Harmer y Phillips, 1998b). En otras tareas se ha observado incluso un empeoramiento en el aprendizaje tras el aislamiento social. Por ejemplo, ratas criadas en condiciones de privación social temprana muestran deterioros en la memoria de trabajo evaluada en el laberinto radial (Einon, 1980; Juraska y cols., 1984). Las razones para estas discrepancias respecto a los efectos del aislamiento social en diferentes situaciones de aprendizaje podrían estar relacionadas con la tarea requerida a los animales. Las ratas criadas en aislamiento, en general, son más reactivas a la novedad (Robbins y cols., 1996; Hall, 1998, Schrijver y cols., 2002), pero también se ha sugerido que dependiendo de los requerimientos concretos del test, la competición conductual entre el incremento de las tendencias exploratorias y la hiperactividad general podría llevar a resultados conflictivos (Hall, 1998). En el estudio aquí presentado es posible que dicho conflicto pueda influir sobre los resultados obtenidos en la tarea de evitación activa. De hecho nuestros resultados indican diferencias entre animales aislados y agrupados en el número de cruces de adaptación y cruces ITI confirmando que los ratones aislados tienden a ser más activos y a reaccionar con mayor fuerza a los nuevos ambientes que los animales criados en condiciones sociales de alojamiento en grupo (Hilaviki y cols., 1989; Gariépy y cols., 1995, Moragrega y cols., 2002).

En estudios anteriores, se ha informado que en un paradigma intruso-residente los ratones derrotados muestran más conductas de miedo así como un mayor índice de respuestas de evitación activa y pasiva. Al mismo tiempo, estos animales presentan menor actividad exploratoria (Lumley y cols., 2000). Se ha hipotetizado que las diferencias individuales en agresión están relacionadas con diferentes estrategias de afrontamiento frente a los cambios ambientales (Benus y cols., 1991b; Sandnabba, 1995). De hecho, las diferencias en *latencia de ataque* se consideran actualmente como parte de una distinción más general en la

estrategia conductual de los roedores hacia los cambios ambientales pudiendo reflejar una capacidad diferencial para adaptarse a dichas variaciones en el ambiente (de Boer y cols., 2003). De acuerdo con estas observaciones, podría esperarse que cuando se adquiere una tarea compleja como la evitación activa se pongan de manifiesto patrones divergentes de ejecución dependiendo del nivel basal de agresividad. En este sentido, se ha sugerido que los ratones más agresivos responderán más activamente a los cambios sociales y no sociales que los animales con menor nivel de agresividad. Podría hipotetizarse, además, que dichas diferencias serán más obvias en las tareas que impliquen un mayor desafío y complejidad. Existe, sin embargo, poca información disponible acerca de la posible influencia del alojamiento diferencial y del nivel de agresividad sobre la ejecución de tareas de condicionamiento en la *shuttle-box*. En el presente estudio, observamos que hay diferencias entre los ratones SAL (con corta latencia de ataque) y LAL (con larga latencia de ataque) en algunas de las medidas obtenidas en tareas de condicionamiento (cruces de adaptación y cruces ITI), aunque podría discutirse si dichas diferencias se explican principalmente por la diferente actividad motora en ambos grupos de ratones. Nuestros datos también indican que la ejecución de estos dos grupos de ratones aislados (SAL y LAL) considerados globalmente no se distinguían de forma significativa en otras medidas de aprendizaje evaluadas en el presente estudio (número de escapes, número de evitaciones, latencia de respuesta y medida del aprendizaje real). Sin embargo, cuando se analizó la adquisición de estos animales a lo largo de los días aparecen algunas diferencias que se ponen especialmente de manifiesto cuando aplicamos la fórmula de *aprendizaje real* que intenta corregir posibles efectos de las diferencias en actividad motora. Esta fórmula indica que en los últimos días de entrenamiento en la tarea los ratones aislados con larga latencia de ataque (LAL) mostrarían un mejor aprendizaje que los que presentaban corta latencia de ataque (SAL). Estas diferencias alcanzan la significación estadística tanto en el grupo control (días 4 y 5 de entrenamiento) como en el grupo tratado con la dosis más alta de nicotina (día 5 de entrenamiento).

Se ha sugerido que la línea base conductual podría ser un factor crítico para determinar la respuesta a la administración de fármacos (Rodgers y Cole, 1993). De hecho, los animales que difieren en estilo de afrontamiento podrían mostrar también reacciones diferenciales a los tratamientos farmacológicos. Así, se ha demostrado recientemente que el antidepresivo bupropión y algunos antagonistas dopaminérgicos pueden afectar de manera sustancialmente distinta la conducta agresiva en ratones con niveles altos y bajos de agresividad (Felip y cols., 2001; Redolat y cols., 2005). El experimento aquí presentado es el primer estudio que compara la conducta de ratones agresivos y no agresivos en respuesta a la administración de nicotina durante el condicionamiento de evitación activa. Nuestros resultados parecen apoyar una sensibilidad diferencial al tratamiento con nicotina en ratones de distinto nivel de agresividad, aunque estas diferencias fueron especialmente evidentes en las medidas indirectas de actividad motora obtenidas durante la ejecución de la tarea (cruces de adaptación y cruces ITI). Es importante también considerar el posible significado de estos cambios en la conducta motora durante la ejecución de la tarea de evitación activa. Estudios recientes sugieren que los cruces realizados por los animales durante los intervalos entre ensayos podrían representar una parte importante del repertorio conductual de los ratones durante en entrenamiento en la caja de escape-evitación (Aguilar y cols., 2004). En nuestro estudio observamos que los ratones más agresivos (SAL) mostraron mayor número de cruces tanto durante el periodo de adaptación como durante los ITI que los ratones con bajo nivel de agresividad (LAL), lo que podría estar indicando una mayor actividad motora en los primeros. Por ello, los datos obtenidos en este experimento concuerdan con investigaciones previas en las que se ha observado mayor reactividad motora de los ratones agresivos en un tambor de actividad (Lagerspetz, 1964) y en el test de campo abierto (Lagerspetz, 1964; Selander y Kvist, 1991; Benus y Rödigs, 1997). Estos resultados podrían interpretarse, como se ha sugerido previamente, teniendo en cuenta que la conducta agresiva contiene más elementos de actividad motora (Sandnabba, 1996), aunque se ha señalado que en diversas situaciones (por ejemplo en una tarea de inversión en un laberinto en Y o en la inversión del ciclo

luz/oscuridad) los ratones LAL ajustan su conducta más fácilmente a los cambios del ambiente que los ratones SAL (Benus y Røndigs, 1997).

Uno de los objetivos del presente estudio fue evaluar la influencia de los factores sociales sobre los efectos conductuales de la nicotina en el condicionamiento de evitación activa. No observamos, sin embargo, diferencias en los efectos de la nicotina entre ratones aislados y agrupados en ninguna de las medidas de aprendizaje consideradas (número de evitaciones, escapes y no respuestas). Los efectos de la nicotina sobre las tareas de aprendizaje son conflictivos puesto que en algunos estudios se observa que la nicotina no tiene efectos claros sobre el aprendizaje de la tarea de evitación activa (Gilliam y Schelsinger, 1985), mientras otras investigaciones sugieren una mejora del condicionamiento tras la administración de dosis bajas de esta sustancia (menores de 0.5 mg/kg) (Evangelista y cols., 1970; Erickson, 1971; Orsinguer y Fulginiti, 1973). En ratas macho, la nicotina indujo un aumento dosis-dependiente de la ejecución en una tarea de evitación activa, aunque se observó una interacción con el sexo de los animales, puesto que la nicotina a dosis bajas mejoró la ejecución en machos y hembras; a dosis altas, aunque los efectos positivos en machos persistieron, se observó un deterioro de la ejecución en las hembras (Yilmaz y cols., 1997). Algunos autores también han mostrado deterioro tras la administración de nicotina. En las crías de ratas que habían sido tratadas con nicotina durante la gestación se observó que la nicotina mejoró la ejecución en las crías hembra pero la deterioró en machos (Genedani y cols., 1983). En un estudio más reciente, la administración prenatal de nicotina deterioró la ejecución de la tarea de evitación activa tanto en machos como en hembras (Vaglenova y cols., 2004). Essman (1971) también informó que el tratamiento con nicotina antes del entrenamiento mejoraba la evitación activa en ratones aislados pero la empeoraba en los que habían permanecido alojados en grupo.

En nuestro estudio, la nicotina no indujo una mejor ejecución de la tarea de evitación activa. Ello podría estar relacionado con el hecho de que, en general, los ratones evaluados presentaron un nivel bajo de conductas de evitación. Se

observaron, sin embargo, algunas interacciones interesantes entre las condiciones de alojamiento y el grupo de tratamiento. Tal como hemos expuesto anteriormente, la medida del aprendizaje real de los animales tras aplicar la fórmula que corrige posibles influencias de la actividad motora, indicó que el grupo AGR/LAL/NIC-1 mejoró su aprendizaje en comparación con el grupo AIS/SAL-VEH, sugiriendo que las diferencias observadas entre grupos de ratones con distinto nivel de agresividad no se deben únicamente a un diferente nivel de actividad motora. En otras investigaciones previas, también se ha indicado que los efectos de la nicotina podrían variar según las condiciones de alojamiento de los animales. Por ejemplo, Scheufele y colaboradores (2000) encontraron que la nicotina disminuyó las conductas sociales e incrementó las conductas relacionadas con la ansiedad en ratas agrupadas pero tuvo efectos mucho menores en ratas alojadas individualmente. En el presente estudio, los efectos de la nicotina se reflejaron principalmente como interacciones con el nivel de agresividad. Por ello, nuestros resultados sugerirían que el nivel basal de agresividad de los animales podría modular la adquisición de una tarea de evitación activa.

En suma, podemos afirmar que el aislamiento social afecta la ejecución de la tarea del condicionamiento de evitación activa. Además, las condiciones de alojamiento interactúan con el nivel de agresividad en algunas de las medidas obtenidas, aunque dicho nivel de agresividad influye fundamentalmente sobre la actividad motora mostrada por los animales en la caja de escape-evitación.

***ESTUDIO 2: EFECTOS DEL
AISLAMIENTO SOCIAL Y
DE LA NICOTINA SOBRE EL
APRENDIZAJE EN
RATONES NMRI QUE
DIFIEREN EN EL NIVEL DE
ANSIEDAD***

INTRODUCCIÓN A LOS EXPERIMENTOS III y IV: “APRENDIZAJE ESPACIAL Y EVITACIÓN ACTIVA EN RATONES NMRI QUE DIFIEREN EN EL NIVEL DE ANSIEDAD: EFECTOS DE LAS CONDICIONES DE ALOJAMIENTO Y DE LA ADMINISTRACIÓN DE NICOTINA”.

Se ha demostrado que las condiciones de alojamiento pueden inducir cambios tanto en el nivel de ansiedad de los animales como en su capacidad de aprendizaje (Da Silva y cols., 1996; Rebouças y Schmidek, 1997; Lapiz y cols., 2001). Es bien conocido también que la experiencia social temprana modifica los efectos conductuales de determinados fármacos en animales (Katz y Steinberg, 1972; Valzelli y cols., 1977). Por ejemplo, se ha comprobado que las distintas condiciones de alojamiento pueden interactuar con efectos tanto ansiolíticos como ansiógenos de diferentes distintos tratamientos farmacológicos (Da Silva y cols., 1996; Vale y Montgomery 1997).

Los estudios respecto a las consecuencias del aislamiento social, particularmente aquellos relacionados con paradigmas de ansiedad, han mostrado resultados contradictorios. Algunos autores han sugerido que las ratas criadas en condiciones de aislamiento social son más emocionales que las alojadas en grupos pequeños (Gamallo y cols., 1986; Wright y cols., 1991). En el laberinto elevado en forma de cruz, el aislamiento parece inducir efectos ansiógenos, ya que los animales aislados pasan menos tiempo en los brazos abiertos del laberinto que los que habían permanecido alojados en grupo (Morinan y Parker, 1985; Wright y cols., 1991; Haller y Halász, 1999). Sin embargo, también hay evidencias de resultados contradictorios (Gentsch y cols., 1988; Fone y cols., 1996).

La influencia de los factores emocionales, especialmente aquellos relacionados con la ansiedad, en la ejecución de diferentes tareas de aprendizaje ha sido escasamente evaluada. La utilización de animales de diferentes niveles de ansiedad podría ser un modelo animal útil para el estudio de la neurobiología de la ansiedad y de los mecanismos de acción de los compuestos ansiolíticos (Liebsch y cols., 1998; Henninger y cols., 2000). El laberinto elevado es un modelo animal ampliamente utilizado en la evaluación de la conducta de ansiedad y en la

comprobación de efectos potencialmente ansiolíticos o ansiógenos de diversos fármacos o tratamientos (Pellow y cols., 1985; Lister, 1987; Rodgers y Cole, 1993), por lo que diferentes autores han utilizado este modelo para evaluar la relación entre nivel de ansiedad y capacidad de aprendizaje (Ho y cols., 2002, 2004; Pawlak y cols., 2003).

En los dos experimentos que se presentan a continuación se ha utilizado el laberinto elevado con la finalidad de clasificar a los animales de acuerdo a su nivel basal de ansiedad. Los grupos de ratones NMRI fueron seleccionados según la conducta mostrada en los brazos del laberinto. El porcentaje de tiempo pasado en los brazos abiertos es considerado el principal indicador de ansiedad (Rex y cols., 2002; Landgraf y Wigger, 2002 y 2003); consecuentemente, los animales que más exploren los brazos abiertos son considerados los menos ansiosos. En los dos experimentos siguientes se evalúa la posible modulación del aprendizaje por el nivel de ansiedad y la administración de nicotina. En un primer estudio se midió la memoria espacial mediante el laberinto de agua de Morris. En un segundo trabajo se utilizó el paradigma de condicionamiento de evitación activa. El objetivo de estos experimentos fue doble. Primeramente, pretendíamos evaluar si había diferencias en la adquisición de dichas tareas de aprendizaje en animales que diferían en sus condiciones de alojamiento (aislados o agrupados) y en su nivel de ansiedad. En segundo lugar, también nos interesó evaluar el posible papel modulador de la nicotina en el aprendizaje de dichas tareas.

Con estos experimentos pretendíamos, además, completar la información obtenida en los experimentos I y II respecto al papel modulador de la agresión sobre el aprendizaje. Por ello el procedimiento general seguido para los Experimentos III y IV fue similar al que se ha expuesto en los apartados anteriores.

3.- EXPERIMENTO III: “APRENDIZAJE ESPACIAL EN RATONES NMRI QUE DIFIEREN EN EL NIVEL DE ANSIEDAD: EFECTOS DE LAS CONDICIONES DE ALOJAMIENTO Y DE LA ADMINISTRACIÓN DE NICOTINA”.

3.1.- MATERIAL Y MÉTODO

SUJETOS

En la realización de este experimento se utilizaron 190 ratones de la cepa NMRI, con un peso entre 20 y 24 gramos, y procedentes de Charles River (Barcelona, España). Desde su llegada al laboratorio los ratones se mantuvieron en dos condiciones de alojamiento diferenciales: la mitad de los animales se alojaron individualmente en jaulas de plástico transparente de 24 x 13,5 x 13 cm (condición de Aislados) y el resto se alojaron de 5 en 5 en jaulas de plástico opacas cuyas dimensiones eran de 25 x 25 x 15 cm (condición de Agrupados).

El período de aislamiento fue de 30 días hasta la realización de un pre-test de ansiedad en el laberinto elevado, que sirvió como criterio de clasificación según el tiempo de permanencia en brazos abiertos y el número de entradas a los mismos. El periodo de aislamiento fue de las mismas características que el utilizado en los experimentos previos, basándonos en procedimientos previamente descritos en la literatura (Wright y cols., 1991; Serra y cols., 2000).

Los animales permanecieron en las condiciones estándar de laboratorio ya descritas en anteriores experimentos. En todos los procedimientos se siguió la normativa nacional e internacional para el cuidado de los animales de laboratorio.

APARATOS

En el presente experimento se utilizaron los siguientes modelos experimentales: el **actímetro**, el **laberinto elevado en forma de cruz** y el **laberinto de agua**. Todos los aparatos se han descrito con anterioridad en los experimentos previos.

PROCEDIMIENTO

1.- Medidas de actividad locomotora espontánea: Realizamos dichas medidas según el procedimiento descrito para el Experimento I.

2.- Laberinto elevado en forma de cruz: El porcentaje de tiempo pasado en los brazos abiertos es considerado el principal indicador de ansiedad (Pellow y cols., 1985; Landgraf, 2003); por ejemplo, un porcentaje bajo en estos brazos se ha correlacionado con un alto nivel de ansiedad, mientras que un alto porcentaje indicaría un perfil ansiolítico. La ansiedad en el laberinto elevado es causada por una conducta de aproximación-evitación resultante del conflicto entre el impulso de explorar un ambiente novedoso y a su vez, el miedo que provoca. El mayor determinante de conducta en esta prueba es la aversión incondicionada ante la altura y los espacios abiertos que presentan los roedores (Pellow y cols., 1985; Rodgers y Cole, 1993). Para explorar el nivel basal de ansiedad, y siguiendo procedimientos previamente descritos en la literatura (Ho y cols., 2002, 2004; Pawlak y cols., 2003) los animales fueron seleccionados según el porcentaje de tiempo pasado en los brazos abiertos del laberinto. Esta clasificación siguió el procedimiento descrito por Ho y su equipo (2002), aunque en el presente estudio se incluyó un grupo con *ansiedad moderada* para obtener un rango más completo de los diferentes niveles basales de ansiedad.

Los animales aislados se asignaron aleatoriamente a tres subgrupos: 1) ratones con alto nivel de ansiedad (22 animales con el porcentaje más bajo de tiempo pasado en los brazos abiertos) (Media = $19,37 \pm 1,31$); 2) ratones con un nivel moderado de ansiedad (22 animales con los porcentajes intermedios) (Media = $36,1 \pm 0,58$); 3) ratones con un bajo nivel de ansiedad (22 animales con el mayor porcentaje de tiempo pasado en los brazos abiertos) (Media = $51,58 \pm 1,90$). De la misma manera, los agrupados se clasificaron como: 1) ratones de alta ansiedad (22 animales con el porcentaje más bajo de tiempo pasado en brazos abiertos) (Media = $14,12 \pm 0,87$); 2) ratones de ansiedad moderada (22 animales con porcentajes intermedios) (Media = $32,62 \pm 0,71$); 3) ratones con alto nivel de ansiedad (22 ratones que mostraron los porcentajes más altos) (Media = $50,58 \pm 1,35$) (ver Tabla 3-1).

Tabla 3-1: Grupos resultantes después de la clasificación por el nivel de ansiedad, es decir, según el porcentaje pasado en los brazos abiertos del laberinto elevado.

Aislados	>26%	ALTA	AIS/AA	22
Agrupados	>22%	ALTA	AGR/AA	22
Aislados	30-40%	MODERADA	AIS/MA	22
Agrupados	28-36%	MODERADA	AGR/MA	22
Aislados	>44%	BAJA	AIS/BA	22
Agrupados	>44%	BAJA	AGR/BA	22

Estos seis grupos se duplicaron al asignar a cada uno de ellos el tratamiento farmacológico correspondiente: nicotina (0,175 mg/kg) o suero fisiológico resultando los grupos descritos en la Figura 3-2. Las pequeñas diferencias entre aislados y agrupados son debidas a una distribución del tiempo en brazos abiertos algo distinta entre ellos. Como se observa en la Figura 3-1 A y B, los animales agrupados obtuvieron puntuaciones más extremas que los animales aislados, especialmente en las que reflejan más tiempo pasado en los brazos abiertos del laberinto elevado.

CLASIFICACIÓN SEGÚN EL NIVEL DE ANSIEDAD

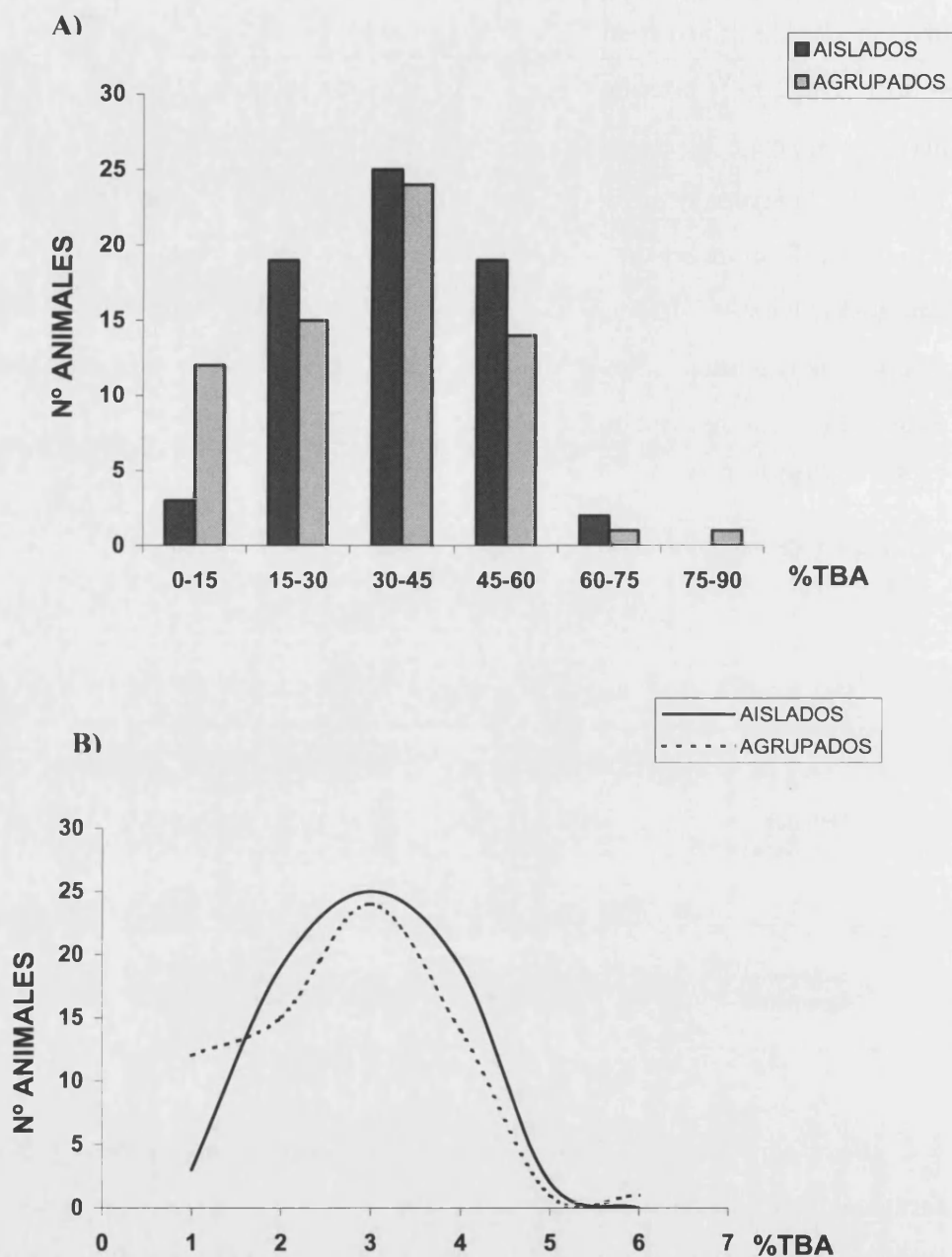


Figura 3-1: Distribución de los ratones NMRI macho aislados y agrupados según su nivel de ansiedad en el laberinto elevado en forma de cruz (% tiempo en brazos abiertos).

A) Gráfica de barras con las frecuencias de distribución en cada intervalo de porcentaje de tiempo en brazos abiertos.

B) Gráfica de líneas en la que se aprecia la forma (próxima a la curva normal) de la distribución según el porcentaje de tiempo en brazos abiertos.

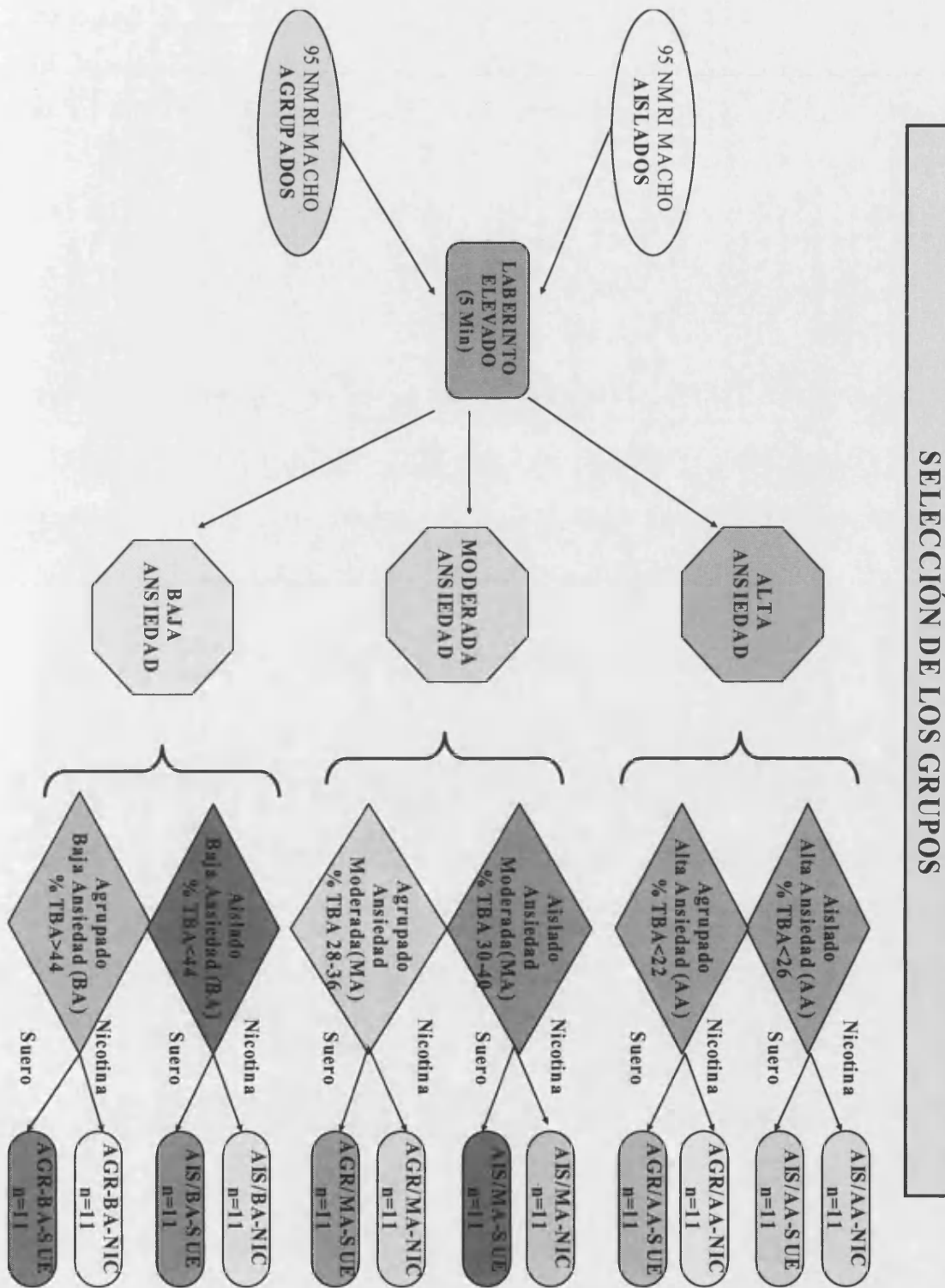


Figura 3-2: Grupos resultantes en el Experimento III después de la clasificación por el nivel de ansiedad en el laberinto elevado y su asignación al tratamiento farmacológico correspondiente.

3.- Laberinto de Agua: 7 días después de la preselección de los ratones en el laberinto elevado, los animales pasaron la prueba de aprendizaje espacial. El procedimiento seguido fue el mismo que el descrito en el Experimento I y se muestra en la Figura 3-3.

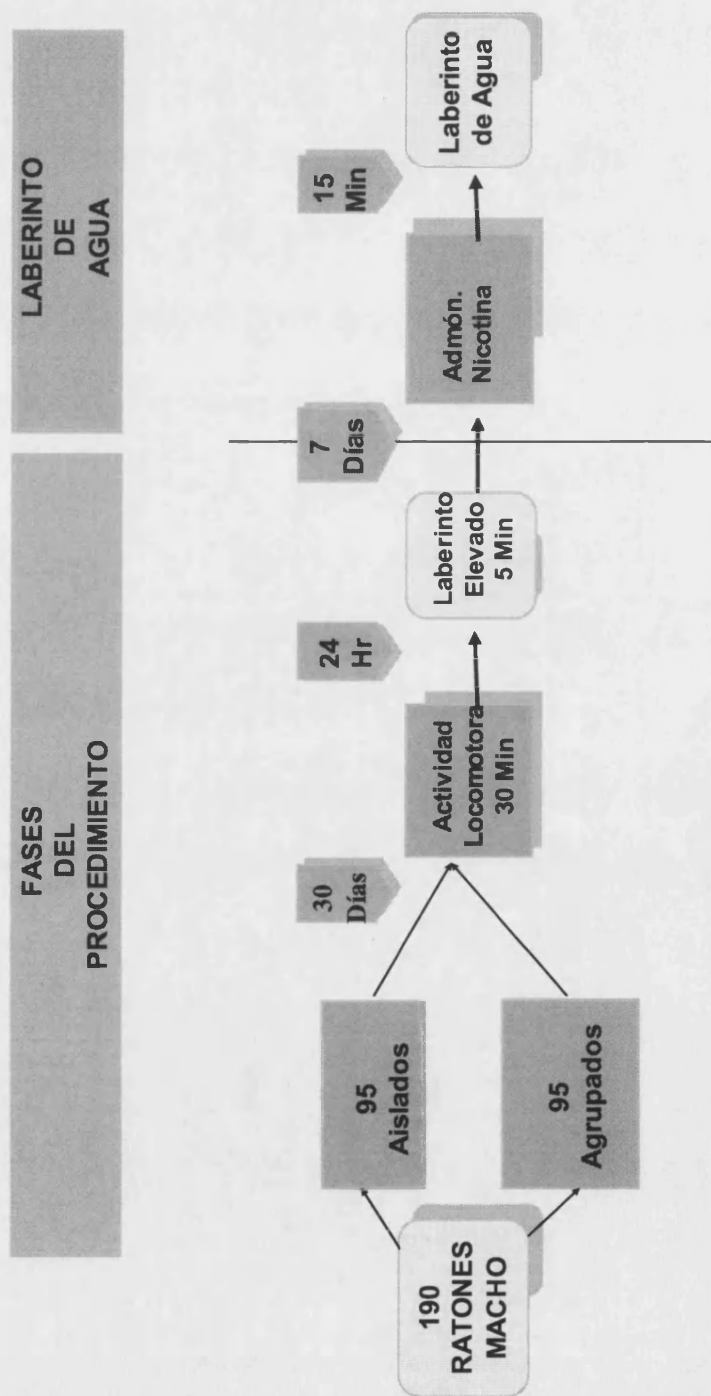


Figura 3-3: Esquema de las fases del procedimiento seguido en el presente Experimento.

FÁRMACO

Los animales recibieron tratamiento farmacológico con nicotina [(-)-Nicotine hydrogen di-(+)tartrate SALT] (SIGMA-Aldrich. Madrid). La nicotina se disolvió en suero fisiológico (0,9% NaCl) y el Ph se ajustó a 7 con hidróxido de sodio (NaOH). La dosis utilizada, expresada en forma de base, fue de 0,175 mg/kg base de nicotina. El grupo control recibió suero fisiológico. Los grupos se determinaron en función de las condiciones de Alojamiento (Aislado/Agrupado) y por el Tratamiento (Nicotina o Vehículo) y los grupos resultantes de dicha combinación son los mostrados en la Figura 3-2.

Debido a la complejidad del diseño del presente experimento y al gran número de grupos resultante tras la clasificación de los animales por su nivel de ansiedad, se utilizó una única dosis de nicotina. La elección de la dosis más baja entre dos probadas en experimentos anteriores (0,35 y 0,175 mg/kg), se justifica por los resultados obtenidos en el Experimento I donde observamos que la dosis más alta deterioraba la ejecución en el laberinto de agua. El tratamiento farmacológico fue administrado en un volumen de 10 ml/kg mediante una inyección subcutánea 15 minutos antes de la ejecución de la tarea durante 5 días (ver Figura 3-4).

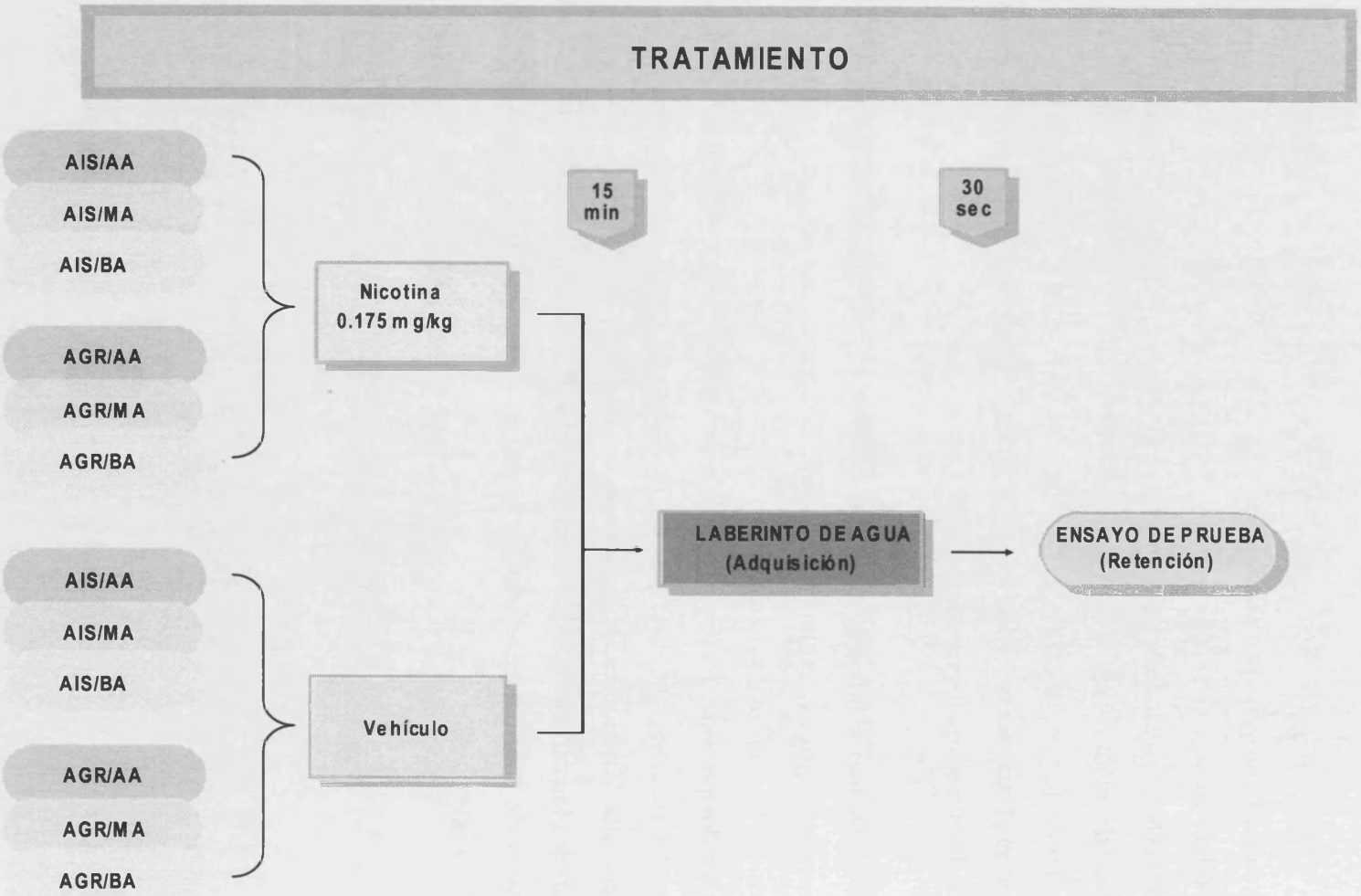


Figura 3-4: Procedimiento seguido en la administración del fármaco.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

1.- Actividad motora: para examinar la actividad motora global de los animales se realizó un ANOVA de una vía tomando como variable dependiente el índice global de actividad y dos variables entre-sujeto: el factor Alojamiento (de 2 niveles: Aislado y Agrupado) y el factor Ansiedad [de 3 niveles: alta ansiedad (AA), moderada (MA) y baja ansiedad (BA)]. Con el fin de obtener información de cada grupo experimental y de apreciar más claramente las interacciones, realizamos el mismo tipo de análisis únicamente con un factor entre-sujeto al que llamamos Grupo (con 6 niveles: AIS/AA; AIS/MA; AIS-BA y AGR/AA; AGR/MA; AGR/BA).

Para evaluar la información relativa a cada momento temporal, se realizó un ANOVA de medidas repetidas con el factor intra-sujeto Muestra (con 6 niveles correspondientes a cada muestra de 5 minutos) y con dos factores entre-sujeto: Alojamiento (con 2 niveles: Aislado y Agrupado) y la variable Ansiedad [con 3 niveles: alta ansiedad (AA), moderada (MA) y baja ansiedad (BA)]. Como en el caso anterior, llevamos a cabo un ANOVA complementario en el que se consideró el factor Grupo (6 niveles) y el factor Muestra (6 niveles).

En los casos apropiados se realizaron pruebas post-hoc (Newman-Keuls) o bien comparaciones con el ajuste de Sidak (cuando hay menos de tres grupos y la prueba de Newman Keuls no es adecuada). Cuando las interacciones alcanzaron la significación estadística se procedió a la realización de ANOVAs de las mismas. Se consideró $p < 0.05$ como nivel de significación estadística.

2.- Laberinto de agua de Morris:

El diseño de nuestro estudio señala que los factores que podrían influir en la adquisición y/o retención del laberinto de agua son el Alojamiento, la Ansiedad y el Tratamiento. Estos factores requieren un ANOVA mixto de medidas repetidas para analizar las latencias de escape considerando todas las variables implicadas. Por tanto, en el análisis de la adquisición de la tarea se consideraron como variables entre-sujeto los factores: Ansiedad con 3 niveles: alta, moderada y baja; Alojamiento con dos niveles: aislado y agrupado; y el factor Tratamiento también con dos niveles: nicotina y suero. El factor Día (5 niveles) se consideró como una variable intra-sujeto.

En el análisis de la retención del laberinto de agua (ensayo sin plataforma) se consideraron los mismas variables entre-sujetos y el factor Cuadrante como variable intra-sujeto (4 niveles). En los casos apropiados se realizaron pruebas post-hoc adecuadas y se consideró como nivel de significación $p < 0.05$.

Además del ANOVA anterior y con el objetivo de obtener una visión más global de los resultados y sobre todo para obtener la información de la variable Ensayo (que anteriormente no habíamos tenido en cuenta por no aumentar excesivamente el número de variables) realizamos un segundo ANOVA tanto para la adquisición como para la retención considerando los 12 grupos resultantes de nuestro diseño $2 \times 3 \times 2$. En el análisis de la adquisición de la tarea se consideró el factor Grupo como variable entre-sujeto (12 niveles) y los factores Días y Ensayos (5 y 4 niveles respectivamente) como variables intra-sujeto. En el análisis de los ensayos de prueba (sin plataforma) se consideró el factor Grupo como variable entre-sujeto y el factor Cuadrante como variable intra-sujeto (con cuatro niveles). En los casos apropiados se realizaron pruebas post-hoc (Newman-Keuls).

3.2.- RESULTADOS

1.- Actividad motora: se describirán los resultados para los dos tipos de análisis realizados, el global y el que contempla las 6 muestras temporales.

1.1.- Análisis global de la actividad motora: el ANOVA mostró diferencias significativas según el régimen de Alojamiento de los animales [$F(1,126)=44,97$; $p<0.001$]. Las comparaciones a posteriori señalaron que los animales aislados tuvieron sensiblemente mayor actividad que los agrupados. No encontramos diferencias según el nivel de ansiedad y la interacción Alojamiento x Ansiedad tampoco alcanzó la significación estadística (ver Figura 3-5 A). Al realizar el ANOVA para obtener la información acerca de los 6 grupos resultantes sí encontramos diferencias entre los grupos [$F(5,131)=9,95$; $p<0.001$]. Las pruebas post-hoc se detallan de forma resumida en la Tabla 3-3 (ver Figura 3-5 B).

Tabla 3-3: Tabla resumen de los grupos en los que se hallaron diferencias significativas en la medida de actividad motora del Experimento III.

Grupo	Actividad Motora	Grupo	p<
Aislados-Alta ansiedad (AIS/AA)	>	Agrupados/Alta ansiedad (AGR/AA)	0.05
		Agrupados/Moderada ansiedad (AGR/MA)	0.05
Aislados-Moderada ansiedad (AIS/MA)	>	Agrupados/Alta ansiedad (AGR/AA)	0.05
		Agrupados/Moderada ansiedad (AGR/MA)	0.05
		Agrupados/Baja ansiedad (AGR/BA)	0.05
Aislados-Baja ansiedad (AIS/BA)	>	Agrupados/Alta ansiedad (AGR/AA)	0.05
		Agrupados/Moderada ansiedad (AGR/MA)	0.05

1-2.- Análisis con las 6 muestras temporales: el ANOVA mostró diferencias significativas en el factor Muestra [$F(5,630) = 90,24; p < 0.001$]. La prueba post-hoc Newman-Keuls indicó que en los 10 primeros minutos del test los animales se movieron más que el resto del tiempo. En la gráfica (Figura 3-6 B) se aprecia un descenso lineal de la actividad a medida que pasa el tiempo hasta la quinta muestra; en la sexta se aprecia una pequeña recuperación de la actividad. El factor Alojamiento también resultó significativo [$F(1,126)=44,97; p < 0.001$]. Las comparaciones con la prueba de Sidak entre aislados y agrupados indican que los animales alojados individualmente tuvieron un mayor número de cuentas de actividad locomotora que los animales agrupados ($p < 0.05$). La interacción Muestra x Alojamiento resultó significativa [$F(5,630)=2,23; p < 0.05$] así como la interacción Muestra x Alojamiento x Ansiedad [$F(10,630)=2,32; p < 0.02$]. Para obtener la información correspondiente a cada condición de Alojamiento se realizaron ANOVAs por separado:

-Condición Aislados': el factor Muestra resultó significativo [$F(5,315)=37,97; p < 0.001$] y las pruebas post-hoc indicaron que se produjo un descenso en la actividad dependiente del paso del tiempo y que en los 10 primeros minutos del test los animales aislados mostraron más actividad que los 20 minutos restantes de prueba. La interacción Muestra x Ansiedad no resultó significativa en los animales aislados.

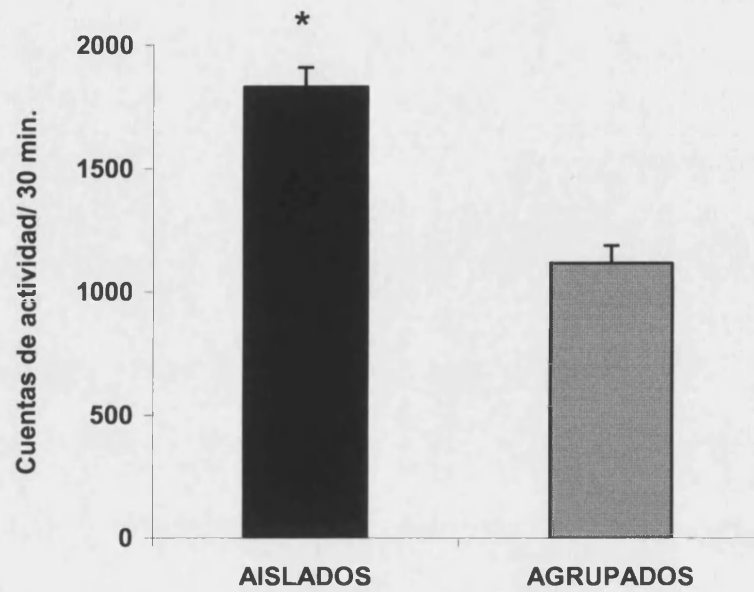
-Condición Agrupados': el factor Muestra resultó significativo [$F(5,315)=53,23; p < 0.001$] y las pruebas post-hoc indicaron que hay un descenso de la actividad tiempo dependiente hasta la recuperación que se produce alrededor del minuto 25° de la prueba. La interacción Muestra x Ansiedad sí resultó significativa [$F(10,315)=2,30; p < 0.02$] pero al realizar las pruebas post-hoc no se hallaron diferencias entre los distintos grupos de ansiedad.

Al realizar el ANOVA únicamente con el factor Grupo (de 6 niveles), el factor Muestra alcanzó la significación estadística [F(5,630)=90,24; p<0.001]. Las diferencias fueron en la misma dirección que el análisis anterior. El factor Grupo alcanzó la significación estadística [F(5,126)=9,95; p<0.001]. Las comparaciones son las anteriormente especificadas (Tabla 3-3 y Figura 3-6 A). La interacción Grupo x Muestra también señaló diferencias significativas entre los grupos para cada muestra temporal [F(25,630)=1,91; p<0.05]. Las pruebas post-hoc se resumen en la Tabla 3-4 (ver también Figura 3-6 B).

Grupos	Actividad Motora	Grupos
MUESTRA 1 (0-5 Min.)		
(AIS/AA)	}	>
(AIS/MA)		
(AIS/BA)		
		{
		(AGR/AA)
		(AGR/MA)
		(AGR/BA)
MUESTRA 2 (5-10 Min.)		
(AIS/AA)	}	>
(AIS/MA)		
(AIS/BA)		
		{
		(AGR/AA)
		(AGR/MA)
		(AGR/BA)
MUESTRA 3 (10-15 Min.)		
(AIS/AA)	>	(AGR/AA)
(AIS/MA)	>	(AGR/AA); (AGR/MA); (AGR/BA)
(AIS/BA)	>	(AGR/AA)
MUESTRA 4 (15-20 Min.)		
(AIS/AA)	>	(AGR/AA)
(AIS/MA)	>	(AGR/AA); (AGR/MA); (AGR/BA)
(AIS/BA)	>	(AGR/AA)
MUESTRA 5 (20-25 Min.)		
(AIS/AA)	>	(AGR/AA); (AGR/MA)
(AIS/MA)	>	(AGR/AA); (AGR/MA)
(AIS/BA)	>	(AGR/AA); (AGR/MA)
MUESTRA 6 (25-30Min.)		
(AIS/AA)	>	(AGR/MA)
(AIS/MA)	>	(AGR/AA); (AGR/MA); (AGR/BA)
(AIS/BA)	>	(AGR/MA)

Tabla 3-4: Resumen de las diferencias entre los grupos en cada Muestra temporal de la medida de actividad motora en el Experimento III. La significación fue en todos los casos de p<0.05.

A)



B)

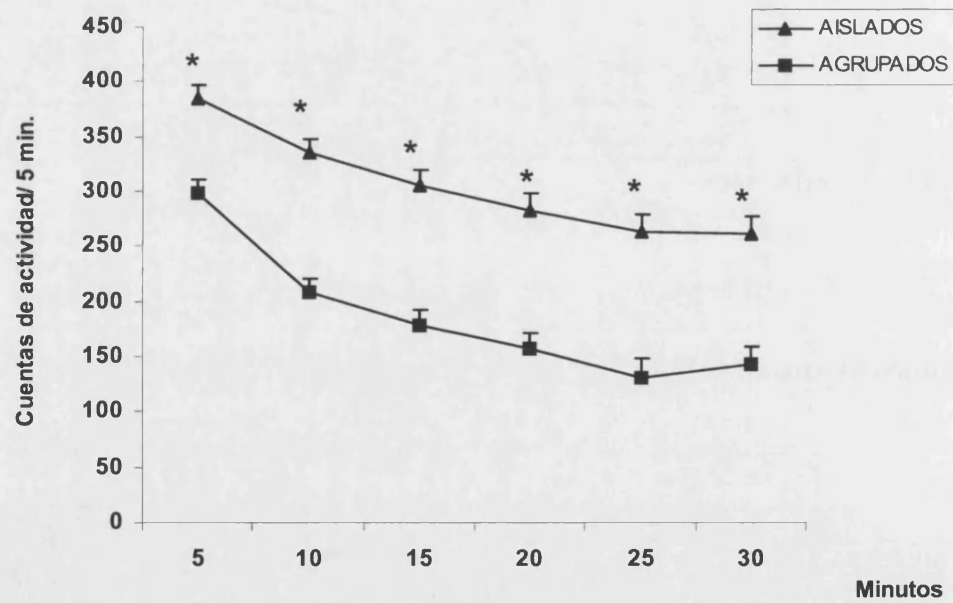


Figura 3-5: Medias (\pm SEM) de la actividad locomotora mostrada por las diferentes condiciones de alojamiento de animales en el Experimento III: AISLADOS (n=66) y AGRUPADOS (n=66).

A) N° total de cuentas para 30 min. * $p < 0.05$ AISLADOS vs AGRUPADOS

B) Cuentas para cada periodo de 5 min * $p < 0.05$ AISLADOS vs AGRUPADOS

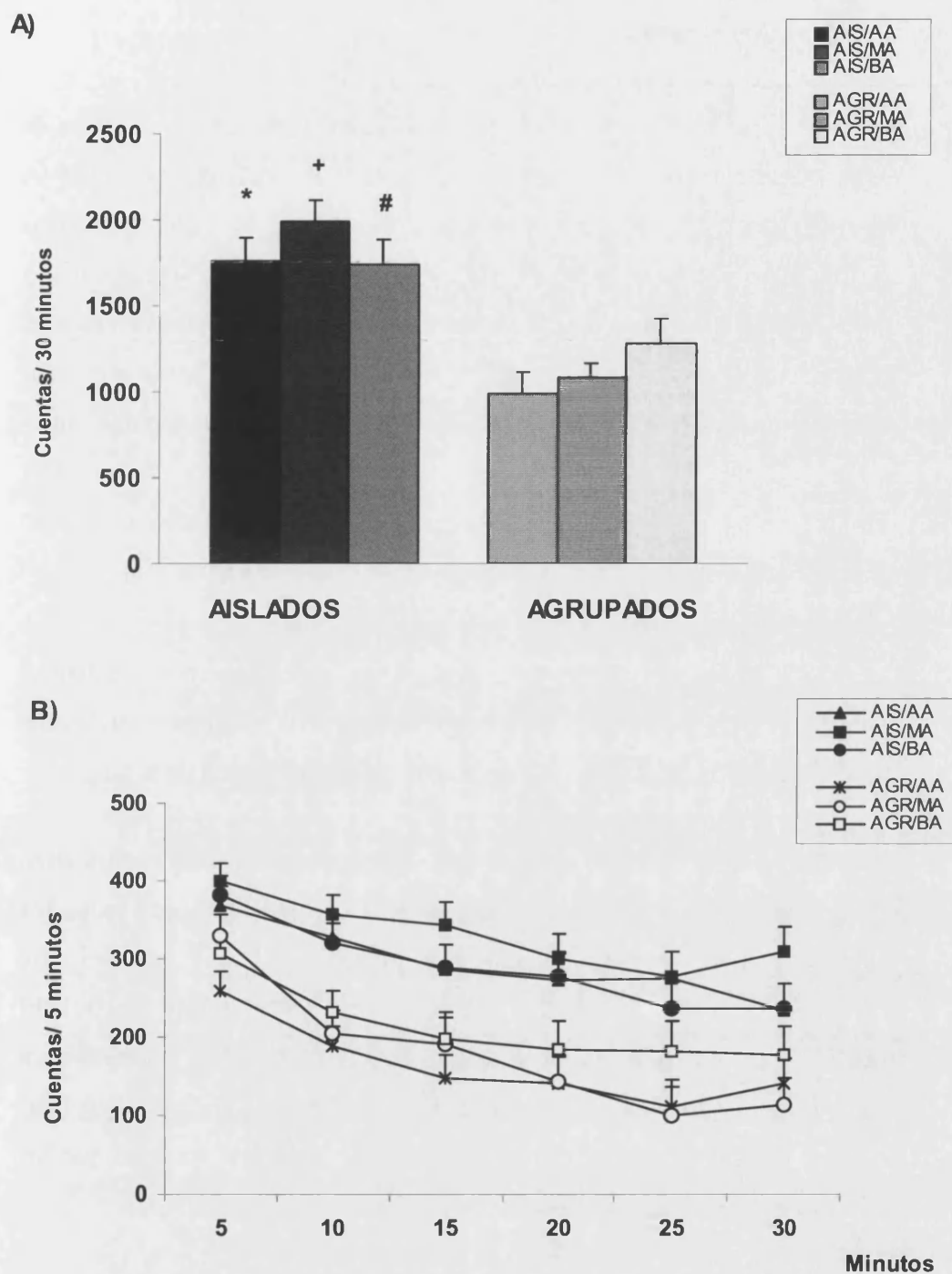


Figura 3-6: Medias (\pm SEM) de la actividad locomotora mostrada por los Grupos en el Experimento III: Aislados/Alta ansiedad (AIS/AA); Aislados/Moderada ansiedad (AIS/MA); Aislados/Baja ansiedad (AIS/BA); Agrupados/Alta ansiedad (AGR/AA); Agrupados/Moderada ansiedad (AGR/MA) y Agrupados/Baja ansiedad.(AGR/BA). n de cada grupo= 22.

A) N° total de cuentas durante 30 min.

* $p < 0.05$ AIS/AA vs AGR/AA y AGR/MA;

+ $p < 0.05$ AIS/MA vs AGR/AA, AGR/MA Y AGR/BA;

$p < 0.05$ AIS/BA vs AGR/AA y AGR/MA.

B) Cuentas para cada periodo de 5 min. (ver significaciones en Tabla 3-4).

2.-Laberinto de agua de Morris

2-1.- Adquisición: como ya hemos comentado en el apartado de análisis estadísticos, se realizaron 2 tipos de análisis. El ANOVA considerando las 3 variables entre-sujetos mostró que no había diferencias significativas según el Alojamiento, la Ansiedad o el Tratamiento, y tampoco en sus interacciones. Sí hubo diferencias significativas para el factor Día [$F(4,480)=86,04$; $p<0.001$]. Los animales aprendieron a realizar la tarea a medida que pasaban los días. El ANOVA con la variable entre-sujetos Grupo no halló diferencias entre ellos. El factor Día [$F(4,480)=86,04$; $p<0.001$] resultó significativo. Los animales mostraron menores latencias de escape con el paso de los días (ver Figura 3-7).

2-2.- Retención (Ensayo de prueba sin plataforma): se analizó el tiempo que cada animal pasó en el cuadrante noroeste (NO) en el cual había estado situada la plataforma de escape durante la adquisición de la tarea.

El ANOVA indicó que el factor Cuadrante resultó significativo [$F(3,360)=30,11$; $p<0.001$]. Las pruebas post-hoc indicaron que todos los animales pasaron significativamente más tiempo en el cuadrante Noroeste (en el que había estado situada la plataforma) que en el Noreste $p<0.001$. El factor Tratamiento también resultó significativo. El ANOVA realizado para explicar estas diferencias señaló que los ratones de la 'Condición Nicotina' pasaron significativamente menos tiempo en el cuadrante noroeste que los ratones de la 'Condición Vehículo'

El ANOVA realizado para los 12 grupos no mostró diferencias entre los mismos. El factor Cuadrante indicó las mismas diferencias que en análisis anterior. La interacción Grupo x Cuadrante no aportó diferencias significativas (ver Figura 3-8).

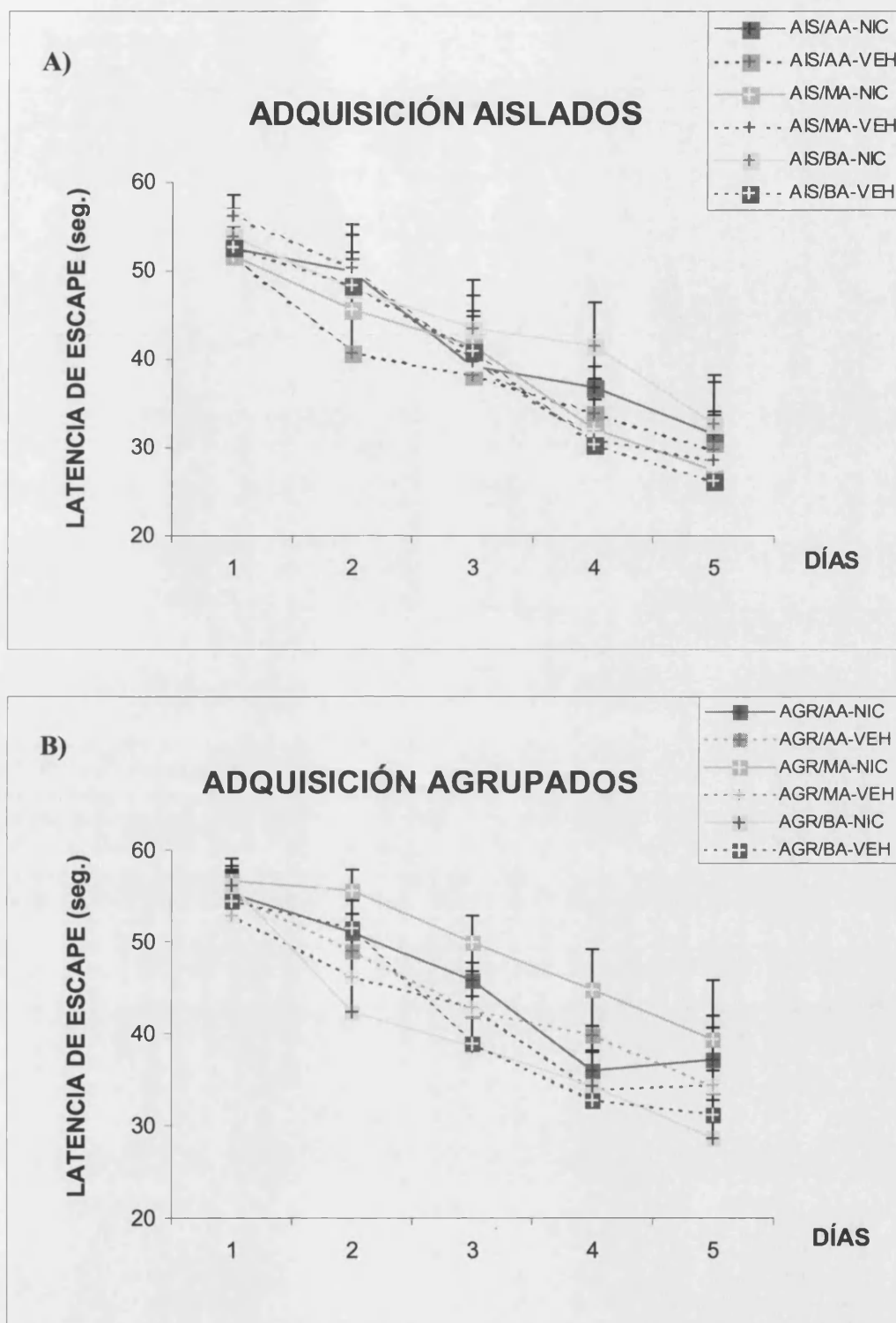


Figura 3-7: Medias \pm SEM de las latencias de escape en el laberinto de agua durante los 5 días de entrenamiento de los ratones de distinta condición de aislamiento y nivel de ansiedad.

A) Adquisición de los ratones macho NMRI aislados: Aislados/Alta ansiedad tratados con 0,175 mg/kg de nicotina (AIS/AA-NIC) o vehículo (AIS/AA-VEH); Aislados/Moderada ansiedad tratados con nicotina (AIS/MA-NIC) o vehículo (AIS/MA-VEH); Aislados/Baja ansiedad (AIS/BA-NIC) tratados con nicotina o vehículo (AIS/BA-VEH).

B) Adquisición de los ratones macho NMRI agrupados: Agrupados/Alta ansiedad tratados con nicotina (AGR/AA-NIC) o suero fisiológico (AGR/AA-VEH); Agrupados/Moderada ansiedad nicotina (AGR/MA-NIC) o vehículo (AGR/MA-VEH); Agrupados Baja/ ansiedad nicotina (AGR/BA-NIC) o vehículo (AGR/BA-VEH)

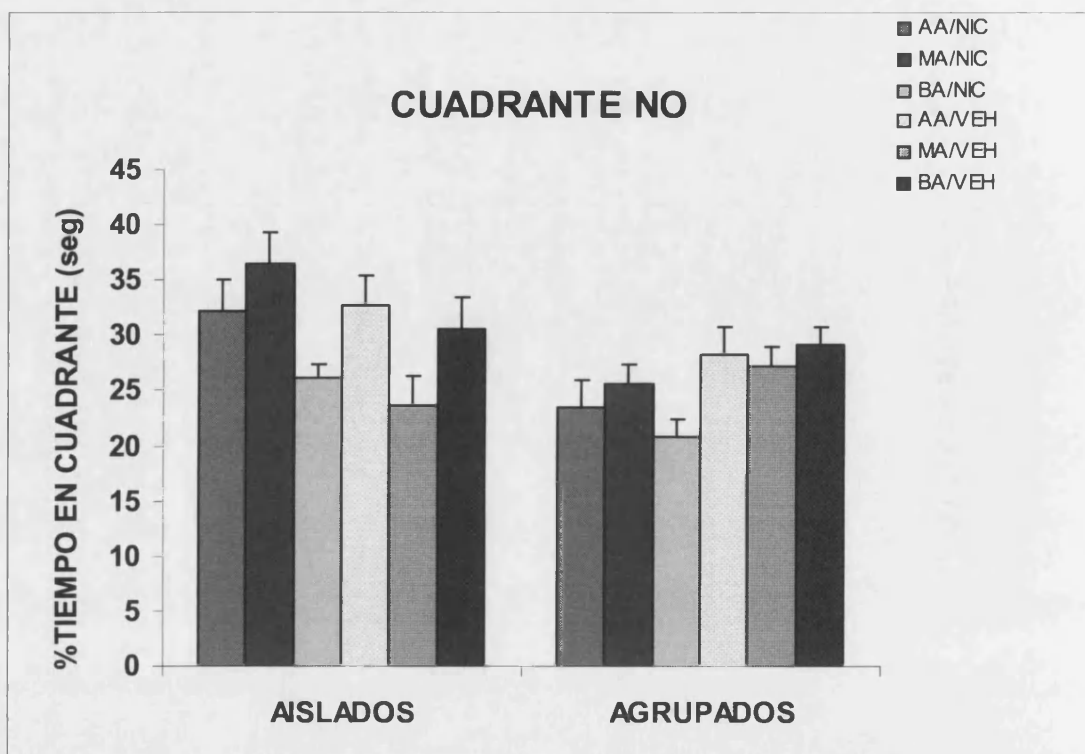


Figura 3-8: Media \pm SEM del porcentaje de tiempo en el cuadrante de la plataforma durante el ensayo de prueba en ratones aislados y agrupados: Aislados/Alta ansiedad tratados con 0,175 mg/kg de nicotina (AIS/AA-NIC) o con vehículo (AIS/AA-VEH); Aislados/Moderada ansiedad tratados con nicotina (AIS/MA-NIC) o vehículo (AIS/MA-VEH); Aislados/Baja ansiedad tratados con nicotina (AIS/BA-NIC) o vehículo (AIS/BA-VEH); Agrupados/Alta ansiedad tratados con nicotina (AGR/AA-NIC) o vehículo (AGR/AA-VEH); Agrupados/Moderada ansiedad tratados con nicotina (AGR/MA-NIC) o vehículo (AGR/MA-VEH); Agrupados/Baja ansiedad tratados con nicotina (AGR/BA-NIC) o vehículo (AGR/BA-VEH).

3.3.- DISCUSIÓN

El principal objetivo de esta investigación fue valorar los efectos del aislamiento social y de la administración de nicotina en el aprendizaje de una tarea espacial en ratones macho NMRI, así como evaluar si las diferencias en actividad motora y en nivel de ansiedad, influidas por las condiciones de alojamiento, dan lugar a patrones diferenciados en la capacidad de aprendizaje en distintos grupos de ratones.

Efectos de las condiciones de alojamiento y del nivel de ansiedad en la actividad motora espontánea.

Nuestros resultados parecen confirmar la hiperactividad locomotora de los animales criados en aislamiento frente a los alojados en grupo, apoyando los resultados que ya habíamos observado en el Experimento I de la presente Tesis Doctoral y ampliando estudios anteriores (Hilaviki y cols., 1989; Gariépy y cols., 1995; Rilke y cols., 1998ab).

En este experimento también investigamos si los ratones que presentan distinto nivel basal de ansiedad (alto, moderado o bajo) podrían diferir en medidas de actividad motora espontánea. Los datos indican que no hay diferencias significativas entre estos grupos de animales. La respuesta locomotora y conductual a la novedad ha sido escasamente investigada en relación con las medidas de ansiedad (Thiel y cols., 1999). Un estudio previo indicó que una cepa de ratas con alta respuesta motora a la novedad mostraba también puntuaciones bajas en pruebas de ansiedad (Courvoisier y cols., 1996). En ratones se ha observado que los más ansiosos permanecen más tiempo inmóviles en el test de natación forzada (Ducottet y Belzung, 2005). Tal como otros autores sugieren, los resultados acerca de la posible relación entre ansiedad y actividad motora dependen tanto de la especie y cepa utilizada como del test conductual realizado (Henniger y cols., 2000). En el presente experimento nuestros datos muestran que

la hiperactividad locomotora registrada en el actímetro por los ratones aislados no parece tener una clara correspondencia con el nivel de ansiedad basal, sugiriendo una ausencia de relación directa entre ansiedad mostrada en el laberinto elevado y locomoción. Esta observación concuerda con datos aportados por Henniger y colaboradores (2000) en los que no se encontraron diferencias en actividad motora entre ratas criadas selectivamente por su alto nivel de ansiedad (HAB) y las de bajo nivel de ansiedad (LAB) observadas en sus propias jaulas.

Efectos de las condiciones de alojamiento y del nivel de ansiedad en la adquisición y retención del laberinto de agua.

El laberinto de agua ha sido utilizado en estudios previos para investigar los efectos de la nicotina sobre el aprendizaje espacial (Lamberty y Gower, 1991b; Bernal y cols., 1999) aunque ningún estudio ha abordado la cuestión de si las condiciones de alojamiento y las variables emocionales podrían modular los efectos de esta sustancia sobre el aprendizaje de dicha tarea. Uno de los objetivos del presente estudio fue evaluar si el aislamiento social podría tener efectos diferenciales sobre el aprendizaje espacial en grupos de ratones previamente clasificados en base a sus niveles de ansiedad. Se ha sugerido que el laberinto de agua es una tarea potencialmente estresante y que podría estar influida tanto por factores biológicos como ambientales (Perrot-Sinal y cols., 1996). Debido a que se ha demostrado que el aislamiento induce cambios en la ansiedad en los animales y que los ratones alojados individualmente serían hiperresponsivos cuando se enfrentan a una nueva situación (de Jong y cols., 2005), se hipotetizó que el nivel de ansiedad podría modular la respuesta de aprendizaje de esta tarea. En relación con la adquisición de la tarea a lo largo de los 5 días de entrenamiento, nuestros resultados mostraron que el alojamiento individual no tuvo efectos significativos. Estos datos concuerdan con la ausencia de diferencias observada en el laberinto de agua entre ratones aislados y agrupados (Coudereau y cols., 1997b) y confirman los resultados obtenidos en el Experimento I de la presente investigación. En cambio, si tenemos en cuenta los datos referidos a la

prueba de retención de la tarea espacial (realizada al final del entrenamiento y durante la cual se retiraba la plataforma de la piscina y se dejaba nadar libremente al animal) existe una cierta discrepancia entre el Experimento I y los datos obtenidos en este Experimento III. En el primer experimento, los ratones aislados que habían sido tratados con vehículo recordaron mejor la posición de la plataforma en comparación con los alojados en grupo. Sin embargo, los datos del presente experimento sugieren que las condiciones de alojamiento no influyeron significativamente sobre el recuerdo que mostraban los ratones acerca del lugar donde previamente se situaba la plataforma. Hay que indicar que aunque el procedimiento general seguido en ambos experimentos fue similar, la manipulación a la que fueron sometidos los animales para su clasificación difirió. En el Experimento I los animales fueron seleccionados tras un encuentro agonístico, mientras que en el presente Experimento los animales fueron evaluados en el *plus maze*, lo que confirma la importancia de la experiencia y manipulaciones previas en el aprendizaje de tareas de tipo espacial.

Un resultado importante obtenido en este tercer experimento es que el nivel de ansiedad no moduló directamente ni la adquisición ni la retención del laberinto de agua. Estos datos confirman estudios anteriores que sugieren la ausencia de una relación directa entre el nivel de emocionalidad (evaluado en el laberinto elevado) y el procesamiento de la información espacial (medido en el laberinto de agua de Morris) en ratones NMRI, aunque en este caso la muestra utilizada eran animales de edad avanzada (Lamberty y Gower, 1993). Otros autores también han concluido que la ansiedad no parece ser un factor determinante en la ejecución de tareas de aprendizaje espacial en ratas (Bert y cols., 2002).

Un aspecto a tener en cuenta al interpretar nuestros datos es que los ratones de la cepa NMRI muestran de forma consistente bajos niveles de ansiedad cuando se observa su conducta en el laberinto elevado (Griebel y cols., 2000). Hay que indicar, sin embargo, que en nuestro procedimiento de selección previo a la realización de la tarea de aprendizaje, obtuvimos ratones con muy distinto nivel de ansiedad, tal como se aprecia claramente en la Figura 3-1. A pesar de ello, no

observamos una relación directa entre nivel de ansiedad y ejecución de la tarea espacial. De este modo, nuestros datos apoyarían la hipótesis propuesta acerca de la compleja relación entre ansiedad y capacidad de aprendizaje, que dependería tanto de los requerimientos de la tarea propuesta como del procedimiento utilizado para evaluar la ansiedad. Nuestros resultados coinciden además con los obtenidos por Bert y colaboradores (2002) que compararon la ejecución en el laberinto de agua entre dos cepas de ratas (Fischer y Wistar) con distinto nivel de ansiedad y no obtuvieron diferencias en su ejecución. Sin embargo, contrastan con otras investigaciones que indican que una cepa de ratas de baja ansiedad (SHR) realizan mejor la tarea del laberinto de Morris que ratas más ansiosas (Ferguson y Cada, 2004).

En el presente estudio, la administración aguda de nicotina no mejoró el aprendizaje de los ratones NMRI en el laberinto de agua, apoyando estudios previos en esta misma cepa de ratones (Lamberty y Gower, 1991b; Vicens y cols., 2003b). En la prueba de retención se observó que los animales tratados con nicotina realizaron peor la tarea que los que habían recibido suero fisiológico. Este resultado coincide parcialmente con el obtenido en el Experimento I de la presente Tesis donde se demostró que el tratamiento con nicotina deteriora la ejecución de los ratones, aunque en dicho estudio este efecto era especialmente significativo en los ratones que habían permanecido aislados. Nuestras observaciones contrastan con otras investigaciones que sí han obtenido efecto de mejora tras la administración de nicotina pero en otras cepas de ratones y con un tratamiento más prolongado (Bernal y cols., 1999). La diferencia en las cepas utilizadas o en la duración del tratamiento podría, en parte, explicar tales discrepancias. Hay que indicar también que en el presente estudio no se encuentran efectos diferenciales de la nicotina entre ratones aislados y agrupados, lo que sugiere que las condiciones de alojamiento no modularían directamente los efectos de la nicotina sobre el laberinto de agua en ratones seleccionados según el nivel de ansiedad.

4.- EXPERIMENTO IV: “CONDICIONAMIENTO DE EVITACIÓN ACTIVA EN RATONES NMRI QUE DIFIEREN EN EL NIVEL DE ANSIEDAD: EFECTOS DE LAS CONDICIONES DE ALOJAMIENTO Y DE LA ADMINISTRACIÓN DE NICOTINA”.

4.1.- MATERIAL Y MÉTODO

SUJETOS

En la realización de este experimento se utilizaron 317 ratones de la cepa NMRI, con un peso entre 20 y 24 gramos, y procedentes de Charles River (Barcelona, España). A su llegada al laboratorio los ratones se asignaron según dos condiciones de alojamiento diferenciales: 162 animales se alojaron individualmente en jaulas de plástico transparente de 24 x 13,5 x 13 cm (condición de Aislados) y el resto se alojaron de 5 en 5 en jaulas de plástico opacas cuyas dimensiones eran de 25 x 25 x 15 cm (condición de Agrupados).

El período de aislamiento fue de 30 días hasta la realización de un pre-test de ansiedad en el laberinto elevado, que sirvió como criterio de clasificación según el tiempo de permanencia en brazos abiertos y el número de entradas a los mismos (ver Experimento III).

Los animales se mantuvieron en las condiciones estándar de laboratorio ya descritas para los anteriores experimentos y se siguió la normativa nacional e internacional para el cuidado de los animales de laboratorio.

APARATOS

Los modelos utilizados fueron el **actímetro**, el **laberinto elevado en forma de cruz** y la **caja de escape evitación de dos sentidos**. Todos ellos han sido descritos en experimentos anteriores.

PROCEDIMIENTO

Tras 30 días de aislamiento o alojamiento en grupo, se midió la actividad motora espontánea en el actímetro y 24 hr después, se evaluó el nivel de ansiedad de los animales en el laberinto elevado en forma de cruz. Transcurridos 7 días desde su evaluación en el *plus maze*, los animales realizaron el condicionamiento de evitación activa (ver Figura 4-2).

1.- Medidas de actividad locomotora espontánea: Dichas medidas se realizaron según el procedimiento descrito para el Experimento I. El propósito de esta prueba consistía en determinar si el régimen de alojamiento y el nivel de ansiedad de los animales provocarían diferencias en la actividad locomotora, la cual parece desempeñar un papel relevante en la tarea de condicionamiento de evitación activa.

2.- Laberinto elevado en forma de cruz: El procedimiento guardó las mismas características que el descrito con detalle en el Experimento III y cumplió la misma finalidad de obtener un criterio clasificatorio de los animales según su nivel de ansiedad, entendido según su tiempo permanencia en los brazos abiertos del laberinto elevado. La clasificación de los animales siguió el procedimiento descrito por Ho y colaboradores (2002) aunque se añadió un grupo de ansiedad moderada, tanto para animales aislados como agrupados. Los animales aislados se asignaron aleatoriamente a tres subgrupos: 1) ratones con alto nivel de ansiedad (28 animales con el porcentaje más bajo de tiempo pasado en los brazos abiertos) (Media = $19,52 \pm 7,74$); 2) ratones con un nivel moderado de ansiedad (28 animales con los porcentajes intermedios) (Media =

45,58 ± 2,32); 3) ratones con un bajo nivel de ansiedad (28 animales con el mayor porcentaje de tiempo pasado en los brazos abiertos) (Media = 65,61 ± 5,95). De la misma manera, los agrupados se clasificaron como: 1) ratones de alta ansiedad (28 animales con el porcentaje más bajo de tiempo pasado en brazos abiertos) (Media = 14,15 ± 8,08); 2) ratones de ansiedad moderada (28 animales con porcentajes intermedios) (Media = 38,81 ± 2,51); 3) ratones con alto nivel de ansiedad (28 ratones que mostraron los porcentajes más altos) (Media = 61 ± 7,98) (ver Tabla 4-1).

Tabla 4-1: Grupos resultantes después de la clasificación por el nivel de ansiedad (según el porcentaje de tiempo pasado en los brazos abiertos del laberinto elevado).

Alojamiento	% TBA	Ansiedad	Grupo	N
Aislados	>25%	ALTA	AIS/AA	28
Agrupados	>25%	ALTA	AGR/AA	28
Aislados	45-50%	MODERADA	AIS/MA	28
Agrupados	35-40%	MODERADA	AGR/MA	28
Aislados	>60%	BAJA	AIS/BA	28
Agrupados	>60%	BAJA	AGR/BA	28

Cada uno de los grupos se asignó a un tratamiento farmacológico: nicotina (0,35 mg/kg) o suero fisiológico resultando los grupos descritos en la Figura 4-2. Como se observa en la Figura 4-1 A y B, las diferencias entre aislados y agrupados son debidas a su distribución del tiempo en brazos abiertos distinta entre ellos. La distribución de los animales agrupados se asemeja mucho a la curva normal, como sucedió en el Experimento III. No ha sucedido así con la irregular distribución de los animales aislados donde se aprecia que bastantes animales permanecieron entre un 65-70% del tiempo en los brazos abiertos del laberinto y, en cambio, pocos pasaron un tiempo intermedio en estos brazos.

CLASIFICACIÓN SEGÚN EL NIVEL DE ANSIEDAD

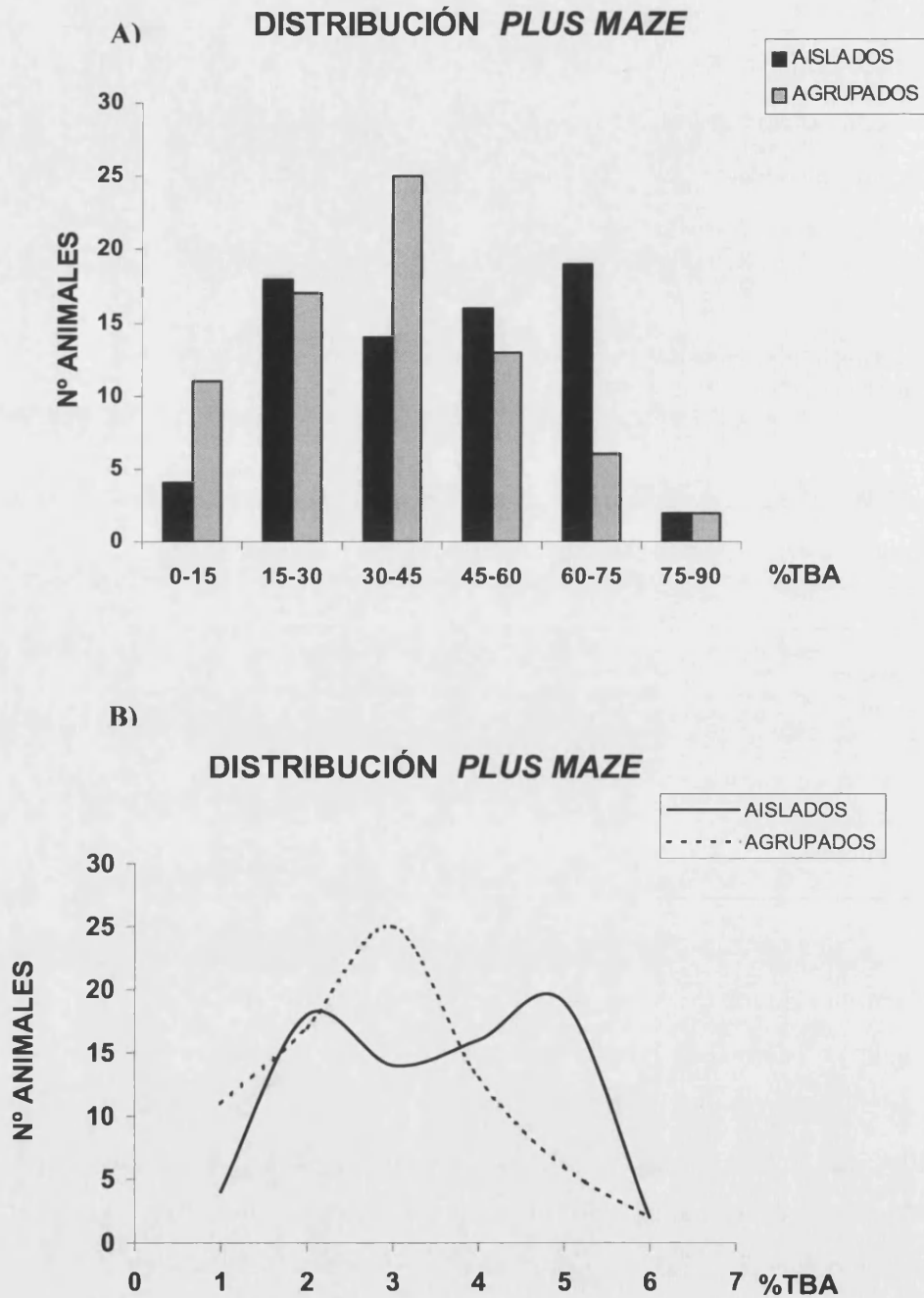


Figura 4-1: Distribución de los ratones NMRI macho aislados y agrupados según su nivel de ansiedad en el laberinto elevado en forma de cruz (% tiempo en brazos abiertos).

A) Gráfica de barras con las frecuencias de distribución en cada intervalo de porcentaje de tiempo en brazos abiertos.

B) Gráfica de líneas en la que se aprecia la forma de la distribución según el porcentaje de tiempo en brazos abiertos.

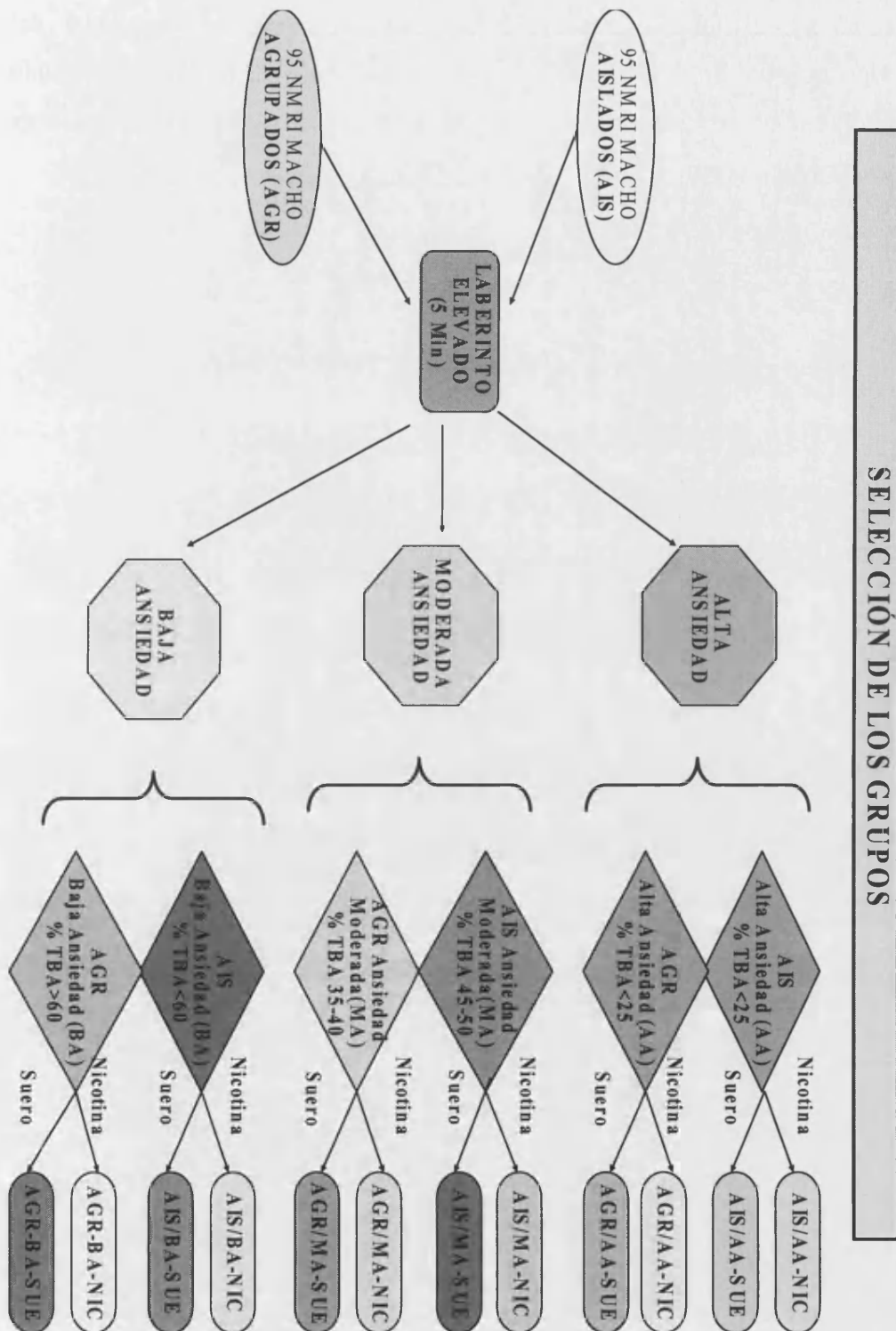


Figura 4-2: Grupos resultantes después de la pre-selección en el laberinto elevado de los ratones macho NMRI y su asignación al tratamiento farmacológico correspondiente.

3.-Condicionamiento de evitación activa: 7 días después de la pre-selección en el laberinto elevado, los animales realizaron la prueba del condicionamiento de evitación activa de doble sentido. El procedimiento seguido fue similar al descrito en el Experimento III (excepto en la prueba de aprendizaje empleada) y se muestra en la Figura 4-3.

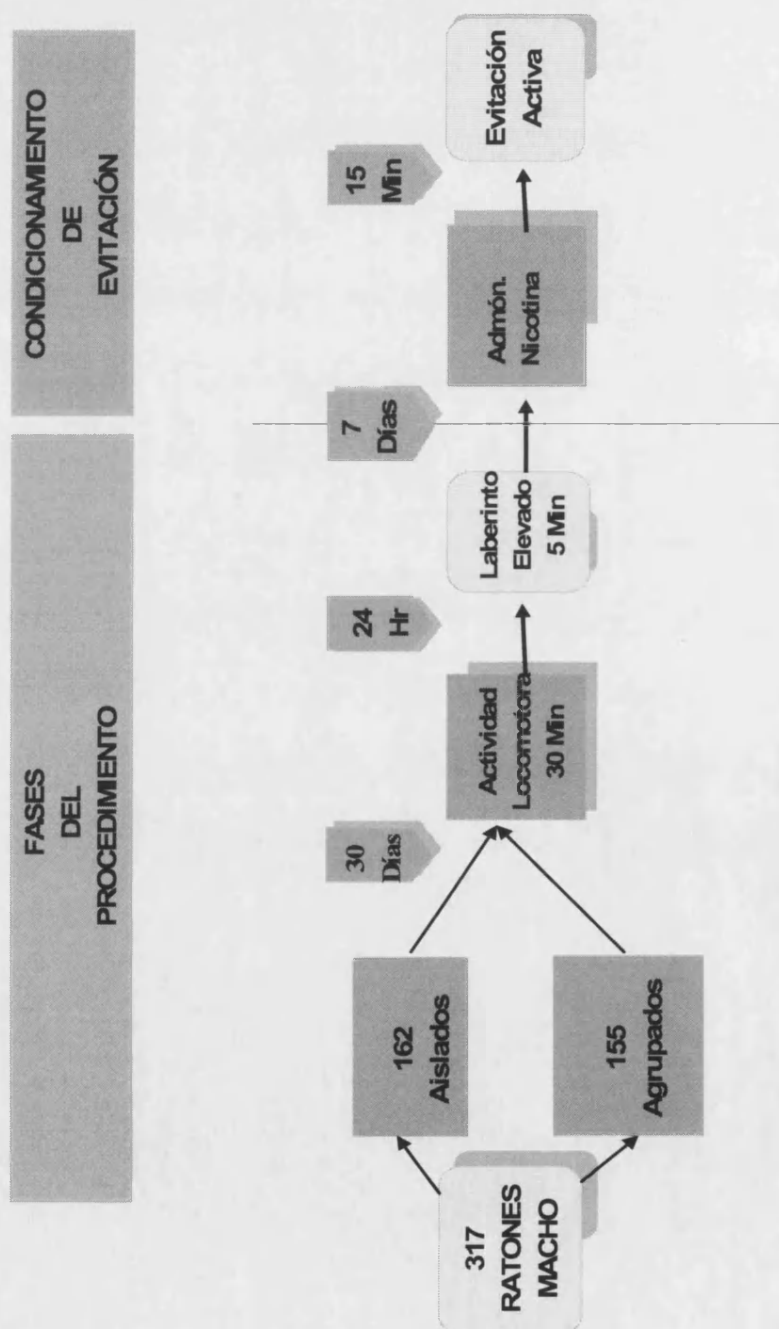


Figura 4-3: Fases y procedimiento seguido en el presente experimento.

FÁRMACO

Los animales experimentales recibieron tratamiento farmacológico con 0,35 mg/kg en forma de base de nicotina. El grupo control recibió suero fisiológico. Ambas sustancias fueron administradas subcutáneamente en un volumen de 10 ml/kg, 10 minutos antes de la ejecución de la tarea durante 5 días (ver Figura 4-4). Como ya se ha observado en la figura 4-2 los grupos vienen determinados por las condiciones de Alojamiento (Aislado/Agrupado) y por el Tratamiento (Nicotina o Vehículo).

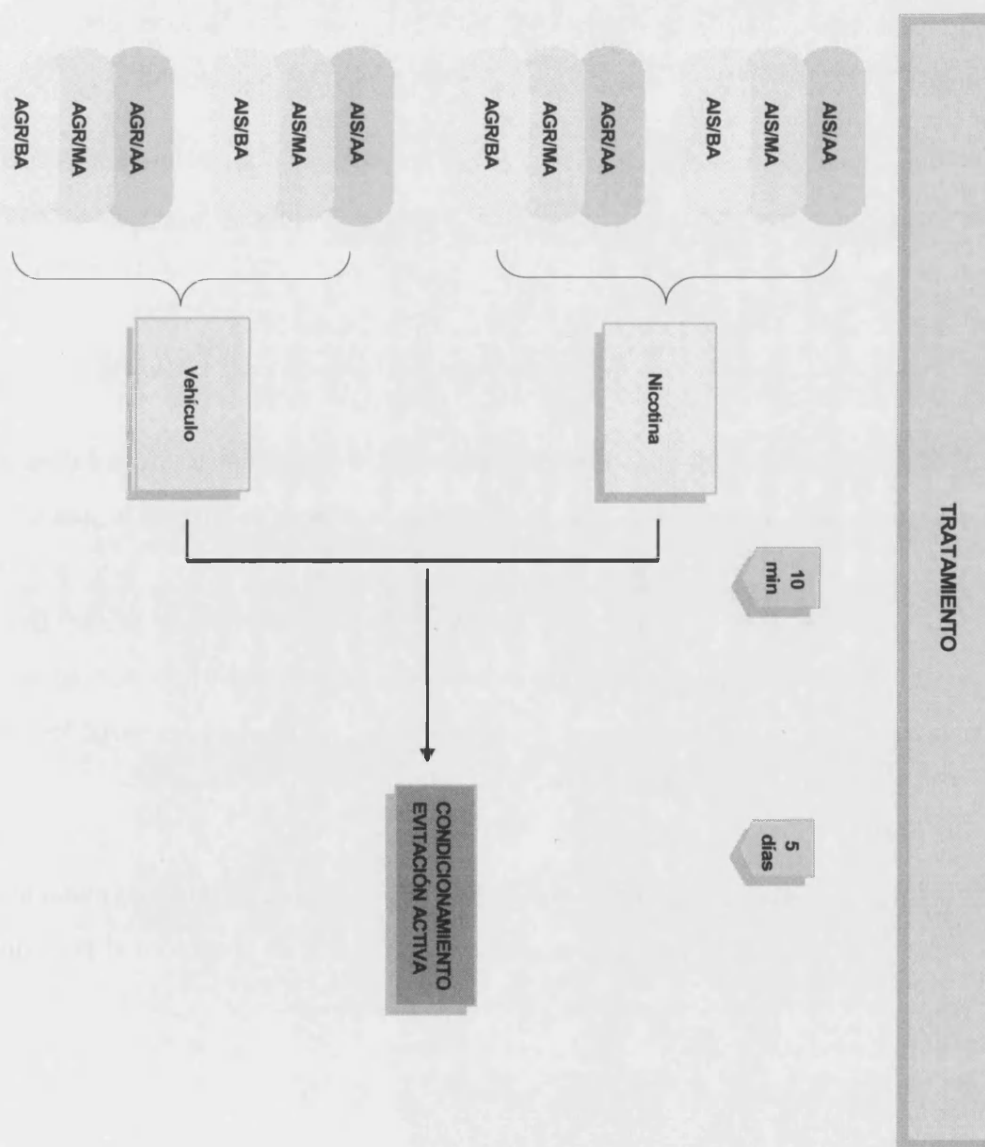


Figura 4-4: Procedimiento seguido en la administración del tratamiento farmacológico.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

1.- Actividad motora: se realizó un ANOVA de una vía tomando como variable dependiente el índice global de actividad y dos variables entre-sujeto: el factor Alojamiento (con 2 niveles: Aislado y Agrupado) y el factor Ansiedad [con 3 niveles: alta ansiedad (AA), moderada (MA) y baja (BA)].

Para evaluar la información relativa a cada momento temporal, se realizó un ANOVA de medidas repetidas con el factor intra-sujeto Muestra (6 niveles, correspondientes a cada muestra de 5 minutos) y con dos factores entre-sujeto: Alojamiento y la variable Ansiedad, con los niveles antes mencionados.

En los casos apropiados se realizaron pruebas post-hoc (Newman-Keuls) o bien comparaciones con el ajuste de Sidak. Cuando las interacciones alcanzaron la significación estadística se procedió a la realización de ANOVAs de las mismas. Se consideró $p < 0.05$ como nivel de significación estadística.

2.- Condicionamiento de evitación activa: en la adquisición de la tarea de *shuttle box* para evaluar las posibles diferencias entre los grupos se realizó un ANOVA de medidas repetidas tomando en consideración como factores entre-sujetos las variables Alojamiento, Tratamiento y Ansiedad; el factor Día se consideró una variable intra-sujeto. Las comparaciones post-hoc pertinentes se realizaron con la prueba estadística Newman-Keuls o Tukey en las variables intra-sujeto y Sidak en las variables entre-sujeto.

En cada sesión se analizaron las siguientes variables: número de evitaciones, escapes y no respuestas; latencia de respuesta; número de cruces en el período de adaptación y entre ensayos; defecaciones y peso corporal.

Además, el mismo tratamiento estadístico fue aplicado a una medida para obtener el porcentaje real de aprendizaje, que calculamos aplicando la siguiente fórmula, al igual que en el experimento III:

$$\text{Evitaciones}/(\text{evitaciones} + \text{escapes} + \text{cruces en el ITI}) \times 100$$

La medida obtenida corresponde al porcentaje de evitaciones realizadas en la adquisición de la tarea desde el nº total de respuestas posibles (evitaciones + escapes + cruces = 100%) (Vinader-Caerols y cols., 1996; Aguilar y cols., 1998).

4.2.- RESULTADOS

1.- Actividad motora: se describirán los resultados para los dos tipos de análisis realizados: el global y el que contempla las 6 muestras temporales.

1.1- Análisis global de la actividad motora: El ANOVA realizado para el total de las cuentas de actividad señaló que el Alojamiento ejercía un efecto significativo en los animales aislados y agrupados en cuanto a su nivel de actividad [$F(1,139)=37,33$; $p>0.001$]. La prueba post-hoc indicó que los animales aislados se movieron significativamente más que los animales agrupados (ver Figura 4-5 A).

La interacción entre los factores Alojamiento x Ansiedad [$F(2,139)=4,86$ $p<0.01$] también resultó significativa. La prueba de efectos simples realizada para esta interacción [$F(1,41)=19,96$; $p<0.001$] señala que las diferencias son debidas a los ratones con baja ansiedad (BA); los aislados de baja ansiedad (AIS/BA) realizaron una media de 2417,64 cuentas y los agrupados de baja ansiedad (AGR/BA) disminuyeron su actividad hasta 1436,33 cuentas. En ratones con ansiedad moderada (MA) y alta ansiedad (AA) no se apreciaron diferencias en su actividad motora espontánea (Figura 4-6 A).

1.2- Análisis de las 6 muestras temporales: el factor Alojamiento resultó significativo [$F(1,139)=11,04$; $p<0.001$]. Las comparaciones post-hoc señalaron que los aislados realizaron más cuentas de actividad que los agrupados.

También fue significativo el factor Muestra [$F(5,695)=82,41$; $p<0.001$]. Las comparaciones a posteriori nos indicaron que los animales estuvieron más activos durante los 15 primeros minutos del test (las 3

primeras muestras) y señalaron un claro patrón descendente en el movimiento de los animales a través del tiempo (ver Figura 4-5 B).

La interacción entre los factores Alojamiento x Ansiedad [$F(2,139)=4,86$; $p<0.01$] fue significativa y al igual que hemos comentado anteriormente las diferencias parecen provocadas por los animales de baja ansiedad (BA) en los que sí hay diferencias entre aislados y agrupados que no se observan en los animales de ansiedad moderada (MA) o de alta ansiedad (AA) (ver Figura 4-6 A).

La interacción de los factores Alojamiento x Muestra, también resultó significativa [$F(5,695)=2,60$; $p<0.05$]. La prueba de efectos simples realizada confirma que en los animales agrupados el patrón es claramente descendente; en los animales aislados, en cambio, se produce un pico descendente en el momento temporal 5 (20-25 min.) para más adelante en la última muestra (25-30 min.) mostrar una recuperación de la actividad (ver Figura 4-6 B).

ACTIVIDAD MOTORA

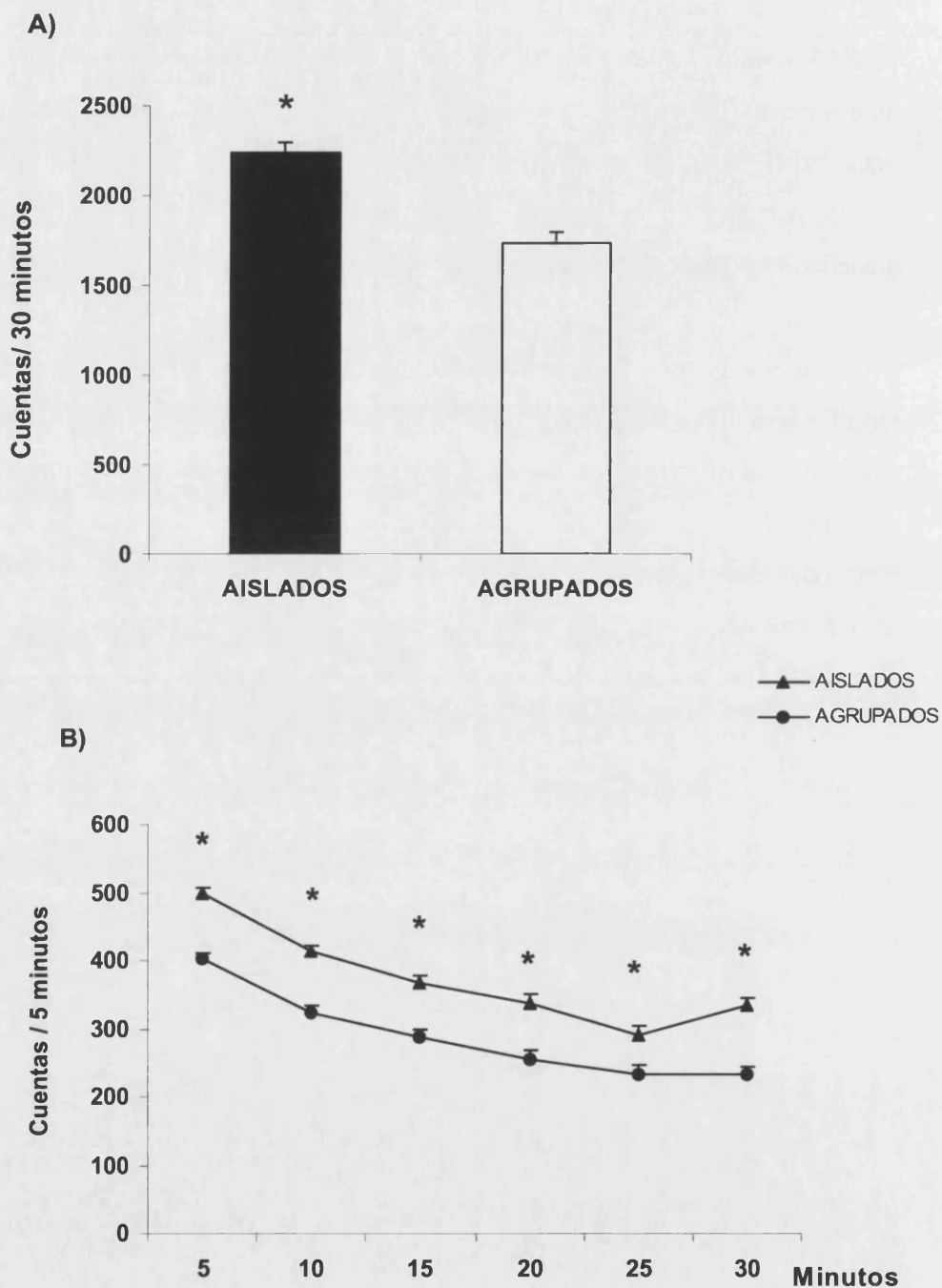


Figura 4-5: Medias (\pm SEM) de la actividad motora mostrada por ambos grupos de ratones NMRI: AISLADOS ($n=162$) y AGRUPADOS ($n=155$).

A) Cuentas totales para los 30 min. * $p<0.001$ Aislados vs Agrupados

B) Cuentas para cada periodo temporal de 5 min. * $p<0.001$ Aislados vs Agrupados

ACTIVIDAD MOTORA

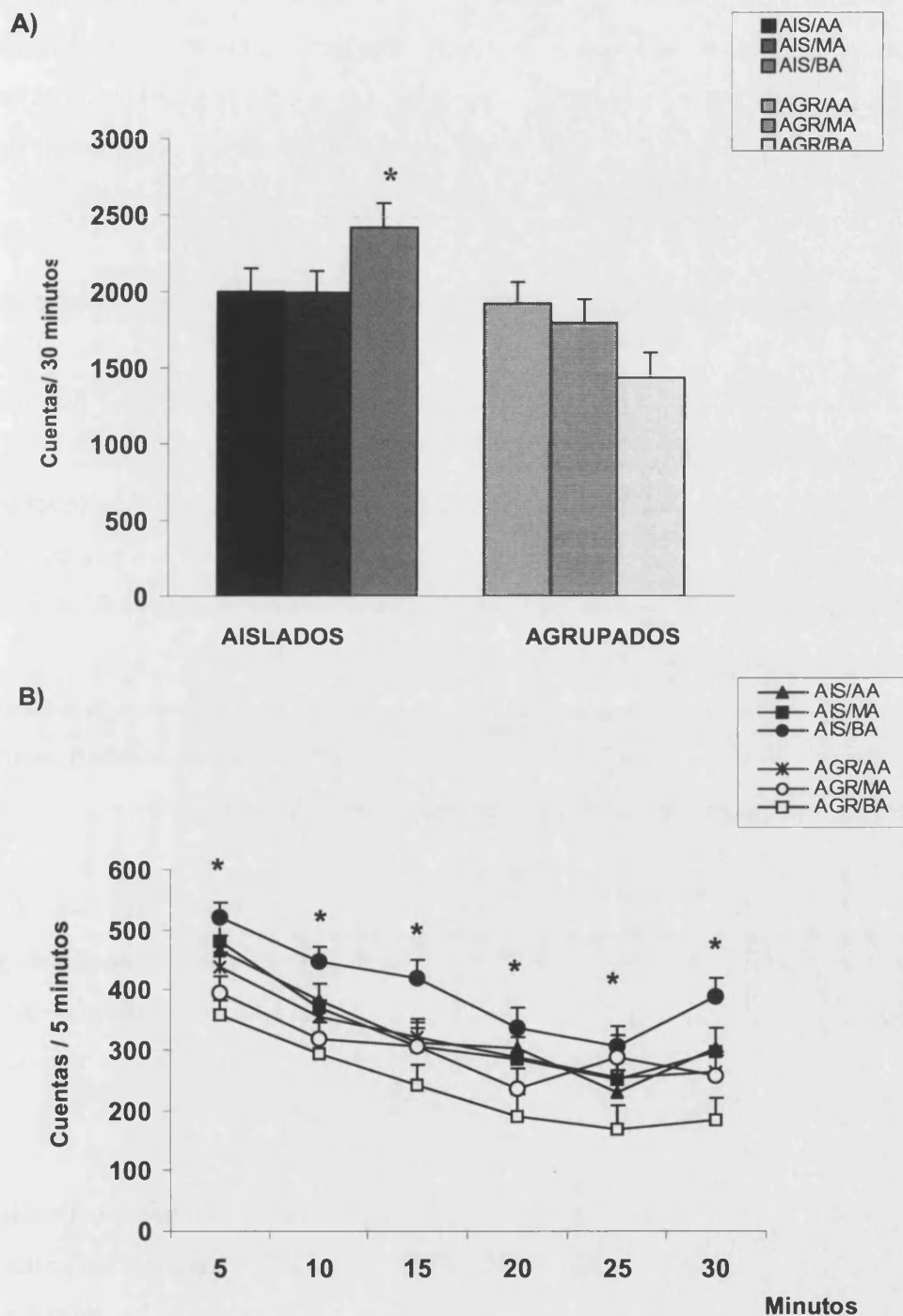


Figura 4-6: Medias (\pm SEM) de actividad motora para los 6 grupos de ratones NMRI en cada una de las condiciones de ALOJAMIENTO: AISLADOS: (AIS/AA; AIS/MA; AIS/BA) y AGRUPADOS: (AGR/AA; AGR/MA; AGR/BA).

A) Cuentas totales para los 30 min. * $p < 0.001$ AIS/BA vs AGR/BA

B) Cuentas para cada periodo temporal de 5 min. * $p < 0.001$ AIS/BA vs AGR/BA

2.- Condicionamiento de evitación activa:

Se realizó un ANOVA de medidas repetidas con los factores Alojamiento, Tratamiento y Ansiedad para cada una de las medidas incluidas en el presente experimento: evitaciones, escapes, no respuestas, latencia de respuesta, cruces en la adaptación, cruces en el ITI, peso y defecaciones, así como para el porcentaje de aprendizaje (ver Tabla 4-2).

1) **Evitaciones:** Al realizar el análisis de varianza el factor Alojamiento resultó significativo [$F(1,133)=21,49$; $p<0.001$]. Los análisis post-hoc muestran que los animales aislados realizaron un mayor número de evitaciones que los animales agrupados (Figura 4-7).

El factor Día [$F(4,532)=31,58$; $p<0.001$] resultó significativo. Las pruebas post-hoc indican que el día 1, los animales realizaron menos evitaciones que el resto de días; los animales fueron aprendiendo a evitar el *shock* hasta el día 4 en el que parece que alcanzan la cota máxima (Figura 4-8).

La interacción Tratamiento x Alojamiento x Ansiedad resultó significativa [$F(2,133)=4,66$ $p<0.01$]. Para conocer los efectos de esta interacción, realizamos un ANOVA de los animales aislados y agrupados separadamente:

-En el ANOVA para la 'Condición Aislados' no se apreció un efecto del Tratamiento, aunque sí hubo una interacción significativa entre Tratamiento y Ansiedad [$F(2,65)=4,05$; $p<0.05$]. En el grupo de ratones de ansiedad moderada (MA), los animales tratados con nicotina realizaron más evitaciones que los tratados con suero fisiológico.

-En el ANOVA para la 'Condición Agrupados' el factor Tratamiento alcanzó la significación estadística [$F(1,68)=4,84$; $p<0.05$]. Los animales agrupados tratados con nicotina realizaron un menor número de evitaciones que los animales controles.

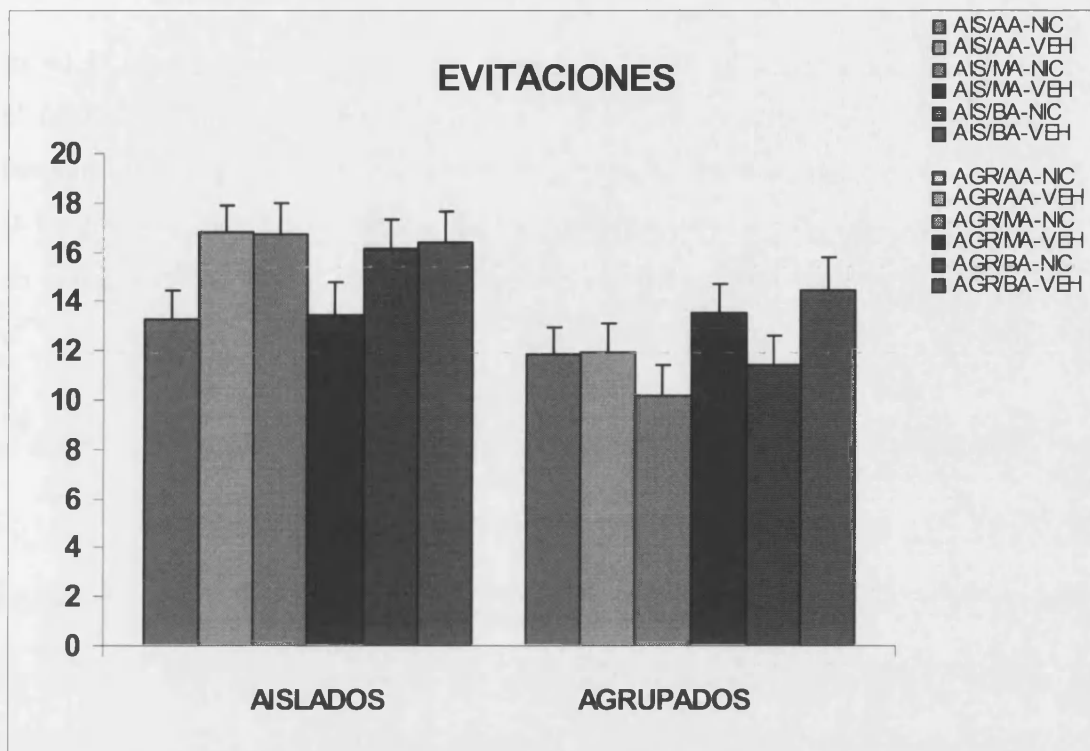


Figura 4-7: Media (\pm SEM) de las EVITACIONES realizadas durante la adquisición del condicionamiento de evitación activa en ratones NMRI que difieren en su condición de alojamiento y en su nivel basal de ansiedad.

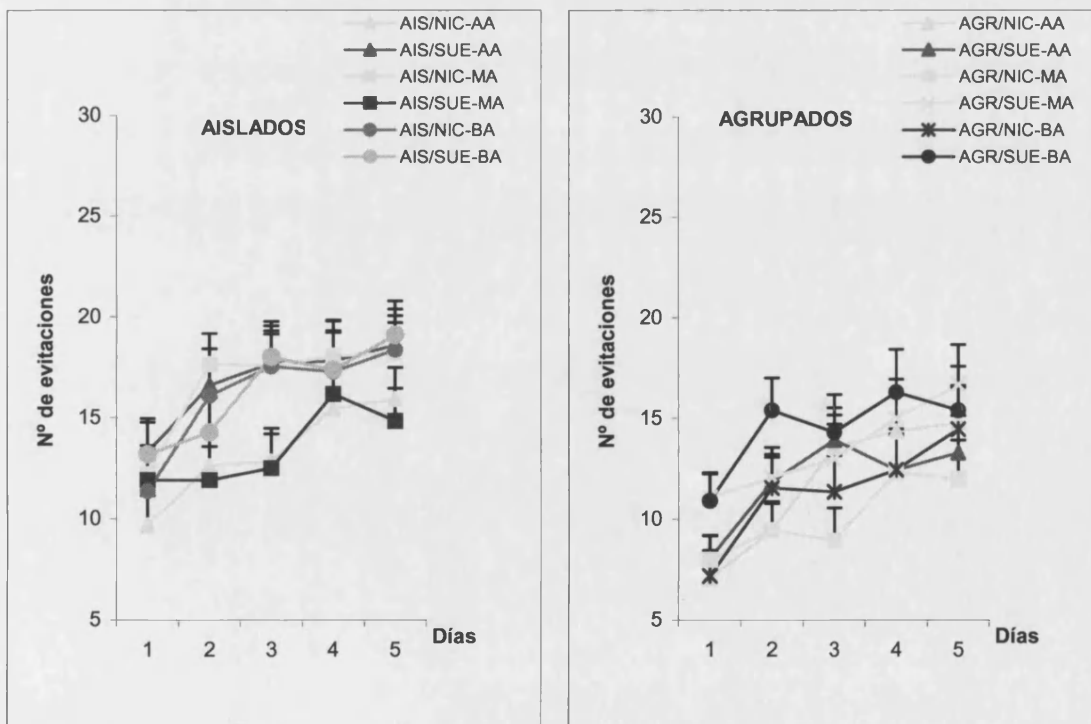


Figura 4-8: EVITACIONES realizadas durante los 5 días de adquisición del condicionamiento de evitación activa por los ratones NMRI aislados y agrupados

2) **Escapes:** el ANOVA no arrojó resultados significativos para el factor Alojamiento. Sin embargo, el factor Día [$F(4,532)=6,02$; $p>0.001$] alcanzó la significación estadística indicando que los animales van aprendiendo a escapar del EI hasta el cuarto día, en el que llegaron al número máximo de escapes (Figura 4-10). No se encontraron diferencias en los escapes realizados según el nivel de ansiedad (ver Figura 4-9).

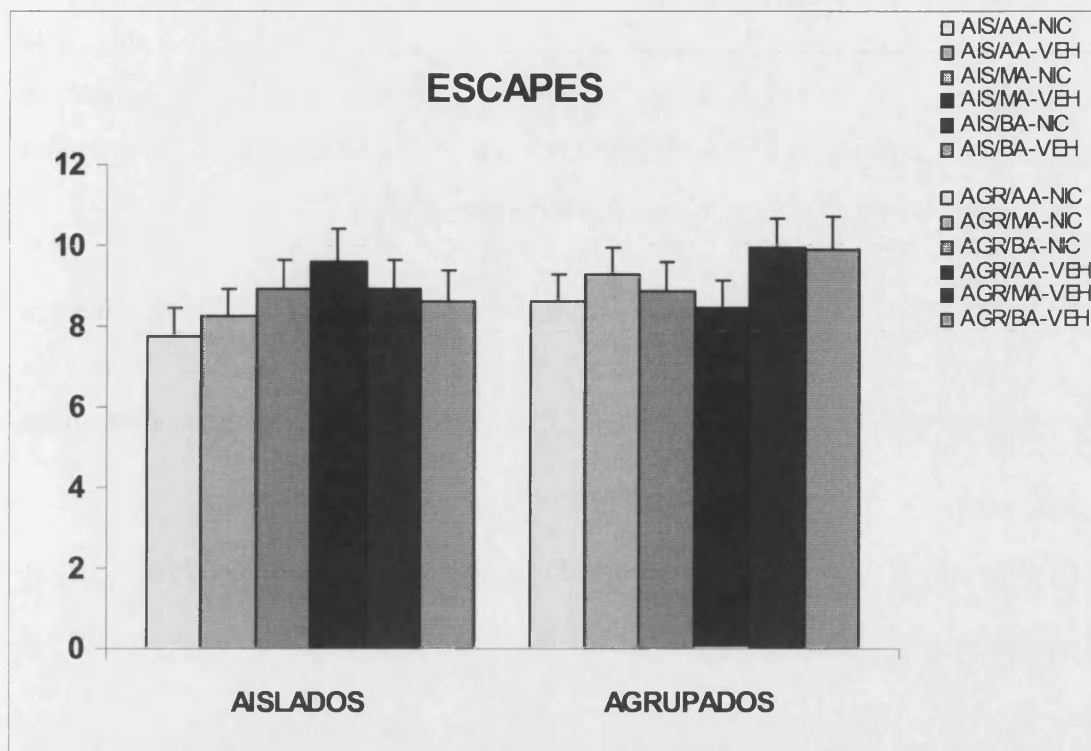


Figura 4-9: Media (\pm SEM) de los ESCAPES realizadas durante la adquisición del condicionamiento de evitación activa en ratones NMRI que difieren en su condición de alojamiento y en su nivel basal de ansiedad.

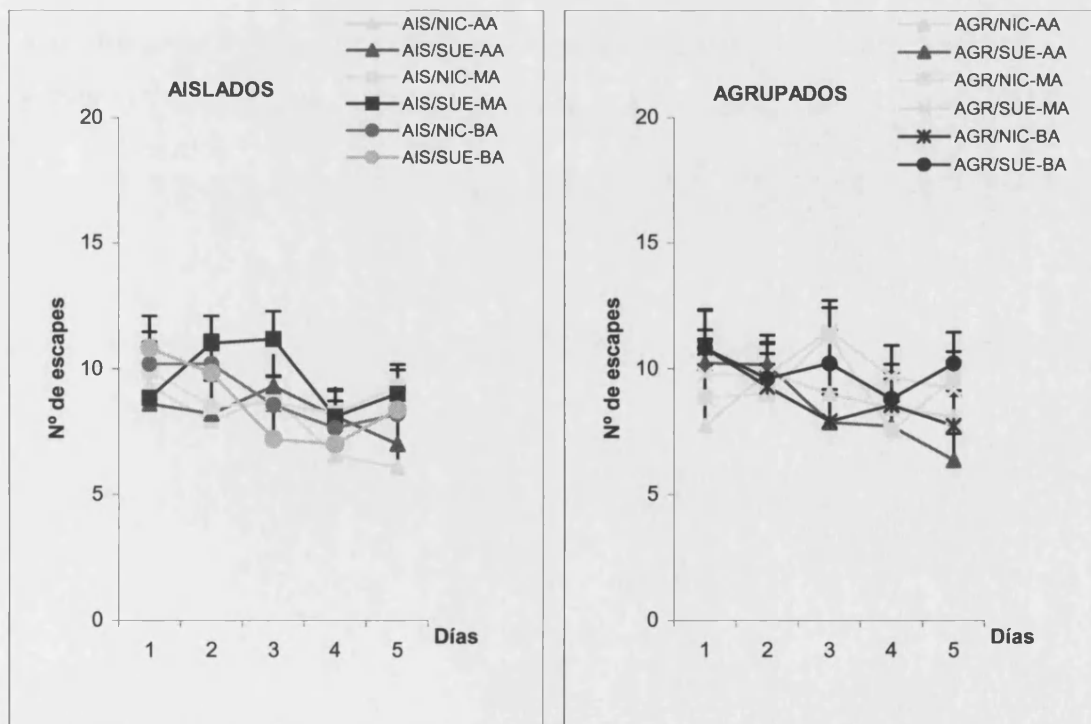


Figura 4-10: ESCAPES realizadas durante los 5 días de adquisición del condicionamiento de evitación activa por los ratones NMRI aislados y agrupados.

3) **No respuestas:** el factor Alojamiento resultó significativo [F(1,133)=10,68; p<0.001]. Los animales agrupados respondieron menos a la prueba que los animales aislados (Figura 4-11). Para el factor Día también se encontraron diferencias [F(4,532)=20,56; p<0.001] indicando que los animales respondieron más a medida que pasaban los días (Figura 4-12).

La interacción Tratamiento x Alojamiento x Ansiedad resultó significativa [F(2, 133)=3,57; p<0.05] y se realizaron ANOVAs por separado para cada condición de Alojamiento con el fin de poder explicar los efectos de dicha interacción:

-**Condición Aislados:** No hubo efectos del factor Tratamiento, pero la interacción Tratamiento x Ansiedad sí alcanzó la significación estadística [F(2,65)=3.57; p<0.05]. En la prueba de efectos simples se observa que, dentro del grupo de animales tratados con nicotina, los de alta ansiedad mostraron mayor número de no respuestas que los de ansiedad moderada o baja. En los animales control el factor Ansiedad no resultó significativo.

-**Condición Agrupados:** El factor Tratamiento resultó significativo [F(1,68)=4.01; p<0.05] y las pruebas post-hoc indicaron que los animales tratados con nicotina tuvieron un mayor número de no respuestas que los controles.

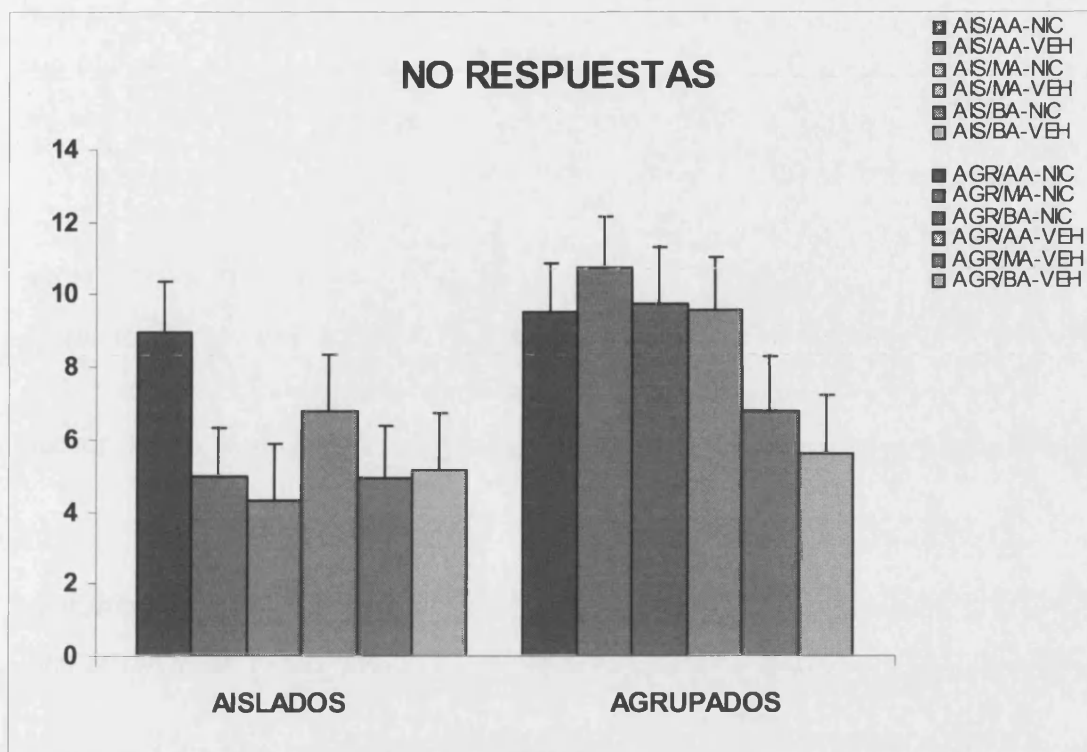


Figura 4-11: Media (\pm SEM) de las NO RESPUESTAS realizadas durante la adquisición del condicionamiento de evitación activa en ratones NMRI que difieren en su condición de alojamiento y en su nivel basal de ansiedad.

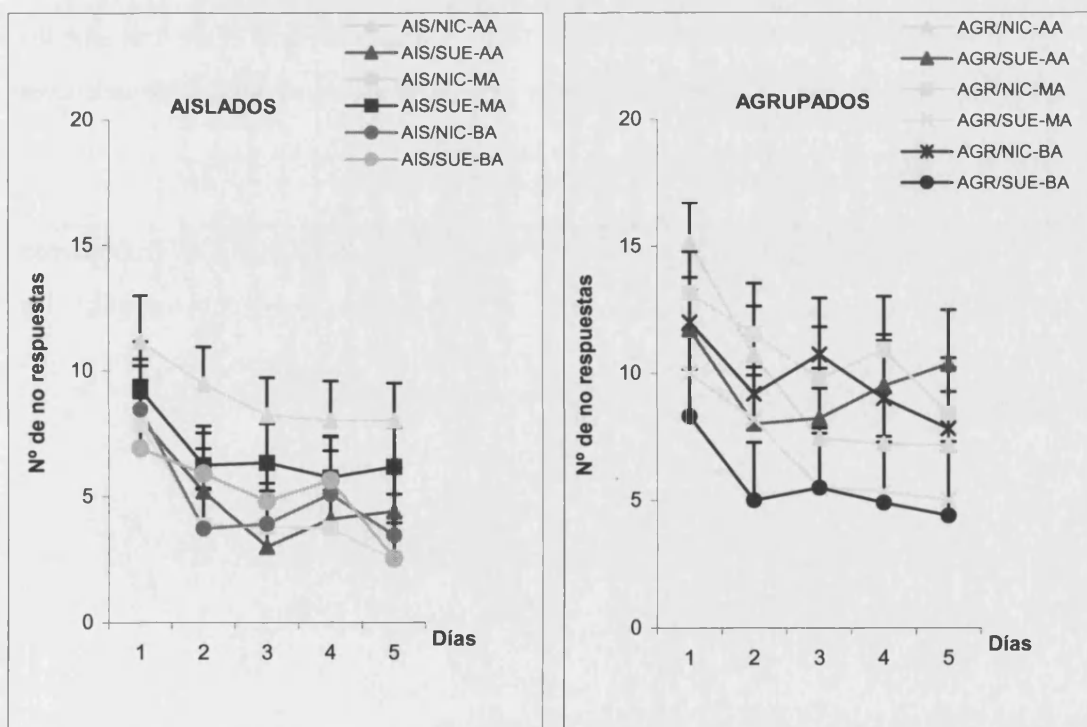


Figura 4-12: NO RESPUESTAS realizadas durante los 5 días de adquisición del condicionamiento de evitación activa por los ratones NMRI aislados y agrupados.

4) **Latencia de respuesta:** El ANOVA indicó que había diferencias según el Alojamiento [$F(1,133)=16,5$; $p<0.001$]. La prueba de Newman-Keuls señaló que los animales aislados tardaron menos tiempo en responder al EC o al EI que los animales agrupados (Figura 4-14).

El factor Día también alcanzó la significación estadística [$F(4,532)=34,63$; $p<0.001$]. Las pruebas post-hoc señalaron que la latencia de respuesta disminuyó a medida que pasaba el tiempo, pero a partir del tercer día no se observaron diferencias en el tiempo de reacción al estímulo condicionado o incondicionado (Figura 4-13).

La interacción Tratamiento x Alojamiento x Ansiedad resultó significativa [$F(2,133)=4,23$; $p<0.05$]. Para evaluar sus efectos, realizamos un análisis para cada factor de alojamiento:

-En la 'Condición Aislados' no se encontró un efecto del factor Tratamiento. La interacción Tratamiento x Ansiedad alcanzó la significación estadística [$F(2,65)=3,53$; $p<0.05$] pero en los efectos simples para cada tratamiento farmacológico no se encontraron diferencias significativas dependiendo del nivel de ansiedad.

-En la 'Condición Agrupados' se hallaron diferencias según el Tratamiento [$F(1,68)=4,01$; $p<0.05$]. La prueba de Newman-Keuls señaló que los animales agrupados tratados con nicotina tardaron significativamente más en responder que los animales agrupados tratados con suero.

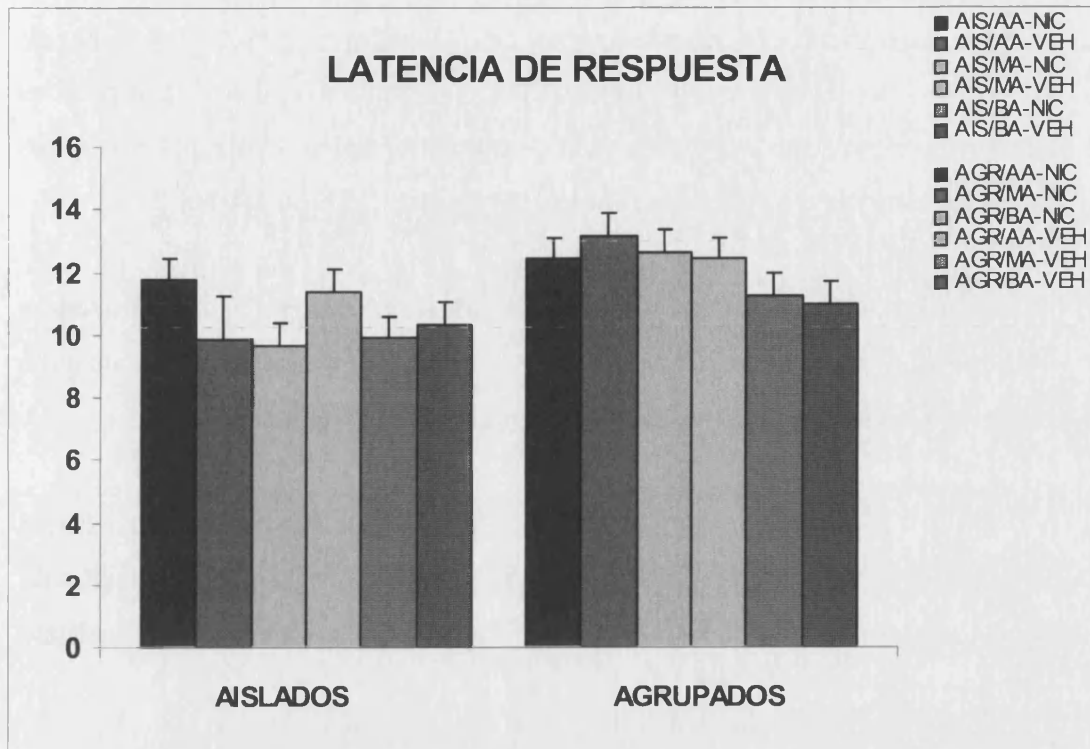


Figura 4-13: Media (\pm SEM) de la LATENCIA DE RESPUESTA durante la adquisición del condicionamiento de evitación activa en ratones NMRI que difieren en su condición de alojamiento y en su nivel basal de ansiedad.

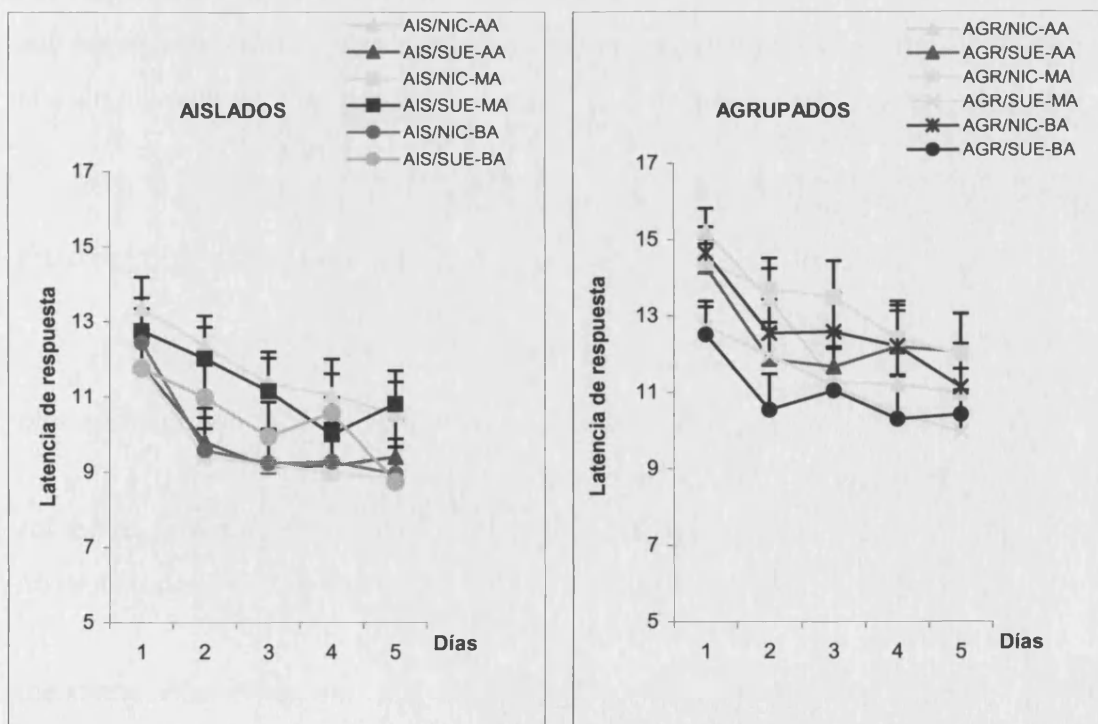


Figura 4-14: LATENCIA DE RESPUESTA durante los 5 días de adquisición del condicionamiento de evitación activa por los ratones NMRI aislados y agrupados.

5) Cruces en la adaptación: El ANOVA indicó que había diferencias entre los animales dependiendo de las condiciones de Alojamiento durante el período de adaptación a la caja de evitación (3 min.) [$F(1,133)=28,29$; $p<0.001$]. Las pruebas post-hoc de Newman-Keuls indican que los animales aislados cruzaron más veces de un compartimento a otro de la caja que los agrupados (Figura 4-16).

El factor Día [$F(4,532) =39,04$; $p<0.001$] resultó significativo; pruebas a posteriori señalaron que el primer día los animales respondieron a la situación novedosa cruzando más veces que el resto de los días (Figura 4-15).

El ANOVA también señaló diferencias dependiendo del nivel de Ansiedad [$F(3,133)=4,22$; $p<0.05$]. La prueba de Newman-Keuls mostró que los animales de alta ansiedad cruzaron menos veces en la adaptación que los animales de ansiedad moderada. (Figura 4-16).

La interacción Día x Tratamiento resultó significativa [$F(4,532)=10,79$; $p<0.001$]. Los efectos simples de la interacción señalaron que hubo diferencias entre los animales tratados con nicotina y los tratados con suero fisiológico los días 1, 4 y 5 del test. El primer día los animales control cruzaron más que los animales tratados con nicotina. Sin embargo, durante el cuarto y quinto día fue a la inversa, cruzaron significativamente más los que habían recibido fármaco.

La interacción Día x Tratamiento x Ansiedad [$F(8,532)=2,30$; $p<0.05$] resultó significativa; los efectos simples realizados mostraron que:

-En la 'Condición Alta Ansiedad', los ratones tratados con nicotina sólo efectuaron más cruces el día 1.

-En la 'Condición Ansiedad Moderada', el día 1 realizaron más cruces los animales del grupo control pero el día 4 y 5 cruzaron más los tratados con nicotina.

-En la 'Condición Baja Ansiedad', el día 1 los ratones tratados con suero fisiológico cruzaron más que los tratados con nicotina.

El ANOVA realizado separadamente con aislados y agrupados mostró lo siguiente:

-‘Condición Aislados’: El factor Tratamiento alcanzó la significación estadística [$F(1,65)=5,33$; $p<0.05$]. La prueba post-hoc Newman-Keuls señala que los animales tratados con nicotina realizaron más cruces durante el periodo de adaptación que los ratones control. También encontramos un efecto significativo del factor Ansiedad [$F(2,37)=3,37$; $p<0.05$]. Los animales aislados de alta ansiedad realizaron menos cruces que los aislados de ansiedad moderada.

-‘Condición Agrupados’: No se hallaron diferencias para esta condición de alojamiento en ninguno de los tres factores analizados ni en sus interacciones.

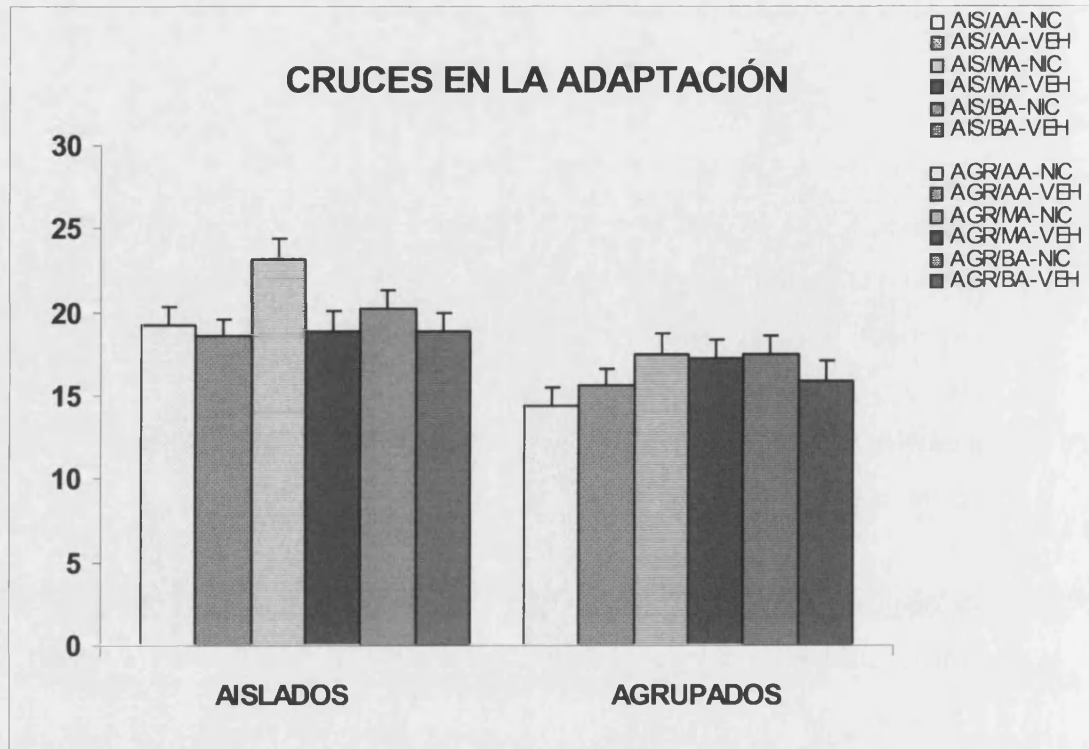


Figura 4-15: Media (\pm SEM) los CRUCES DURANTE LA ADAPTACIÓN realizados durante la adquisición del condicionamiento de evitación activa en ratones NMRI que difieren en su condición de alojamiento y en su nivel basal de ansiedad.

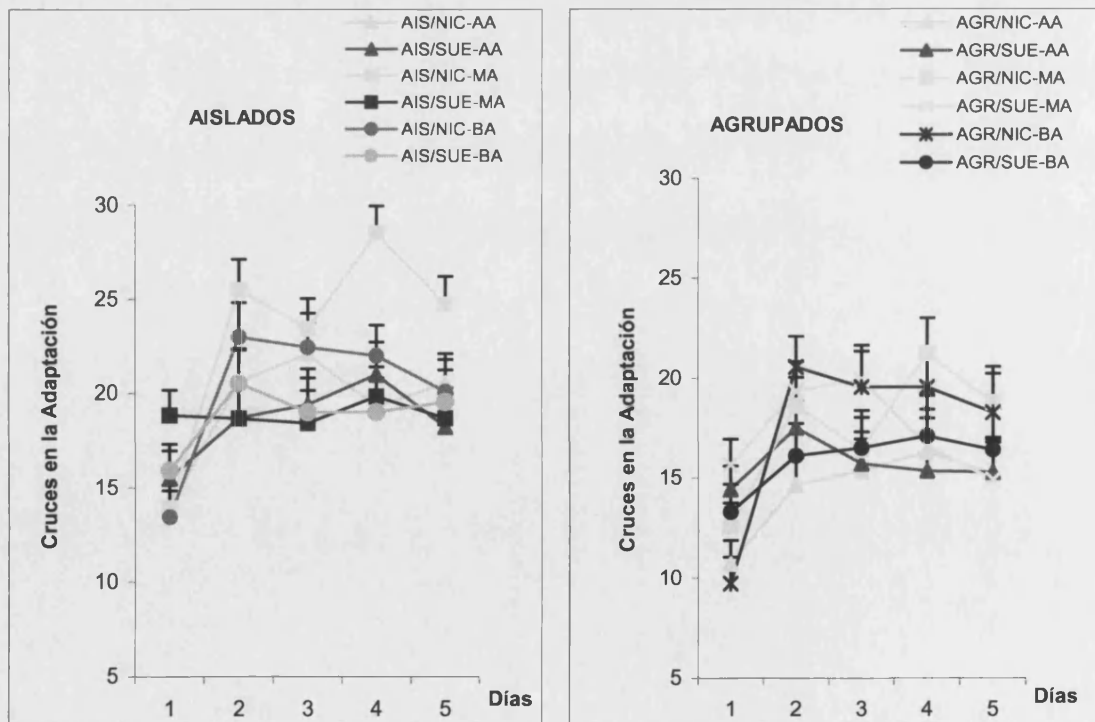


Figura 4-16: CRUCES EN LA ADAPTACIÓN durante los 5 días de adquisición del condicionamiento de evitación activa por los ratones NMRI aislados y agrupados.

6) Cruces en el ITI: El factor Alojamiento resultó significativo [F(1, 133)=44,60; p<0.001]. Las comparaciones mostraron que los animales aislados realizaron significativamente más cruces entre ensayos que los animales agrupados (Figura 4-18).

Para el factor Día también se encontraron diferencias significativas [F(4,532) =10,84; p<0.001]. Comparaciones a posteriori señalan que a medida que van pasando los días los animales van aprendiendo a cruzar más veces durante el ITI (Figura 4-17).

La interacción Tratamiento x Alojamiento x Ansiedad resultó significativa [F(2,133)=5,00; p<0.01]. El análisis para cada condición de alojamiento señaló que:

- 'Condición Aislados': la variable Tratamiento no resultó significativa; sí lo fue la interacción Tratamiento x Ansiedad [F(2,133)=3,03; p<0.05]. El análisis posterior para detectar los efectos de la interacción señala que los ratones de ansiedad intermedia tratados con nicotina realizaron un mayor número de cruces en este periodo que los ratones clasificados de alta ansiedad tratados con nicotina.

- 'Condición Agrupados': no se hallaron diferencias en el nivel de ansiedad y tampoco en el tratamiento con nicotina.

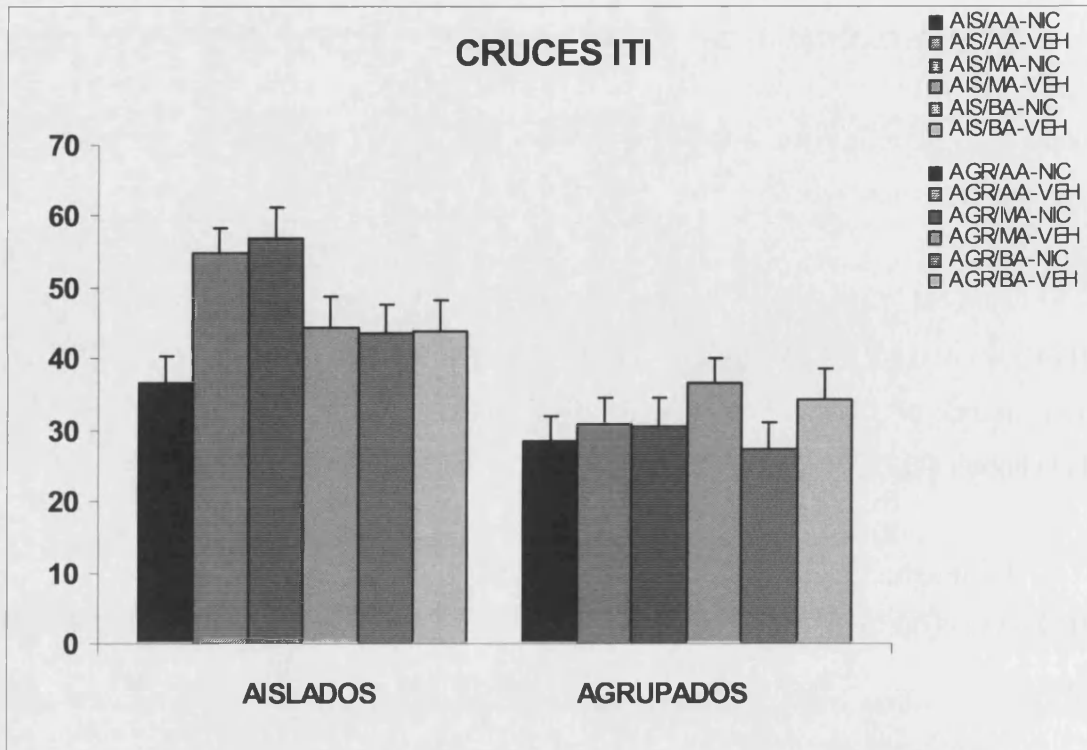


Figura 4-17: Media (\pm SEM) de los CRUCES DURANTE el ITI realizados durante la adquisición del condicionamiento de evitación activa por ratones NMRI que difieren en su condición de alojamiento y en su nivel basal de ansiedad.

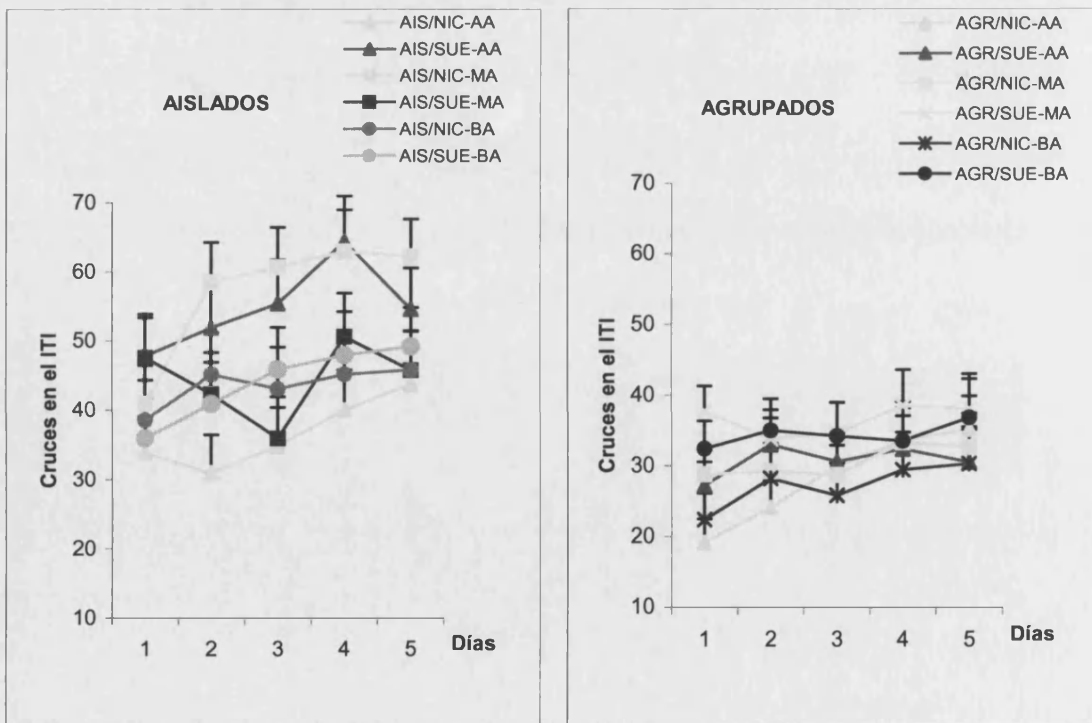


Figura 4-18: CRUCES EN EL ITI durante los 5 días de adquisición del condicionamiento de evitación activa por los ratones NMRI aislados y agrupados.

7) **Defecaciones:** El factor Alojamiento resultó significativo [F(1,133)=4,90; p<0.05] y las pruebas post-hoc indicaron que los animales aislados tuvieron un menor número de defecaciones que los animales agrupados (Figura 4-20).

Encontramos también diferencias en las defecaciones de los animales en función del Tratamiento [F(1,133)=15,41; p<0.001]. Los animales tratados con nicotina tuvieron significativamente un menor número de defecaciones que los tratados con suero fisiológico (Figura 4-19).

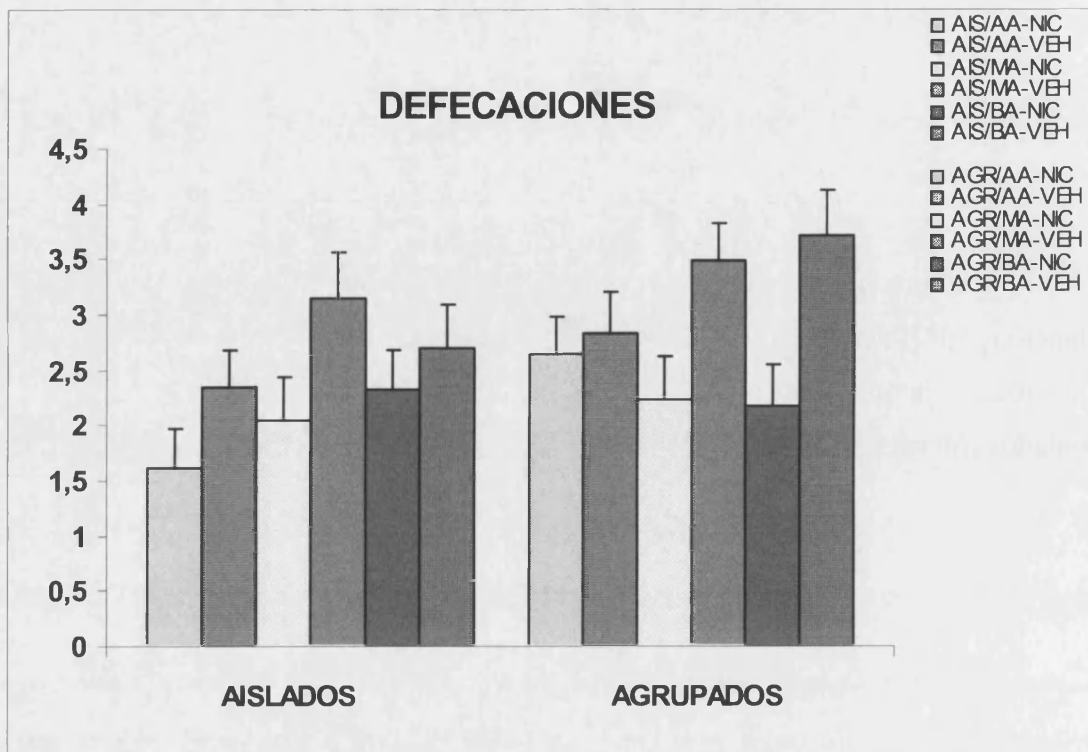


Figura 4-19: Media (\pm SEM) de las DEFECACIONES durante la adquisición del condicionamiento de evitación activa en ratones NMRI que difieren en su condición de alojamiento y en su nivel basal de ansiedad.

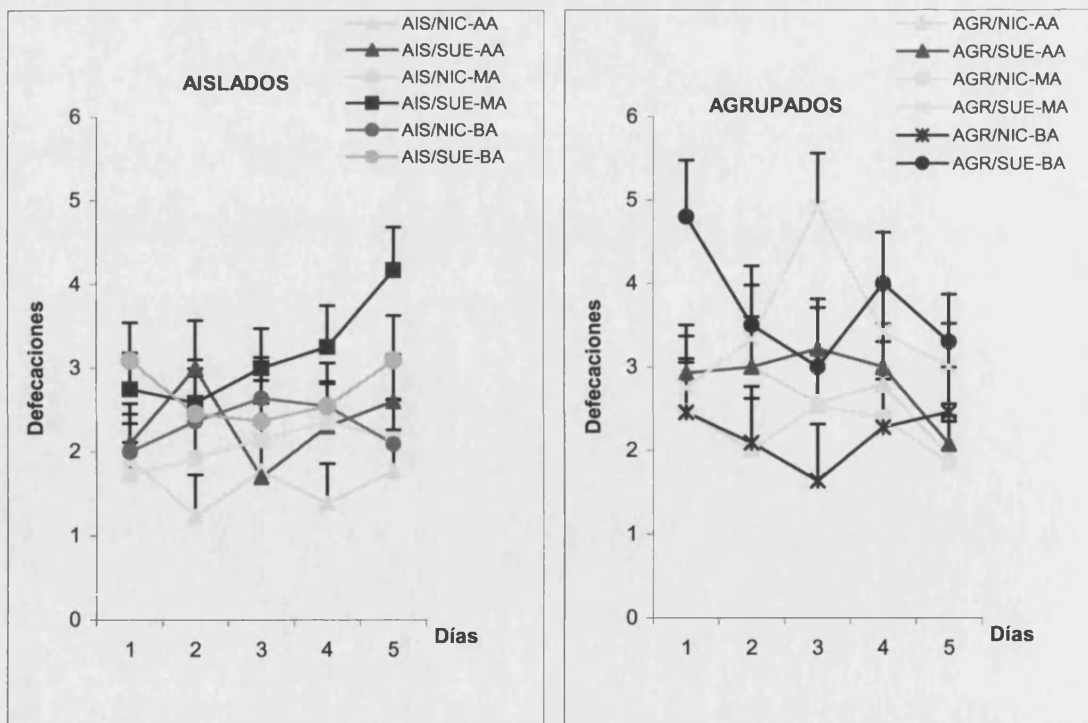


Figura 4-20: DEFECACIONES durante los 5 días de adquisición del condicionamiento de evitación activa por los ratones NMRI aislados y por los agrupados.

9) **Fórmula de aprendizaje:** este dato es el resultado de la siguiente fórmula para obtener una medida ponderada del aprendizaje real:

$$\text{Evitaciones} / (\text{evitaciones} + \text{escapes} + \text{cruces en el ITI}) \times 100$$

El ANOVA teniendo en cuenta los factores Alojamiento, Ansiedad y Tratamiento señaló diferencias significativas en la medida real de aprendizaje según el nivel de ansiedad de los ratones [$F(2,133)=5,18$; $p<0.01$]. Las comparaciones entre los grupos indicaron que los animales de baja ansiedad aprendieron mejor la tarea que los animales con ansiedad moderada; sin embargo, no encontramos diferencias entre los grupos de alta y baja ansiedad (ver Figura 4-21). El análisis no señaló diferencias provocadas por el Tratamiento. El régimen de Alojamiento tampoco provocó efectos significativos en el aprendizaje del condicionamiento de evitación activa (ver Figura 4-22).

El factor Día resultó significativo [$F(4,532)=16,26$; $p<0.001$], señalando una progresión de aprendizaje con el paso de los días (ver Figura 4-23).

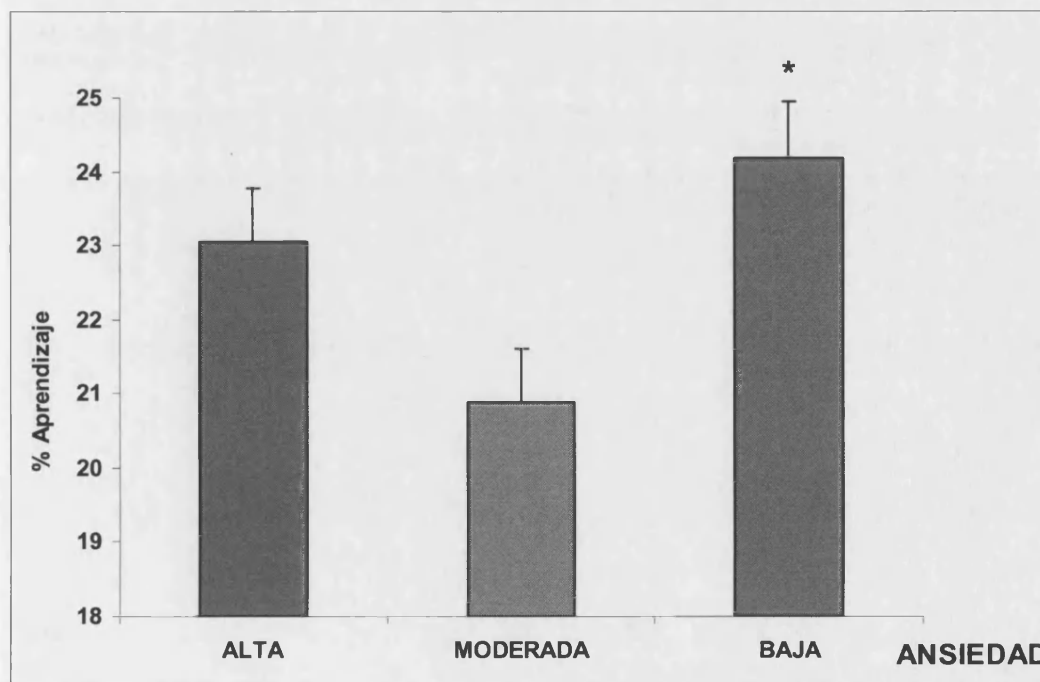


Figura 4-21: Media (\pm SEM) del porcentaje de aprendizaje obtenido durante la adquisición del condicionamiento de evitación activa en ratones NMRI que difieren en su nivel basal de ansiedad. * $p<0.05$ Ratones baja ansiedad vs ratones de ansiedad moderada.

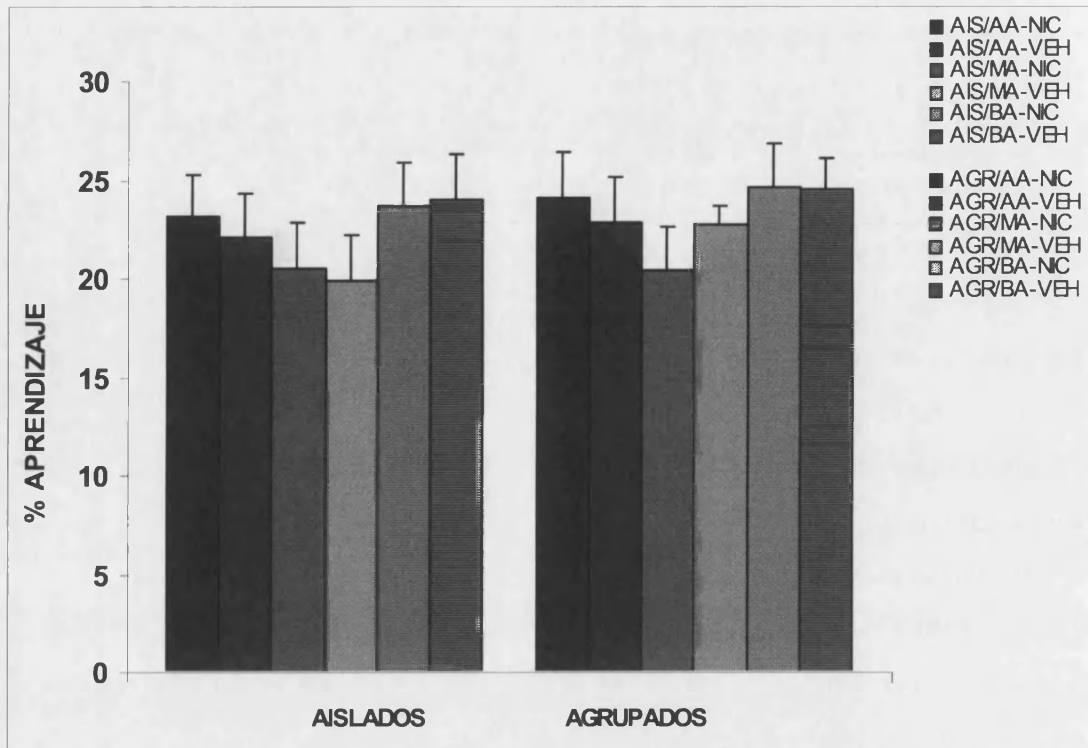


Figura 4-22: Media (\pm SEM) del % de APRENDIZAJE logrado por los ratones NMRI que difieren en su condición de alojamiento y en su nivel basal de ansiedad. El % de aprendizaje es el resultado de la siguiente fórmula: $[\text{n}^\circ \text{ de evitaciones} / (\text{n}^\circ \text{ evitaciones} + \text{n}^\circ \text{ de escapes} + \text{n}^\circ \text{ cruces ITI}) \times 100]$.

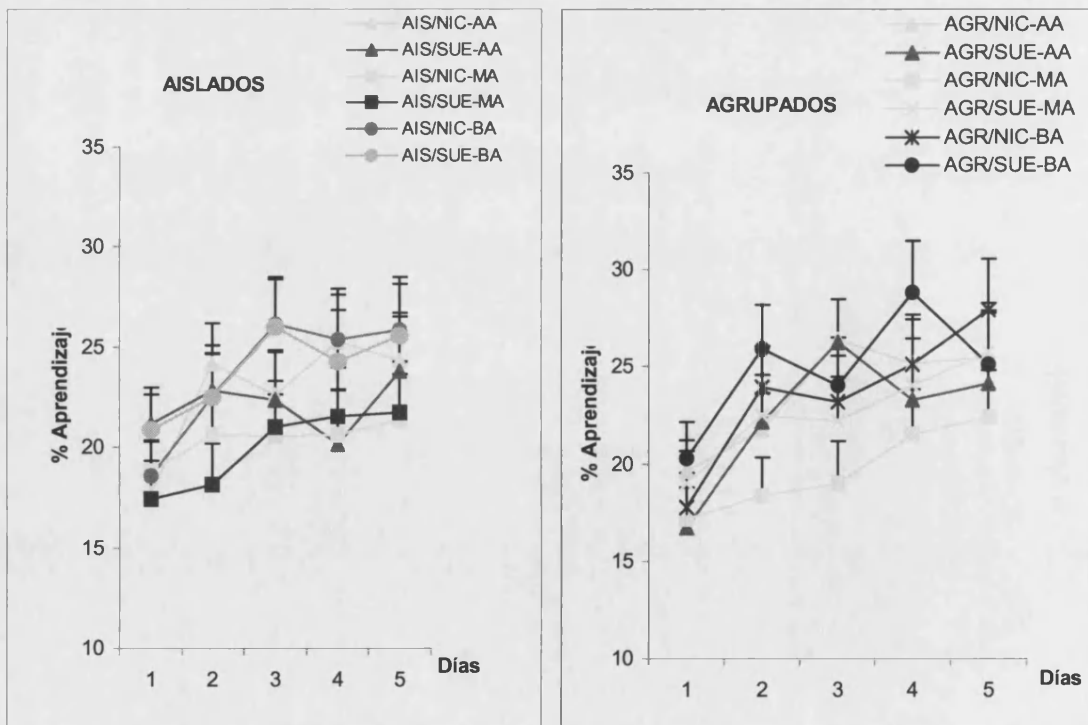


Figura 4-23: Evolución del APRENDIZAJE durante los 5 días de adquisición del condicionamiento de evitación activa por los ratones NMRI aislados y por los agrupados.

RESUMEN DE LOS RESULTADOS (ver Tabla 4-2).

- ✓ Los ratones aislados realizaron más evitaciones que los animales agrupados.
- ✓ Los animales aislados realizaron más cruces tanto en el período de adaptación como en el ITI que los agrupados, y también más defecaciones.
- ✓ En el grupo de ratones con ansiedad moderada, los animales aislados que habían recibido tratamiento con nicotina realizaron más evitaciones que los tratados con suero.
- ✓ Los ratones agrupados tuvieron mayor número de no respuestas y una latencia de respuesta más larga que los animales aislados.
- ✓ Los agrupados tratados con nicotina realizaron un menor número de evitaciones que los tratados con suero.
- ✓ Respecto al porcentaje de *aprendizaje real*, los animales de baja ansiedad aprendieron mejor la tarea que los animales de ansiedad moderada, aunque no hubo diferencias entre los niveles extremos de ansiedad (alta y baja).

TABLA 4-2 : Efectos diferenciales del Alojamiento (AISLADO O AGRUPADO) de la Ansiedad (ALTA, MODERADA O BAJA) y del Tratamiento (NICOTINA 0.35mg/kg o VEHÍCULO) en el condicionamiento de evitación activa en ratones macho NMRI. Los datos se presentan como los valores de la MEDIA \pm SEM.

GRUPOS	Aislados						Agrupados					
	AIS/AA-NIC	AIS/AA-VEH	AIS/MA-NIC	AIS/MA-VEH	AIS/BA-NIC	AIS/BA-VEH	AGR/AA-NIC	AGR/AA-VEH	AGR/MA-NIC	AGR/MA-VEH	AGR/BA-NIC	AGR/BA-VEH
Medidas												
Evitaciones	13,3 \pm 1,16	16,8 \pm 1,32	16,74 \pm 1,12	13,46 \pm 1,21	16,12 \pm 1,26	16,38 \pm 1,26	11,84 \pm 1,12	11,91 \pm 1,12	10,13 \pm 1,16	13,56 \pm 1,21	11,4 \pm 1,26	14,46 \pm 1,32
Escapes	7,75 \pm 0,69	8,24 \pm 0,78	8,91 \pm 0,66	9,61 \pm 0,71	8,94 \pm 0,75	8,63 \pm 0,75	8,61 \pm 0,66	8,45 \pm 0,66	9,26 \pm 0,69	9,96 \pm 0,71	8,85 \pm 0,75	9,92 \pm 0,78
No respuestas	8,96 \pm 1,42	4,96 \pm 1,62	4,34 \pm 1,37	6,75 \pm 1,48	4,92 \pm 1,55	5,16 \pm 1,55	9,52 \pm 1,37	9,55 \pm 1,37	10,75 \pm 1,42	6,8 \pm 1,48	9,74 \pm 1,55	5,62 \pm 1,62
Latencia de Respuesta	11,75 \pm 0,67	9,86 \pm 0,77	9,64 \pm 0,65	11,34 \pm 0,7	9,89 \pm 0,73	10,39 \pm 0,73	12,41 \pm 0,65	12,4 \pm 0,65	13,19 \pm 0,67	11,24 \pm 0,7	12,61 \pm 0,73	10,95 \pm 0,77
Cruces Adaptación	19,27 \pm 1,07	18,56 \pm 1,22	23,21 \pm 1,03	18,88 \pm 1,11	20,2 \pm 1,16	18,8 \pm 1,16	14,44 \pm 1,03	15,6 \pm 1,03	17,5 \pm 1,07	17,28 \pm 1,11	17,52 \pm 1,16	15,88 \pm 1,22
Cruces ITI	36,66 \pm 3,83	54,82 \pm 4,37	57,04 \pm 3,69	44,43 \pm 3,99	43,56 \pm 4,17	43,96 \pm 4,17	28,37 \pm 3,69	30,7 \pm 3,69	30,52 \pm 3,83	36,51 \pm 3,99	27,21 \pm 4,17	34,38 \pm 4,37
Defecaciones	1,61 \pm 0,36	2,34 \pm 0,41	2,05 \pm 0,35	3,15 \pm 0,37	2,32 \pm 0,39	2,7 \pm 0,39	2,64 \pm 0,35	2,84 \pm 0,35	2,24 \pm 0,36	3,48 \pm 0,37	2,18 \pm 0,39	3,72 \pm 0,41
% Aprendizaje	23,15 \pm 1,73	22,08 \pm 2,31	20,55 \pm 0,85	19,91 \pm 0,65	23,68 \pm 1,06	24,02 \pm 1,03	24,15 \pm 1,81	22,88 \pm 1,39	20,38 \pm 1,09	22,76 \pm 0,92	24,58 \pm 2,27	24,51 \pm 1,57

TABLA 4-3 : Resumen de los resultados de los análisis estadísticos de la prueba de condicionamiento de evitación activa en ratones macho NMRI que difieren en su nivel de ansiedad

Factores entre-sujeto

	TRATAMIENTO F(1,133)	ALOJAMIENTO(H) F(1,133)	ANSIEDAD F(2,133)	TxH F(2,133)	TxA F(2,133)	HxA F(2,133)	TxHxA F(2,133)
Medidas							
Evitaciones	2,79 (NS)	21,49 (.001)	1,07(NS)	2,09 (NS)	0,63 (NS)	0,04 (NS)	4,66 (.01)
Escapes	0,99(NS)	1,41 (NS)	2,93(NS)	0,08 (NS)	0,15 (NS)	0,03 (NS)	0,48 (NS)
No respuestas	3,32 (NS)	10,68 (.001)	1,58(NS)	1,67 (NS)	0,22 (NS)	0,61 (NS)	3,57 (.03)
Latencia de Respuesta	1,77(NS)	16,50 (.001)	0,79(NS)	2,59 (NS)	0,35 (NS)	0,07 (NS)	4,32 (.02)
Cruces Adaptación	3,35 (NS)	28,29 (.001)	4,22 (.02)	2,22 (NS)	1,40 (NS)	0,24 (NS)	0,92 (NS)
Cruces ITI	2,38(NS)	44,60 (.001)	1,86(NS)	0,47 (NS)	3,03 (NS)	0,29 (NS)	5,00 (.01)
Defecaciones	15,41(.001)	4,90 (.02)	1,32(NS)	0,34 (NS)	0,94 (NS)	0,47 (NS)	1,19 (N)
%Aprendizaje	0,004 (NS)	1,33 (NS)	5,18 (.01)	0,22 (NS)	0,51 (NS)	0,05 (NS)	0,44 (NS)

Factores intra-sujeto

	DIA F(4,532)	DxT F(4,532)	DxH F(4,532)	DxA F(8,532)	DxTxH F(4,532)	DxTxA F(8,532)	Dx HxA F(8,532)	DxTxHxA F(8,532)
Medidas								
Evitaciones	34,58 (.001)	,60 (NS)	0,45 (NS)	0,83 (NS)	0,74 (NS)	0,78 (NS)	0,87 (NS)	0,53 (NS)
Escapes	6,02 (.001)	0,71 (.001)	0,24 (NS)	1,96 (NS)	0,38 (.05)	0,62 (NS)	0,83 (NS)	1,25 (NS)
No respuestas	20,56 (.001)	0,53 (NS)	0,13(NS)	0,72 (NS)	0,38 (NS)	0,62(NS)	0,56 (NS)	1,00 (NS)
Latencia de Respuesta	34,63 (.001)	0,63 (NS)	0,99 (NS)	0,76 (NS)	0,55 (NS)	0,82 (NS)	0,55 (NS)	0,63 (NS)
Cruces Adaptación	37,65 (.001)	10,79 (.001)	0,53 (NS)	0,99 (NS)	1,17 (NS)	2,30 (.02)	0,67 (NS)	1,31 (NS)
Cruces ITI	10,84 (.001)	1,45 (NS)	1,01 (NS)	0,60 (NS)	0,67 (NS)	1,82 (NS)	0,49 (NS)	1,55 (NS)
Defecaciones	0,28 (NS)	0,10 (NS)	2,46 (NS)	1,78 (NS)	1,75 (NS)	1,12 (NS)	1,19 (NS)	0,67 (NS)
%Aprendizaje	16,26 (.001)	0,21 (NS)	0,72 (NS)	0,63 (NS)	0,79 (NS)	055(NS)	0,02(NS)	0,42 (NS)

4.3.- DISCUSIÓN

El objetivo principal de este experimento fue investigar si el nivel de ansiedad mostrado por los animales modula la capacidad de aprendizaje del condicionamiento de evitación activa en ratones. Para ello, inicialmente analizamos si la actividad motora de los animales que difieren en su nivel de ansiedad podría modular los efectos del aislamiento social en el aprendizaje del condicionamiento de evitación activa. En este experimento también nos interesó determinar cómo las condiciones de alojamiento y la administración de nicotina pueden influir en la posible relación entre ansiedad y aprendizaje en esta tarea de aprendizaje no declarativo.

Efectos de las condiciones de alojamiento y del nivel de ansiedad en la actividad motora espontánea

Los resultados obtenidos muestran el claro incremento de la actividad motora espontánea en ratones macho NMRI tras un periodo en condiciones de aislamiento (30 días), confirmando los resultados obtenidos en los experimentos realizados en la presente Tesis Doctoral (Experimento I y Experimento III), así como lo descrito en diversos trabajos realizados tanto con esta misma cepa de ratones como con otras distintas (Hilakivi y cols., 1989; Guo y cols., 2004). Un dato de interés es que los diferentes grupos de ratones clasificados según su nivel basal de ansiedad (alta, moderada o baja) no difirieron en la actividad motora medida en el actímetro. Este resultado es consistente con investigaciones previas realizadas, en las que no se han hallado diferencias entre la actividad motora mostrada por ratas con alto y bajo nivel de ansiedad cuando fueron observadas durante 4 días en sus propias jaulas (Henniger y cols., 2002). Sin embargo, en este mismo estudio (Henniger y cols., 2002) encontraron que en el paradigma de *black-white box* las ratas con alta ansiedad fueron menos activas que las de baja ansiedad. Estos resultados sugieren que las ratas con distinto nivel de ansiedad

difieren en sus reacciones a una situación nueva o estresante pero no en su nivel basal de actividad locomotora (Henniger y cols., 2002). En otros paradigmas, como la prueba de natación forzada o el test de campo abierto, no se observaron diferencias entre ratas con alto y bajo nivel de ansiedad (Ho y cols., 2002). No obstante, en el presente experimento encontramos una interacción entre las condiciones de alojamiento y el nivel basal de ansiedad cuando se evaluó la actividad motora espontánea de los ratones. Los animales aislados de baja ansiedad fueron más activos que los agrupados de su mismo nivel de ansiedad. (ver Figura 4-6).

Efectos de las condiciones de alojamiento, el nivel de ansiedad y la administración de nicotina en la adquisición del condicionamiento de evitación activa.

El resultado más destacado fue que las condiciones de alojamiento modularon la adquisición del condicionamiento de evitación activa: el número de evitaciones fue mayor en los ratones NMRI aislados que en los agrupados, mientras que la conducta de escape no resultó alterada por el aislamiento social. Estos datos son, en parte, consistentes con los obtenidos por Essman (1971) que demostró que el aislamiento no modificaba las respuestas de escape, pero afectaba a las respuestas de evitación condicionada. Existen, sin embargo, importantes diferencias entre ambos trabajos, ya que en la investigación realizada por este autor, los ratones utilizados eran de la cepa OF1 y el período de aislamiento fue de 165 días, bastante más prolongado que el utilizado en nuestro experimento. Además, debemos indicar que cuando se tuvieron en cuenta todas las posibles conductas motoras del animal al aplicar la fórmula de *aprendizaje real*, no se obtuvieron diferencias significativas entre ratones aislados y agrupados.

Se ha sugerido que los factores ambientales podrían ejercer efectos diferenciales según el paradigma conductual aplicado en cada investigación. Cambios ambientales como, por ejemplo, variaciones en el tamaño de las jaulas

(grandes vs pequeñas) o cambios en las condiciones de alojamiento (alojamiento individual vs alojamiento en grupo) podrían influir sobre la ejecución de los animales en tareas de aprendizaje (Adams y cols., 2001). Las observaciones obtenidas en el presente trabajo concuerdan con otras investigaciones previas donde se ha hallado que el aislamiento social en ratas puede facilitar el aprendizaje espacial, tanto en el laberinto de agua de Morris como en el aprendizaje inverso de esta tarea espacial (Wongwitdechcha y Marsden, 1996a). En una prueba de inhibición condicionada también se ha encontrado que el alojamiento individual facilita la adquisición de este condicionamiento (Harmer y Phillips, 1998a). No obstante, algunos estudios han mostrado que el aislamiento puede no afectar o incluso deteriorar la ejecución de otras tareas de aprendizaje. Por ejemplo, en ratas sometidas a aislamiento social temprano se observó un deterioro de la memoria de trabajo en el laberinto radial (Einon, 1980; Juraska y cols., 1984). El aislamiento social también puede inducir un deterioro del aprendizaje en una tarea de evitación pasiva (Del Arco y cols., 2004) y en una tarea discriminativa en la que los animales debían revertir una asociación estímulo-recompensa previamente establecida (Schrijver y cols., 2004). Sin embargo, este aislamiento social no afectó al aprendizaje espacial del laberinto de agua (Schrijver y cols., 2004). Coudereau y colaboradores (1997b) no han encontrado en ratones NMRI efectos significativos del aislamiento sobre el aprendizaje espacial y evitación pasiva, aunque el aislamiento durante 30 días bloqueó el condicionamiento de preferencia de morfina. En el Experimento I de la presente Tesis Doctoral, también se observó que en la adquisición del laberinto de agua de Morris, el régimen de aislamiento no producía deterioro en la ejecución de esta tarea espacial en ratones NMRI.

De acuerdo con los datos obtenidos en la presente investigación, el efecto de las manipulaciones ambientales (condiciones de alojamiento) fue evidente en el condicionamiento de evitación activa, confirmando la sugerencia de algunos autores de que dichas manipulaciones pueden tener mayor influencia cuando la tarea requerida es compleja (Vaglenova y cols., 2004). Nosotros observamos que los animales aislados mostraban mayor número de evitaciones y menor número de no respuestas en comparación con los agrupados. Estos resultados podrían

explicarse, al menos en parte, por el hecho de que los ratones aislados se muestran más reactivos frente a estímulos o situaciones novedosas (Hilakivi y cols., 1989), y que su actividad motora podría ser mayor en esta situación de aprendizaje (del Arco y cols., 2004). En apoyo de esta hipótesis, recientemente se ha informado de que el aislamiento social en ratas provoca una hiper-reactividad conductual y hormonal frente a estímulos estresantes tanto en el laberinto elevado en forma de cruz como en el condicionamiento de miedo. Los cambios observados en las respuestas inmuno-endocrinas también estarían indicando que estos ratones son altamente responsivos a situaciones experimentales nuevas (Weiss y cols., 2004). Este incremento en la activación se ha relacionado con cambios en el sistema dopaminérgico mesolímbico (Robbins y cols., 1996).

En roedores se ha observado que las diferencias individuales en ansiedad podrían modular la adquisición y la ejecución en algunas tareas de aprendizaje (Beuzen y Belzung, 1995; Ribeiro y cols., 1999; Krazem y cols., 2001; Bert y cols., 2002). Por esta razón, además de las condiciones de alojamiento, en nuestro diseño experimental tomamos en consideración el *nivel basal de ansiedad* como otro posible factor modulador de la conducta, ya que el aislamiento social puede modificar el nivel de ansiedad en ratones (Rodgers y Cole, 1993). Estudios con ratas que difieren en su nivel de ansiedad, clasificadas según la conducta mostrada en el laberinto elevado, han encontrado diferencias en el aprendizaje del condicionamiento de evitación: las ratas ansiosas realizaron un menor número de evitaciones que las menos ansiosas (Ho y cols., 2002). En nuestra investigación, los grupos de ratones NMRI que difieren en el nivel basal de ansiedad no mostraron diferencias en el número de evitaciones o no respuestas en *shuttle box*, aunque algunas diferencias emergieron cuando tomamos en consideración el tratamiento farmacológico administrado. Estos hallazgos concuerdan con los obtenidos con ratas Wistar, en las que se encontró que los niveles basales de ansiedad no influían en la ejecución en el laberinto de Morris (Bert y cols., 2002). Coincidiendo con otros autores (Griebel y cols., 2000) una posible explicación para la ausencia de efecto del nivel de ansiedad en el condicionamiento de evitación en la cepa NMRI, podría ser que esta cepa muestra niveles bajos de

conducta ansiosa, con pequeños porcentajes de tiempo pasados en los brazos cerrados del laberinto elevado. Sin embargo, hay que indicar que cuando aplicamos la fórmula de *aprendizaje real* que corrige el efecto de la posible hiperactividad motora, se observa que los ratones con baja ansiedad realizaron mejor la tarea que los de ansiedad moderada. Aunque las diferencias en porcentaje eran pequeñas, estarían indicando que los cambios en actividad motora inducidos por el aislamiento o por la administración de nicotina, podrían estar enmascarando el papel modulador de la ansiedad.

Investigaciones previas han puesto de manifiesto que los efectos de los fármacos en conductas como la actividad motora (Faraday y cols., 2001), la interacción social (Scheufele y cols., 2000) o el aprendizaje (Esmann, 1971) podrían depender de las condiciones de alojamiento. En el estudio realizado por Essman (1971) se encontró que la administración de nicotina mejoraba la ejecución de una tarea de evitación activa en ratones aislados pero la empeoraba en los agrupados. Los resultados de la presente investigación, utilizando un corto periodo de aislamiento, confirman este deterioro que afecta especialmente a los ratones agrupados, aunque en nuestro estudio no observamos una mejora del aprendizaje en ratones aislados tras la administración de nicotina. En nuestro estudio los ratones NMRI, tanto aislados como agrupados, tratados con 0,35 mg/kg de nicotina antes del entrenamiento diario en la tarea, no mejoraron la adquisición de la tarea de evitación activa. De hecho, parece que la nicotina deterioró el aprendizaje en ratones agrupados, aunque en aislados no se apreciaron efectos significativos. Estos datos concuerdan con algunos estudios en los que no se observó un efecto significativo de la nicotina en la tarea de evitación activa. Algunos autores indican que la nicotina induce un déficit en la retención de esta tarea de condicionamiento, aunque este deterioro puede depender de la cepa utilizada (Gilliam y Schlesinger, 1985). Sansone y colaboradores (1994) también señalan que la nicotina facilitó el aprendizaje de evitación con dosis de 0,5 mg/kg aunque a dosis más bajas resultó inefectiva. Nuestros datos, sin embargo, contrastan con otros trabajos en los que la administración de nicotina a dosis menores de 0,5 mg/kg incrementó la tasa de aprendizaje (Evangelista y cols.,

1970; Essman, 1971; Orsingher y Fulginiti, 1973). En ratas la nicotina puede inducir una mejora dosis-dependiente en una tarea de evitación activa, aunque este efecto interacciona con el género de los animales: a bajas dosis la nicotina mejoró el aprendizaje en ambos sexos; a dosis altas el efecto positivo se mantuvo en machos pero la ejecución en ratas hembras se deterioró (Yilmaz y cols., 1997). Los efectos de la nicotina en camadas de ratas que habían recibido nicotina prenatalmente han mostrado que esta sustancia psicoactiva puede incrementar la capacidad de aprendizaje en las crías hembra, pero no en las crías macho (Genedani y cols., 1983) o incluso producir déficits en aprendizaje, tanto en ratas macho como en hembras (Vaglenova y cols., 2004).

En suma, nuestros resultados apoyan la idea de que las condiciones de alojamiento podrían ser una variable relevante en la evaluación de los efectos de la nicotina en tareas de aprendizaje.

V.- DISCUSIÓN GENERAL

V.- DISCUSIÓN GENERAL

Las manipulaciones ambientales en roedores tienen una larga tradición en la investigación neurocientífica como instrumento para estudiar los mecanismos biológicos que subyacen a la conducta (Schrijver y cols., 2002). En la presente investigación, nuestro objetivo general fue evaluar el efecto del aislamiento social sobre la capacidad de aprendizaje de tareas complejas en roedores. Uno de los aspectos que se tuvo en cuenta en el diseño de los experimentos fue la posibilidad de valorar cómo los posibles cambios en la actividad motora y en los niveles de ansiedad y agresividad inducidos por el aislamiento en ratones podrían modular los efectos de la nicotina sobre la capacidad de aprendizaje en las tareas evaluadas (aprendizaje espacial y condicionamiento de evitación activa).

En esta discusión general se integran los diferentes aspectos estudiados a lo largo de los cuatro experimentos incluidos en esta Tesis Doctoral.

1.- Efectos del aislamiento social sobre la actividad motora espontánea

En la presente investigación se evaluó la actividad motora espontánea con el fin de comprobar si la ejecución mostrada por los animales en las tareas de aprendizaje realizadas en los diferentes experimentos (condicionamiento de evitación activa y aprendizaje espacial en el laberinto de agua) podría en parte estar influida por cambios de conducta más generales relacionados con las condiciones de alojamiento o con las posibles variables moduladoras de tipo emocional (cambios en el nivel de ansiedad o agresividad de los animales).

En roedores, la hiperactividad espontánea en respuesta a un nuevo ambiente es uno de los hallazgos más consistentes tras un periodo de aislamiento (Robbins y cols., 1996; Hall, 1998; Weiss y cols., 2000). La robustez de este efecto se pone de manifiesto cuando constatamos que se obtiene en numerosos laboratorios que

difieren en cuanto a condiciones exactas de alojamiento, manejo de los animales, diferentes protocolos y aparatos de prueba... (Schrijver y cols., 2002). En nuestra investigación se confirma ampliamente este efecto de hiperactividad tras el aislamiento, ya que se observa un aumento significativo de la actividad motora espontánea en los ratones alojados individualmente en los tres experimentos en que se tomó dicha medida (Experimentos 1, 3 y 4). Nuestro estudio aporta además nuevos datos en comparación con los obtenidos en investigaciones previas sobre este tema, ya que demuestra que dichos cambios en la actividad locomotora que se observan en ratones aislados pueden estar modulados por el nivel de ansiedad de los animales. En el Experimento 4 se obtuvo una interacción entre alojamiento y el nivel de ansiedad, observándose que los animales aislados con bajo nivel de ansiedad fueron más activos que los agrupados con el mismo nivel de ansiedad.

El presente trabajo no confirma las diferencias previamente descritas en actividad motora espontánea entre ratones agresivos y no agresivos (Kvist y cols., 1997; Sandnabba, 1996). Hay que señalar, sin embargo, que en estas investigaciones las comparaciones habían sido realizadas entre grupos de ratones seleccionados genéticamente teniendo en cuenta sus niveles basales de ansiedad o diferencias en agresión. El tipo de selección de los ratones realizado en nuestro estudio, teniendo en cuenta la clasificación de los animales en base a su ejecución en diferentes tests conductuales no representa claramente diferencias tan extremas como las obtenidas tras selección genética, pero puede resultar útil con el fin de evaluar el posible papel modulador de variables emocionales sobre el aprendizaje.

2.- Efectos del aislamiento social sobre el nivel de ansiedad evaluado en el laberinto elevado

El aislamiento social incrementa la ansiedad en diferentes medidas conductuales (Haller y cols., 2000). Por ello, se consideró interesante evaluar si dichos cambios emocionales podrían interferir con la ejecución de las tareas

aprendidas, tal como había sido sugerido previamente por otros autores (Hellemans y cols., 2004).

En los Experimentos 3 y 4 se observa que la distribución de los animales, tanto aislados como agrupados, en cuanto a la conducta mostrada en el laberinto elevado muestra variabilidad individual, confirmando las observaciones realizadas en otros trabajos (Griebel y cols., 2000). En general, se ha descrito que los ratones de la cepa NMRI presentan un bajo nivel de emocionalidad, ya que estos animales tienen bajos niveles de respuesta de evitación a los brazos abiertos del laberinto elevado y un nivel moderado de ansiedad en el denominado test de luz/oscuridad (Griebel y cols., 2000). El presente estudio amplía esta descripción general de la conducta de los ratones NMRI en el laberinto elevado poniendo de manifiesto que no todos los ratones de esta cepa presentan ese bajo nivel de ansiedad. Por otra parte, nuestros experimentos confirman que el aislamiento social en ratones no parece inducir claros efectos sobre la ansiedad. Sin embargo, esta condición de alojamiento modifica el perfil conductual en el laberinto elevado ya que los ratones aislados incrementan aquellas conductas que reflejan mayor actividad motora (como las entradas totales a brazos del laberinto).

El hecho de que los animales se distribuyan en diferentes categorías en cuanto a su nivel de ansiedad (alta, baja y moderada) facilita el estudio de las variables moduladoras. Se ha sugerido que nivel de ansiedad podría influir en el modo en que el animal se enfrenta a las diferentes tareas. Así, en ratas seleccionadas genéticamente en base a su nivel de ansiedad (ratas HAB con alto nivel de ansiedad y ratas LAB con bajo nivel de ansiedad) se observa que aquellas ratas con mayor nivel de ansiedad adoptan estrategias de afrontamiento más pasivas y son más vulnerables y susceptibles a situaciones estresantes (Landgraf, 2003).

3.- Efectos del aislamiento social y de la administración de nicotina sobre la adquisición de tareas de aprendizaje

Diversos hallazgos sugieren que las condiciones de alojamiento en animales de laboratorio pueden influir sobre la respuesta a diferentes fármacos (Majercsik y cols., 2003). Recientemente se ha prestado una considerable atención al papel de los receptores dopaminérgicos como moduladores de la respuesta emocional en condiciones de aislamiento (Gendreau y cols., 2000) pero el sistema colinérgico ha recibido menor atención como modulador de la respuesta emocional. Una de las conclusiones del presente estudio es que el aislamiento social puede incrementar la sensibilidad a los efectos de la nicotina, aunque dichos efecto únicamente se observa bajo determinadas condiciones experimentales. Por ejemplo, en el primer experimento se observa que la nicotina deterioró la conducta de evitación en ratones agrupados pero no afectó a los aislados.

Para nuestro conocimiento éste es el primer estudio que ha evaluado los efectos de la nicotina en ratones aislados y agrupados teniendo en cuenta el papel modulador de variables emocionales como el nivel de ansiedad y agresividad de los animales tras un periodo de aislamiento social. Se ha planteado que podrían existir diferencias entre animales aislados y agrupados en la capacidad de establecer asociaciones entre la droga y el contexto (Smith y cols., 2003). Por ejemplo, Coudereau y colaboradores (1997b) informaron que los ratones aislados no mostraban preferencia de lugar condicionada para la morfina bajo condiciones en las cuales se observaba una clara preferencia en ratones agrupados. Estos efectos se obtuvieron pese a que ambos grupos no diferían en la capacidad de aprendizaje espacial en el laberinto de agua, o en su capacidad de adquirir una tarea de evitación pasiva.

3.1.- Papel modulador del nivel basal de ansiedad sobre los efectos del aislamiento social en la adquisición de tareas de aprendizaje

La emocionalidad es uno de los componentes que subyacen a la capacidad de un organismo para evaluar los estímulos estresantes y enfrentarse adecuadamente a los mismos (Landgraf, 2003). Uno de los objetivos de la presente investigación fue evaluar si el aprendizaje y la ansiedad podrían estar relacionados en ratones sometidos a una situación de aislamiento social. Para ello comparamos ratones clasificados como muy ansiosos, moderadamente ansiosos, o no ansiosos en cuanto a su ejecución en diversas tareas de aprendizaje en las que intervienen requerimientos diferentes (laberinto de agua, evitación activa). Considerando los resultados obtenidos en los Experimentos 3 y 4 podemos sugerir que el nivel basal de ansiedad de los ratones NMRI tras un periodo de aislamiento social no moduló directamente ni la adquisición ni la retención del laberinto de agua. En el condicionamiento de evitación activa, el nivel de ansiedad interaccionó con los efectos de la nicotina.

En el presente estudio a los ratones se les administró nicotina o suero fisiológico previamente a la realización de las tareas de aprendizaje. Por ello hay que tener en cuenta que los posibles efectos ansiolíticos y/o ansiógenos de la nicotina pueden haber influido sobre los efectos conductuales observados. Los efectos de la nicotina sobre la ansiedad dependen de la especie, cepa, condiciones de alojamiento de los animales, así como de la pauta de administración del fármaco (Faraday y cols., 1999) y del test conductual empleado (Cheeta y cols., 2001). Aunque en ratones se ha demostrado que la nicotina puede tener efectos ansiolíticos (Brioni y cols., 1993), estudios previos realizados en nuestro laboratorio con ratones NMRI alojados en grupo indican que, cuando se administra de forma aguda, la nicotina induce en el laberinto elevado efectos que pueden interpretarse como ansiógenos (datos no publicados). Otros trabajos también han encontrado que la nicotina puede aumentar la ansiedad en ratas agrupadas (Faraday y cols., 1999).

3.2.- Papel modulador del nivel basal de agresividad sobre los efectos del aislamiento social en la adquisición de tareas de aprendizaje

Existe un renovado interés en el estudio de la agresión aunque se debe enfatizar el hecho de que la agresión no es un fenómeno unitario y su análisis resulta comparativamente más complejo que el de otras conductas (Blanchard y cols., 2003). La investigación de la agresividad natural mostrada por los roedores en el laboratorio ha resultado ser un método extremadamente útil para comprender tanto el control como los posibles efectos de esta conducta (Haller y Kruk, *in press*).

Se ha demostrado que las ratas macho que presentan una estrategia de afrontamiento más agresiva se caracterizan por una elevada actividad simpático/adrenomedular tanto a estímulos sociales como no sociales (Sgoifo y cols., 1996). A este respecto, una idea importante es la de *afrontamiento pasivo o activo*, concepto revisado y ampliado por Koolhaas y colaboradores (1999). Los animales que muestran un estilo activo o *proactivo* se caracterizan por altos niveles de agresión, dominancia y territorialidad, pero también tienen mayor tendencia a desarrollar conductas más rutinarias y rígidas, con mayor motivación intrínseca. A nivel de reactividad autonómica, estos animales presentan mayor actividad simpática y menor reactividad del eje HHA. En cambio, los animales que desarrollan un estilo pasivo o *reactivo* son menos agresivos, menos territoriales y, en general, mayor subordinación aunque son más flexibles y están más influidos por los cambios en los estímulos ambientales. A nivel de reactividad autonómica, estos animales presentan mayor actividad parasimpática y mayor reactividad del eje HHA.

La existencia de estas diferencias en la capacidad de afrontamiento en roedores plantea la cuestión de si realmente tales diferencias también se ven reflejadas cuando el animal es confrontado en una tarea con alto componente emocional. El diseño experimental seguido en los Experimentos 1 y 2 de la

presente Tesis Doctoral intentan, en parte, contestar a dicha cuestión. Nuestros resultados sugerirían que en el laberinto de agua, el aislamiento social influye sobre la ejecución de los animales; sin embargo el nivel de agresión no modula directamente dicho efecto. En el aprendizaje de evitación activa tampoco se observaron diferencias entre los ratones con alto (ratones SAL) y bajo nivel de agresividad (ratones LAL) en cuanto al número de evitaciones, aunque en esta tarea, los ratones aislados SAL realizaron un mayor número de cruces de adaptación y cruces ITI que los aislados LAL. Se observó también una sensibilidad diferencial a los efectos de la nicotina entre ratones SAL y LAL durante el entrenamiento en esta tarea.

4.- Implicaciones de los resultados obtenidos

4.1.- Utilidad de la clasificación de los animales previamente a la realización del test de aprendizaje

Diferentes autores han utilizado clasificaciones basadas en la selección de animales por rasgos o diferencias extremas de ansiedad (Landgraf, 2003) o agresión (Koolhaas y cols., 1999) utilizando cepas genéticamente seleccionadas (como las ratas HAB y LAB para la ansiedad, y los ratones SAL/LAL para la agresión). Una de las principales aportaciones del presente trabajo de investigación consiste en desarrollar un método de clasificación que no se apoya en diferencias tan extremas pero puede resultar útil para poner de manifiesto las diferencias individuales en la capacidad de afrontamiento de diversas tareas.

La estrategia de clasificar a los ratones en base a su nivel de agresividad ha sido aplicada previamente por nuestro grupo de investigación tanto en ratones de la cepa NMRI, utilizada en la presente Tesis (Moragrega y cols., 2002), como en otras cepas de ratones como la OF1 (Redolat y cols., 2005). Los resultados obtenidos en este trabajo confirman que los criterios aplicados para la clasificación de los animales son adecuados ya que nos han permitido obtener

grupos de ratones con diferente latencia de ataque, que podría estar reflejando un diferente umbral de irritabilidad y se manifestaría posteriormente por la conducta que el animal muestra ante una nueva situación ambiental. La principal dificultad surgida al aplicar nuestro criterio de clasificación fue la imposibilidad de obtener un número suficiente de animales SAL (con corta latencia de ataque y, por tanto, elevado nivel de agresividad) entre los ratones que habían permanecido alojados en grupo. Dicha dificultad se relaciona con el hecho de que, como está ampliamente demostrado, el mejor método para inducir agresividad en ratones es el aislamiento. A pesar de ello, también es conocido que se establecen relaciones de dominancia-sumisión mientras los ratones permanecen agrupados (Ferrari y cols., 1998). Es posible, por tanto, que utilizando otra cepa de ratones agresivos y un mayor número de animales para proceder a su selección se obtuviesen un mayor número de ratones agrupados que cumpliesen los criterios de elevada agresividad.

Respecto a la clasificación de los animales en base a su nivel de ansiedad nuestro criterio de selección siguió los procedimientos previamente descritos en la literatura por Pawlak y colaboradores (2003) y Ho y colaboradores (2004), aunque en nuestro estudio añadimos un grupo de ratones de *ansiedad moderada* que previamente no había sido utilizado en otros trabajos. Dicha inclusión se justificó por la necesidad de tener una valoración más completa que pudiese ayudarnos a responder a la cuestión de cómo el nivel basal de ansiedad se podría relacionar con el aprendizaje. Los resultados obtenidos en los dos estudios en lo que se aplicó este criterio de clasificación (Experimentos 3 y 4) confirman la utilidad del mismo aunque plantean algunas dificultades. Por ejemplo, la distribución de las puntuaciones de ansiedad en los ratones aislados y agrupados fue diferente lo que llevó a la necesidad de aplicar puntos de corte también diferenciados para seleccionar algunos de los grupos, especialmente aquellos considerados como de *ansiedad moderada*. Se observó que aunque en el Experimento 3 la distribución de los animales se ajustó a la curva normal, en el Experimento 4 dicha distribución fue más heterogénea.

4.2.- Importancia del estudio de las diferencias individuales

Es conocido que tanto los sujetos humanos como los animales presentan un alto grado de variabilidad en el aprendizaje de tareas complejas (Vaglenova y cols., 2004). Comprender las causas de las diferencias individuales así como sus consecuencias en términos de ajuste, capacidad adaptativa y vulnerabilidad individual a la enfermedad es actualmente uno de los mayores retos para la investigación biomédica (Bartolomucci y cols., 2005). Diversos experimentos han sugerido que un grupo de roedores (ratas o ratones) aunque sean de idéntica cepa, edad y sexo pueden diferir en sus respuestas conductuales a un nuevo ambiente (Bartolomucci y cols., 2005; Sgoifo y cols., 2005; Topic y cols., 2005). El estudio de estas diferencias individuales ha sido propuesta como una valiosa estrategia de investigación dado que las mismas pueden relacionarse con mecanismos fisiológicos específicos y predecir la respuesta en otras tareas conductuales (Thiel y cols., 1999).

En el estudio de las diferencias individuales, numerosos trabajos anteriores han evaluado fundamentalmente cómo la respuesta motora a la novedad puede relacionarse con efectos diferenciales de las drogas de abuso (Thiel y cols., 1999), pero muy pocos autores han enfatizado la posible utilidad de variables de tipo emocional en la clasificación de los animales previamente a la realización de tareas conductuales.

Revisiones recientes enfatizan la importancia de comprender las causas de las diferencias individuales en roedores y sus consecuencias en términos de capacidad adaptativa (Sgoifo y cols., 2005). La relevancia de este tema se ve subrayada por el hecho, frecuentemente constatado por los investigadores cuando realizan sus experimentos conductuales, de las grandes diferencias entre grupos de ratones genéticamente idénticos, incluso entre los alojados en la misma jaula (Lathe, 2004). En su artículo, muy acertadamente titulado *“The individuality of mice”* este autor, entre otras cuestiones, intenta responder a la pregunta *¿Influye la “individualidad” (incluyendo los efectos sociales) sobre el resultado obtenido*

en tests conductuales o farmacológicos relevantes? (Lathe, 2004). Consideramos que los resultados obtenidos en el presente estudio pueden contribuir, al menos en parte, a su contestación. Nuestra aportación fundamental ha sido mostrar que las variables sociales influyen efectivamente en la respuesta del animal al ambiente y su adaptación al mismo durante la ejecución de tareas de aprendizaje. Además, se ha puesto de manifiesto la necesidad de tomar en consideración las variables de tipo emocional y el posible efecto diferencial de los fármacos administrados dependiendo de las condiciones de alojamiento.

Los resultados de los experimentos presentados confirman la idea de que la selección bi-direccional de roedores según un rasgo conductual puede ser una herramienta de interés para estudiar los mecanismos que subyacen a una conducta concreta (Yilmazer-Hanke y cols., 2004). Se ha sugerido que las diferencias conductuales, que se pueden abordar desde diferentes perspectivas (por ejemplo, comparando ratones con diferente nivel de agresividad), podrían ser también un elemento clave en la búsqueda de factores que determinan una susceptibilidad diferencial a los trastornos del estado de ánimo relacionados con el estrés (Veenema y cols., 2004). Esta perspectiva puede resultar de interés en futuros estudios que amplíen nuestros datos.

4.3.- Aplicabilidad de los resultados

La comparación entre diferentes condiciones de alojamiento puede ofrecernos información útil para entender mejor el efecto de manipulaciones no farmacológicas sobre el desarrollo de los animales (Paulus y cols., 2000). En este sentido, nuestros resultados confirman que el aislamiento es una manipulación no farmacológica que da lugar a cambios conductuales en los roedores.

Se ha indicado que los cambios conductuales específicos inducidos por el aislamiento social en ratones dependen ampliamente de la cepa. Aunque en la presente investigación únicamente se utilizó una cepa de ratones (NMRI)

podemos sugerir que, de forma general, se confirmaría dicho efecto diferencial de las condiciones de alojamiento en función de la cepa, ya que algunos de los resultados obtenidos sobre cambios en la conducta emocional o en el aprendizaje tras un periodo de aislamiento difieren de los que habían sido observados previamente por otros autores utilizando otras cepas de ratones (Ferrari y cols. 1998). En futuras investigaciones podría resultar de interés comparar los efectos del aislamiento social sobre tareas de aprendizaje en diferentes cepas de ratones. En este sentido, estudios previos realizados en nuestro laboratorio con ratones de las cepas NMRI y C57 muestran claras diferencias en la adquisición de la tarea de aprendizaje espacial (Vicens y cols., 1999), por lo que su comparación tras condiciones de alojamiento diferencial resultaría de gran interés.

Nuestro estudio enfatiza la importancia de considerar las condiciones ambientales como una variable importante en la investigación en neurociencia, tal como han subrayado recientemente diferentes autores (Schrijver y cols., 2002; Broseta y cols., 2005). Se confirma la idea de que los resultados obtenidos en estudios conductuales en roedores dependerán en gran medida del tipo de paradigma experimental utilizado y del modo en que los animales fueron alojados (Nyberg y cols., 2004). Hasta muy recientemente, la integración de las variables ambientales en el diseño experimental ha sido un aspecto poco tenido en cuenta en las investigaciones (Nyberg y cols., 2004). En este contexto, nuestro estudio contribuye a poner de manifiesto que los factores ambientales, en interacción con variables de tipo emocional, deben ser considerados cuando se investigan los efectos conductuales de los fármacos. Teniendo en cuenta la naturaleza multidimensional de la emocionalidad (Ramos y Mormede, 1998), la utilización de diferentes aproximaciones, como las presentadas en esta investigación, puede resultar útil para delinear mejor las relaciones entre emocionalidad y aprendizaje.

En general, podemos afirmar que los resultados obtenidos en los experimentos presentados en esta Tesis Doctoral apoyan la idea, sugerida también por otros autores, de que las diferencias individuales podrían estar asociadas con diferentes estilos de afrontamiento de las tareas. Podemos afirmar, sin embargo que, como indican de Boer y colaboradores (2003) dichos estudios *todavía se encuentran en su infancia*. Consideramos también que serían necesarios más estudios para poder evaluar en profundidad la relevancia del papel de las diferencias individuales en la respuesta a la nicotina.

VI.- CONCLUSIONES

VI.- CONCLUSIONES

1. El aislamiento social induce hiperactividad motora en ratones NMRI. Estos cambios en la actividad motora en los ratones aislados que se registran en el actímetro no están directamente influidos por los niveles basales de agresividad de los animales, pero podrían estar modulados por el nivel de ansiedad.
2. El aislamiento social no parece inducir claros efectos ansiolíticos o ansiógenos en el laberinto elevado en forma de cruz (*plus maze*), aunque las condiciones de alojamiento modifican el perfil conductual de los animales en este test: los ratones aislados incrementan conductas que reflejan mayor actividad motora.
3. En el aprendizaje del laberinto de agua, el aislamiento social no afecta significativamente a la adquisición de la tarea pero puede mejorar la retención de la misma. Este efecto estaría influido por la manipulación a la que fueron sometidos los animales previamente a la realización de esta tarea espacial.
4. Las condiciones de alojamiento influyen sobre la adquisición de la tarea del condicionamiento de evitación activa ya que los ratones aislados presentan mayor número de evitaciones que los agrupados, aunque dichas diferencias podrían deberse a su mayor actividad motora.
5. El nivel basal de agresividad influye en las medidas de actividad motora registradas durante la tarea de condicionamiento de evitación activa: los ratones aislados con mayor nivel de agresividad (SAL) realizan más cruces durante el periodo de adaptación y en los intervalos entre ensayos que los ratones menos agresivos (LAL). En el condicionamiento de evitación activa no hay diferencias entre ratones SAL y LAL en el número de evitaciones, pero al aplicar la fórmula de *aprendizaje real* se observa que los LAL presentan un

mejor aprendizaje que los SAL. La diferencia es más significativa los últimos días de entrenamiento y puede estar modulada por la administración de nicotina.

6. En ratones mantenidos en condiciones de aislamiento social, el nivel de agresividad no influye sobre la adquisición ni sobre la retención de una tarea de aprendizaje espacial en el laberinto de agua.
7. El nivel basal de ansiedad no tiene un efecto directo sobre la ejecución del laberinto de agua aunque puede modular la tasa de aprendizaje en el condicionamiento de evitación activa.
8. Los efectos de la nicotina difieren entre ratones alojados individualmente o en grupo, y dependen de los requerimientos de la tarea. En el laberinto de agua, el tratamiento con nicotina empeora la adquisición de la tarea de forma significativa en los ratones aislados. En el condicionamiento de evitación activa, la nicotina disminuye el número de evitaciones en los ratones agrupados mientras que en los aislados los efectos estarían modulados por el nivel de agresividad y de ansiedad.
9. En el condicionamiento de evitación activa se observa una sensibilidad diferencial a la administración de nicotina en ratones con diferente nivel de agresividad (SAL y LAL). Los ratones SAL son más sensibles a la nicotina, aunque este efecto se refleja especialmente en las medidas de actividad motora obtenidas durante la tarea (cruces en la adaptación y durante los intervalos entre ensayos).
10. Nuestros resultados confirman la necesidad de prestar atención a las condiciones de alojamiento de los animales, ya que éstas pueden influir sobre la capacidad de aprendizaje y modular los efectos conductuales de la nicotina.

***VII.- REFERENCIAS
BIBLIOGRÁFICAS***

- Abdulla FA, Bradbury E, Calaminici MR, Lippiello PM, Wonnacott S, Gray JA y Sinden JD (1996) Relationship between up-regulation of nicotine binding sites in rat brain and delayed cognitive enhancement observed after chronic and acute nicotinic receptor stimulation. *Psychopharmacology* 124: 323-31
- Abdulla FA, Calaminici MR, Stephenson JD and Sinden JD (1993) Chronic treatments with cholinceptor drugs influence spatial learning in rats. *Psychopharmacology* 111:508-11
- Adams BL, Chaney SF, Gerlai R (2001) Genotype-environment interaction: Effect of housing conditions on water maze performance in C57BL/6 and 129/SVEV inbred mouse strains. *Int J Comp Psychol* 14:175-88
- Aguilar A, Miñarro J y Simón VM (1998) Dose-dependent impairing effects of morphine on avoidance acquisition and performance in male mice. *Neurobiol Learn Mem* 69:92-105
- Aguilar A, Miñarro J y Simón VM (2004) Morphine potentiates the impairing effects of neuroleptics on two-way active conditioned avoidance response in male mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 28:225-37
- Aguilar R, Gil L, Fernández-Teruel A, Tobefía A (2004) Genetically-based behavioural traits influence the effects of shuttle box avoidance overtraining and extinction upon intertrial responding: a study with the Roman rat strains. *Behav Proc* 66:63-72
- Aguilar R, Gil L, Flint J, Gray GA, Dawson GR, Driscoll P, Giménez-Llort L, Escorihuela RM, Fernández-Teruel A y Tobefía A (2002) Learned fear, emotional reactivity and fear of heights: A factor analytic map from a large F₂ intercross of Roman rat strains. *Brain Res Bull* 57: 17-26
- Al'Absi M, Amunrud T y Wittmers LE (2002) Psychophysiological effects of nicotine abstinence and behavioral challenges in habitual smokers. *Pharmacol Biochem Behav* 72:1-10
- Aldavert-Vera L, Costa-Miserachs D, Massanés-Rotger E, Soriano-Mas C, Segura-Torres P, y Morgado-Bernal I (1997) Facilitation of a distributed shuttle-box conditioning with posttraining intracranial self-stimulation in old rats. *Neurobiol Learn Mem* 67:254-8
- Aldavert-Vera L, Segura-Torres P, Costa-Miserachs D y Morgado-Bernal I (1996) Shuttle-box memory facilitation by posttraining intracranial self-stimulation: differential effects in rats with high and low basic conditioning levels. *Behav Neurosci* 110:346-52
- Almaguer-Melián W y Bergado-Rosado JA (2002) Interacciones entre el hipocampo y la amígdala en procesos de plasticidad sináptica. Una clave para entender las relaciones entre motivación y memoria. *Rev Neurol* 35: 586-93
- American Psychiatric Assotiation (APA) (1995) Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales. *DSM IV*. Masson. Barcelona.
- Amorapanth P, LeDoux JE y Nader K (2000) Different lateral amygdala outputs mediate reactions and actions elicited by a fear-arousing stimulus. *Nat Neurosci* 3:74-9
- Arakawa H (2003) The effects of isolation rearing on open-field behavior in male rats depends on developmental stages. *Dev Psychobiol* 43:11-9
- Araki H, Suemaru K y Gomita Y (2002) Neuronal nicotinic receptor and psychiatric disorders: functional and behavioral effects of nicotine. *Japanese Journal of Pharmacology* 88:133-38
- Arenas MC, Parra A y Simon VM (1993) Gender differences in escape-avoidance behavior of mice after haloperidol administration. *Pharmacol Biochem Behav* 44:233-6
- Arendash GW, Sanberg PR y Sengstock GJ (1995) Nicotine enhances the learning and memory of aged rats. *Pharmacol Biochem Behav* 52:517-23

- Ashford J y Jones BJ (1976) The effects of intra-amygdaloid injections of 6-hydroxy-dopamine on avoidance responding in rats. *Br J Pharmacol* 56:255-61
- Attaway CM, Compton DM, Turner MD (1999) The effects of nicotine on learning and memory: a neuropsychological assessment in young and senescent Fischer 344 rats. *Physiol Behav* 67:421-31
- Avitsur R, Stark JL, Dhabhar FS, Kramer KA, Sheridan JF (2003) Social experience alters the response to social stress in mice. *Brain Behav Immun* 17:426-37
- Ayesta FJ y Otero M (2004) El tabaquismo como una enfermedad adictiva crónica. En: Jimenez CA y Fagerström KO. *Tratado De Tabaquismo*. Aula Médica. Madrid
- Balderas I, Ramírez-Amaya F y Bermúdez-Rattoni F (2004) Cambios morfológicos asociados a la memoria. *Rev Neurol* 38:944-8
- Balfour DJ y Fagerström KO (1996) Pharmacology of nicotine and its therapeutic use in smoking cessation and neurodegenerative disorders. *Pharmacol Ther* 72:51-81
- Balfour DJ, Wright AE y Benwell MEM (2000) The putative role of extra-synaptic mesolimbic dopamine in the neurobiology of nicotine dependence. *Behav Brain Res* 113:73-83
- Bannerman DM, Rawlins JN, McHugh SB, Deacon RM, Yee BK, Bast T, Zhang WN, Pothuizen HH y Feldon J (2004) Regional dissociations within the hippocampus-memory and anxiety. *Neurosci Biobehav Rev* 28:273-83
- Bannon AW, Decker MW, Holladay MW, Curzon P, Donnelly-Roberts D, Puttfarcken PS, Bitner RS, Diaz A, Dickenson AH, Porsolt RD, Williams M y Arneric SP (1998) Broad-spectrum, non-opioid analgesic activity by selective modulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Science* 279:77-81
- Bardo MT, Bowling SL, Rowlett JK, Manderscheid P, Buxton ST y Dwoskin LP (1995) Environmental enrichment attenuates locomotor sensitization, but not in vitro dopamine release, induced by amphetamine. *Pharmacol Biochem Behav* 51:397-405
- Barnard CJ y Luo N (2002) Acquisition of dominance status affects maze learning in mice. *Behav Proc* 60:53-9
- Bartolomucci A, Palanza P, Sacerdote P, Ceresini G, Chirieleison A, Panerai AE y Parmigiani S (2003) Individual housing induces altered immuno-endocrine responses to psychological stress in male mice. *Psychoneuroendocrinol* 28:540-558
- Bartolomucci A, Palanza P, Sacerdote P, Panerai AE, Sgoifo A, Dantzer R, Parmigiani S (2005) Social factors and individual vulnerability to chronic stress exposure. *Neurosci Biobehav Rev* 29: 67-81
- Bartus RT, Dean RL, Beer B y Lippa LS (1982) The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* 217:408-17
- Bear MF, Connors BW y Paradiso MA (1996). *Neurociencia. Explorando el cerebro*. Masson-Williams y Wilkins Eds
- Bencherif M, Schmitt JD, Bhatti BS, Crooks P, Caldwell WS, Lovette ME, Fowler K, Reeves L y Lippiello PM (1998) The heterocyclic substituted pyridine derivative (+/-)-2-(3-pyridinyl)-1-azabicyclo[2.2.2]octane (RJR-2429): a selective ligand at nicotinic acetylcholine receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 284:886-94
- Benowitz NL (1990) Pharmacokinetic considerations in understanding nicotine dependence. *Ciba Found Symp* 152:186-200
- Benowitz NL (1996) Pharmacology of nicotine: Addiction and therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36:595-613

- Benowitz NL y Peng MW (2000) Non nicotine pharmacotherapy for smoking cessation. Mechanisms and prospects. *Drug* 13:265-85
- Benus RF y Røndigs M (1997) The influence of the postnatal maternal environment in accounting for differences in aggression and behavioural strategies in mus domesticus. *Behav* 134:634-41
- Benus RF, Bohus B y Koolhaas JM (1991a) Behavioral differences between artificially selected aggressive and non-aggressive mice: response to apomorphine. *Behav Brain Res* 43:203-8
- Benus RF, Bohus B, Koolhaas JM y van Oortmerssen GA (1989) Behavioural strategies of aggressive and non-aggressive male mice in active shock avoidance. *Behav Processes* 120:1-12
- Benus RF, Bohus B, Koolhaas JM y van Oortmerssen GA (1991b) Heritable variation for aggression as a reflection of individual coping strategies. *Experientia* 47, 1008-1019
- Benus RF, den Daas S Koolhaas, JM y van Oortmerssen GA (1990). Routine formation and flexibility in social and non-social behavior of aggressive and non-aggressive mice. *Behavior* 112:176-93
- Benwell ME y Balfour DJ (1997) Regional variation in the effects of nicotine on catecholamine overflow in rat brain. *Eur J Pharmacol* 325:13-20
- Benwell ME, Balfour DJ y Anderson JM (1990) Smoking-associated changes in the serotonergic systems of discrete regions of human brain. *Psychopharmacology* 102:68-72
- Berger-Sweeney J, Arnold A, Gabeau D y Mills J (1995) Sex differences in learning and memory in mice: effects of sequence of testing and cholinergic blockade. *Behav Neurosci* 109:859-73
- Bernal MC, Vicens P, Carrasco MC y Redolat R (1999) Effects of nicotine on spatial learning in C57BL mice. *Behav Pharmacol* 10:333-36
- Bert B, Fink H, Huston JP y Voits M (2002) Fischer 344 and Wistar rats differ in anxiety and habituation but not in water maze performance. *Neurobiol Lear Mem* 78:11-22
- Beuzen A y Belzung C (1995). Link between memory and anxiety states: a study by principal component analysis. *Physiol Behav* 1:111-18
- Blanchard RJ, McKittrick CR y Blanchard DC (2001) Animal models of social stress: effects on behavior and brain neurochemical systems. *Physiol Behav* 73:261-71
- Blanchard RJ, Wall PM y Blanchard DC (2003) Problems in the study of rodent aggression. *Horm Behav* 44:161-70
- Boix F, Fernández-Teruel A y Tobefia A (1988) The anxiolytic action of benzodiazepines is not present in handling-habituated rats. *Pharmacol Biochem Behav* 31:541-6
- Bolles RC (1970) Species-specific defense reactions and avoidance learning. *Psychological Reviews* 77:32-48
- Bowling SL y Bardo MT (1994) Locomotor and rewarding effects of amphetamine in enriched, social and isolate reared rats. *Pharmacol Biochem Behav* 48:459-64
- Brain PF, McAllister KH y Walsmsley SV (1989). Drug effects on social behaviour: Methods in Ethopharmacology. En Boulton AA, Baker GB, Greenshaw AJ (Eds) *Neuromethods*, Clifton, NJ. The Humana Press Inc 687-9
- Brambilla R, Gnesutta N, Minichiello L, White G, Roylance AJ, Herron CE, Ramsey M, Wolfer DP, Cestari V, Rossi-Arnaud C, Grant SGN, Chapman PF, Lipp HP, Sturani E y Klein R (1997) A role for the Ras signalling pathway in synaptic transmission and long-term memory. *Nature* 390:281-6

- Breese CR, Marks MJ, Logel J, Adams CE, Sullivan B, Collins AC y Leonard S (1997) Effect of smoking history on [3H]nicotine binding in human postmortem brain. *J Pharmacol Exp Ther* 282: 7-13
- Brennan FX (2004) Genetic differences in leverpress escape/avoidance conditioning in seven mouse strains. *Genes Brain Behav* 3:110-4
- Breslau N y Klein DF (1999) Smoking and panic attacks. *Arch Gen Psychiatry* 56:1141-7
- Breslau N, Kilbey MM y Andreski P (1991) Nicotine dependence, major depression and anxiety in young adults. *Arch Gen Psychiatry* 48:1069-74
- Brioni JD y Arneric SP (1993) Nicotinic receptor agonists facilitate retention of avoidance training: participation of dopaminergic mechanisms. *Behav Neural Biol* 59:57-62
- Brioni JD, O'Neill AB, Kim DJB y Decker MW (1993) Nicotinic receptor agonists exhibit anxiolytic-like effects on the elevated plus-maze test. *Eur J Pharmacol* 238:1-8
- Broseta I, Rodriguez-Arias M, Aguilar MA y Mifarro J (2005) Isolation decreases physical and motivational aspects of morphine withdrawal. *Behav Pharmacol* 16:131-8
- Brown RW y Kolb B (2001a) Nicotine sensitization increases dendritic length and spine density in the nucleus accumbens and cingulate cortex. *Brain Res* 899: 94-100
- Brown RW y Kolb B (2001b) Nicotine improvement of Morris water task performance after fimbria-fornix lesion is blocked by mecamylamine. *Behav Brain Res* 119:185-92
- Brown RW, González CLR y Kolb B (2000) Nicotine improves Morris water task performance in rats given medial frontal cortex lesions. *Pharmacol Biochem Behav* 67: 473-8
- Brush FR (2003a) Selection for differences in avoidance learning: the Syracuse strains differ in anxiety, not learning ability. *Behav Genet* 33 :677-96
- Brush FR (2003b) The Syracuse strains, selectively bred for differences in active avoidance learning, may be models of genetic differences in trait and state anxiety. *Stress* 6 :77-85
- Burghaus L, Schutz U, Krempel U, Lindstrom J y Schroder H (2003) Loss of nicotinic acetylcholine receptor subunits alpha4 and alpha7 in the cerebral cortex of Parkinson patients. *Parkinsonism Relat Disord* 9:243-6
- Burwell RD, Saddoris MP, Bucci DJ y Wiig KA (2004) Corticohippocampal contributions to spatial and contextual learning. *J Neurosci* 24:3826-36
- Cain DP (1998) Testing the NMDA, long-term potentiation, and cholinergic hypotheses of spatial learning. *Neurosci Biobehav Rev* 22:181-93
- Cain DP, Saucier D, Hall J, Hargreaves EL y Boon F (1996) Detailed behavioral analysis of water maze acquisition under APV or CNQX: contributions of sensorimotor disturbances to drug-induced acquisition deficit. *Behav Neurosci* 110:86-102
- Cándido A, González F y de Brugada I (2004) Safety signals from avoidance learning but not from yoked classical conditioning training pass both summation and retardation tests for inhibition. *Behav Proc* 66:153-60
- Capone F, Oliverio A, Pomponi M, Marta M, Gatta F y Pavone F (1999) Effects of the novel acetylcholinesterase inhibitor N-Octyl-1,2,3,4-tetrahydro-9-aminoacridine on locomotor activity and avoidance learning in mice. *Neurobiol Learn Mem* 71:301-7

- Carrasco MC, Vicens P, Vidal J y Redolat R (2004) Effects of acute administration of bupropion on behavior in the elevated plus-maze test by NMRI mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 28:1135-41
- Champtiaux N, Gotti C, Cordero-Erausquin M, David DJ, Przybylski C, Lena C, Clementi F, Moretti M, Rossi FM, Le Novère N, McIntosh JM, Gardier AM y Changeux JP (2003) Subunit composition of functional nicotinic receptors in dopaminergic neurons investigated with knock-out mice. *J Neurosci* 23:7820-9
- Chapillon P, Roullet P y Lassalle JM (1995) Ontogeny of orientation and spatial learning on the radial maze in mice. *Dev Psychobiol* 28:429-42
- Cheeta S, Irvine E y File SE (2001) Social isolation modifies nicotine's effects in animal tests of anxiety. *Br J Pharmacol* 132:1389-95
- Chen Y, Shohami E, Constantini S y Weinstock M (1998) Rivastigmine, a brain-selective acetylcholinesterase inhibitor, ameliorates cognitive and motor deficits induced by closed-head injury in the mouse. *J Neurotrauma* 15:231-7
- Cherek DR (1984). Effects of cigarette smoking on human aggressive behavior. En *Biological Perspectives on Aggression*. New York. Alan R Liss 333-44
- Cho Y, Giese KP, Tanila FP, Silva AJ y Eichembaum J (1998) Unstable hippocampal spatial representations in α CaMKII β 286A point mutant and CREB knockout mice. *Science* 279:867-70
- Clementi F, Fornasari D y Gotti C (2000) Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: from structure to therapeutics. *Trends Pharmacol Sci* 21:35-7
- Compton DM, Dietrich KL, Smith JS y Davis BK (1995) Spatial and non-spatial learning in the rat following lesions to the nucleus locus coeruleus. *Neuroreport* 7:177-82
- Constantinidis C y Wang XJ (2004) A neural circuit basis for spatial working memory. *Neuroscientist* 10: 553-65
- Cooper E, Couturier S y Ballivet M (1991) Pentameric structure and subunit stoichiometry of a neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Nature* 350:235-8
- Costall B, Jones BJ, Kelly ME, Naylor Rj y Tomkins DM (1989) Exploration of mice in a black and white test box: validation as a model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 32:777-85
- Costa-Miserachs D, Portell-Cortes I, Aldavert-Vera L, Torras-Garcia M y Morgado-Bernal I (1993) Facilitation of a distributed shuttlebox conditioning with post-training epinephrine in rats. *Behav Neural Biol* 60:75-8
- Costa-Miserachs D, Portell-Cortes I, Aldavert-Vera L, Torras-Garcia M y Morgado-Bernal I (1994) Long-term memory facilitation in rats by posttraining epinephrine. *Behav Neurosci* 108:469-74
- Coudereau JP, Debray M, Monier C, Bourre JM y Frances H (1997b) Isolation impairs place preference conditioning to morphine but not aversive learning in mice. *Psychopharmacology* 130:117-23
- Coudereau JP, Monier C, Bourre JM y Frances H (1997a) Effect of isolation on pain threshold and on different effects of morphine. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 21:997-1018
- Coudereau JP, Stain F, Drion N, Sandouk P, Monier C, Debray M, Scherrmann JM, Bourre JM y Frances H (1999) Effects of social isolation on the metabolism of morphine and its passage through the blood-brain barrier and on consumption of sucrose solutions. *Psychopharmacology* 144:198-204
- Court JA, Martin-Ruiz C, Graham A y Perry E (2000) Nicotinic receptors in human brain: topography and pathology. *J Chem Neuroanat* 20:281-98

- Courvoisier H, Moisan MP, Sarrieau A, Hendley ED y Mormede P (1996) Behavioral and neuroendocrine reactivity to stress in the WKHA/WKY inbred rat strains: a multifactorial and genetic analysis. *Brain Res* 743:77-85
- Cozzolino R, Guaraldi D, Giuliani A, Ghirardi O, Ramacci MT y Angelucci L (1994) Effects of concomitant nicotinic and muscarinic blockade on spatial memory disturbance in rats are purely additive: evidence from the Morris water maze task. *Physiol Behav* 56:111-4
- Cressant A, Muller RU y Poucet B (1997) Failure of centrally placed objects to control the firing fields of hippocampal place cells. *J Neurosci* 17:2531-42
- D'Hooge R y De Deyn PP (2001) Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Br Res Rev* 36: 60-90
- Da Cunha C, Angelucci ME, Canteras NS, Wonnacott S y Takahashi RN (2002) The lesion of the rat substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons as a model for Parkinson's disease memory disabilities. *Cell Mol Neurobiol* 22:227-37
- Dajas-Bailador FA, Lima PA y Wonnacott S (2000) The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor subtype mediates nicotine protection against NMDA excitotoxicity in primary hippocampal cultures through a Ca(2+) dependent mechanism. *Neuropharmacology* 39:2799-807
- Dani JA y De Biasi M (2001) Cellular mechanisms of nicotine addiction. *Pharmacol Biochem Behav* 70:439-46
- Dani JA y Heinemann S (1996) Molecular and cellular aspects of nicotine abuse. *Neuron* 16:905-8
- Da Silva VA, McLean AE y Beales D (1996) Ethanol elimination by rats as a function of reproductive state, gender and nutritional status. *Braz J Med Biol Res* 29:651-7
- De Boer SF, Van der Vegt B y Koolhaas JM (2003): Individual variation in aggression of feral rodent strains: a standard for the genetics of aggression and violence? *Behav Genet* 33:485-501
- De Jong JG, van der Vegt BJ, Buwalda B y Koolhaas JM (2005) Social environment determines the long-term effects of social defeat. *Physiol Behav* 84:87-95
- De Kloet ER (2000) Stress in the brain. *Eur J Pharmacol* 405:139-47
- Decker MW y Majchrzak MJ (1992) Effects of systemic and intracerebroventricular administration of mecamylamine, a nicotinic cholinergic antagonist, on spatial memory in rats. *Psychopharmacology* 107:530-4
- Decker MW, Intrioni-Collison IB y McGaugh JL (1989) Effects of Naloxone on Morris water maze learning in the rat: enhanced acquisition with pretraining but not post-training administration. *Psychobiol* 17:270-5
- Decker MW, Majchrzak MJ y Anderson DJ (1992). Effects of nicotine on spatial memory deficits in rats with septal lesions. *Brain Res* 572: 281-5
- Decker MW, Majchrzak MJ y Arneric SP (1993) Effects of lobeline, a nicotinic receptor agonist, on learning and memory. *Pharmacol Biochem Behav* 45:571-6
- Del Arco A, Zhu S, Terasmaa A, Mohammed AH y Fuxe K (2004) Hyperactivity to novelty induced by social isolation is not correlated with changes in D2 receptor function and binding in striatum. *Psychopharmacology* 171:148-55
- Dellu F, Mayo W, Vallee M, Le Moal M y Simon H. (1997) Facilitation of cognitive performance in aged rats by past experience depends on type of information processing involved: a combined cross-sectional and longitudinal study. *Neurobiol Learn Mem* 67:121-8

- De-Mello N, Souza-Junior IQ y Carobrez AP (2005) Pilocarpine prevents age-related spatial learning impairments in rats. *Behav Brain Res* 158:263-8
- Devan BD y White NM (1999) Parallel information processing in the dorsal striatum: relation to hippocampal function. *J Neurosci* 19:2789-98
- Di Chiara G (2000) Role of dopamine in the behavioural actions of nicotine related to addiction. *Eur J Pharmacol* 393:295-314
- DiMattia BD y Kesner RP (1988) Spatial cognitive maps: differential role of parietal cortex and hippocampal formation. *Behav Neurosci* 102:471-80
- Dinsmoor JA (2001) Stimuli inevitably generate by behavior that avoids electric shock are inherently reinforcing. *J Exp Anal Behav* 75:311-33
- Domino EF (2003) Effects of tobacco smoking on electroencephalographic, auditory evoked and event related potentials. *Brain Cogn* 53:66-74
- Dong E, Matsumoto K, Watanabe H (1999) Involvement of peripheral type of benzodiazepine receptor in social isolation stress-induced decreased in pentobarbital sleep in mice. *Life Sci* 65:1561-8
- Douglas LA, Varlinskaya EI y Spear LP (2003) Novel-object place conditioning in adolescent and adult male and female rats: effects of social isolation. *Physiol Behav* 80: 317-25
- Driscoll P y Baettig K (1981) Selective inhibition by nicotine of shock induced fighting in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 14:175-9
- Driscoll P, Dedek J, Martin JR y Zivkovic B (1983) Two-way avoidance and acute shock stress induced alterations of regional noradrenergic, dopaminergic and serotonergic activity in Roman high- and low-avoidance rats. *Life Sci* 33:1719-25
- Ducottet C y Belzung C (2005) Correlations between behaviours in the elevated plus maze and sensitivity to unpredictable subchronic mild stress: evidence from inbred strains of mice. *Behav Brain Res* 156: 153-62
- Dudchenko PA (2004) An overview of the tasks used to test working memory in rodents. *Neurosci Biobehav Rev* 28:699-709
- Edo-Izquierdo S, Aldavert-Vera L, Coll-Andreu M, Garau-Florit A y Segura-Torres P (1994) A parametrical study of two-way active avoidance acquisition and long-term retention: New approaches for data analyses. *Psicothema* 6:49-69
- Einon D. 1980. Spatial memory and response strategies in rats: age, sex and rearing differences in performance. *Q J Exp Psychol* 32:473-89
- Erickson CK (1971) Studies on the mechanism of avoidance facilitation by nicotine. *Psychopharmacology* 22:357-68
- Escorihuela RM, Fernandez-Teruel A, Zapata A, Nunez JF y Tobefia A (1993) Flumazenil prevents the anxiolytic effects of diazepam, alprazolam and adinazolam on the early acquisition of two-way active avoidance. *Pharmacol Res* 28:53-8
- Escorihuela RM, Fernández-Teruel A, Gil L, Aguilar R, Tobefia A, y Driscoll P (1999) Inbred roman high- and low-avoidance rats: differences in anxiety, novelty-seeking, and shuttlebox behaviors. *Physiol Behav* 67:19-26
- Espejo EF (1997) Effects of weekly or daily exposure to the elevated plus-maze in male mice. *Behav Brain Res* 87: 233-8

- Essman WB (1971) Changes in cholinergic activity and avoidance behavior by nicotine in differentially housed mice. *Int J Neurosci* 2:199-205
- Evangelista AM, Gattoni RC e Izquierdo I (1970) Effect of amphetamine, nicotine and hexamethonium on performance of a conditioned response during acquisition and retention trials. *Pharmacology* 3:91-6
- Faraday MM, Elliott BM y Grunberg NE (2001) Adult vs adolescent rats differ in biobehavioral responses to chronic nicotine administration. *Pharmacol Biochem Behav* 70:475-89
- Faraday MM, Scheufele PM, Rahman MA y Grunberg NE (1999) Effects of chronic nicotine administration on locomotion depend on rat sex and housing condition. *Nicotine Tob Res* 1:143-51
- Feldker DE, Datson NA, Veenema AH, Meulmeester E, de Kloet ER y Vreugdenhil E (2003) Serial analysis of gene expression predicts structural differences in hippocampus of long attack latency and short attack latency mice. *Eur J Neurosci* 17:379-87
- Felip CM, Rodríguez-Arias M, Aguilar MA y Mifarro J (2001) Antiaggressive and motor effects of the DA release inhibitor CGS 10746B. *Aggress Behav* 27:382-90
- Fendt M y Fanselow MS (1999) The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. *Neurosci Biobehav Rev* 23:743-60
- Ferguson SA y Cada AM (2004) Spatial learning/memory and social and nonsocial behaviors in the spontaneously hypertensive, Wistar-Kyoto and Sprague-Dawley rat strains. *Pharmacol Biochem Behav* 77:583-94
- Fernández-Teruel A y Escorihuela RM (1997) Modeling emotional reactivity and sensation/novelty seeking with the Roman/Verh rat lines/strains: an introduction. *Behav Genet* 27:499-501
- Fernández-Teruel A, Escorihuela RM, Boix F y Tobefía A (1991b) Effects of different handling-stimulation procedures and benzodiazepines on two-way active avoidance acquisition in rats. *Pharmacol Res* 24 :273-82
- Fernández-Teruel A, Escorihuela RM, Castellano B, Gonzalez B y Tobefía A (1997) Neonatal handling and environmental enrichment effects on emotionality, novelty/reward seeking, and age-related cognitive and hippocampal impairments: focus on the Roman rat lines. *Behav Genet* 27:513-26
- Fernández-Teruel A, Escorihuela RM, Gray JA, Aguilar R, Gil L, Giménez-Llort L, Tobefía A, Bhomra A, Nicod A, Mott R, Driscoll P, Dawson GR y Flint J. (2002) A quantitative trait locus influencing anxiety in the laboratory rat. *Genome Res* 12:618-26
- Fernández-Teruel A, Escorihuela RM, Nuñez JP, Zapata A, Boix F, Salazar W y Tobefía A (1991a) The early acquisition of two-way active avoidance as an anxiety-mediated behavior: Psychopharmacological behavior. *Br Res Bull* 26:173-6
- Ferrari PF, Palanza P, Parmigiani S y Rodgers RJ (1998) Interindividual variability in Swiss male mice: relationship between social factors, aggression and anxiety. *Physiol Behav* 5:821-7
- Ferrari PF, Parmigiani S, Rodgers RJ y Palanza P (1997) Differential effects of chloridazepoxide on aggressive behavior in male mice: the influence of social factors. *Psychopharmacology* 134:258-65B
- Ferré P, Escorihuela RM, Fernández-Teruel A, Núñez JF, García E, González B, Castellano B y Tobefía A (1994) Reducción del impacto del estrés y prevención de déficits asociados con el envejecimiento en ratas: la estimulación postnatal y el enriquecimiento ambiental. *Anales de Psicología* 10:111-25

- Ferreira A, Pereira M, Agrati D, Uriarte N y Fernández-Guasti A (2002) Role of maternal behavior on aggression, fear and anxiety. *Physiol Behav* 77:197-204
- Ferreira VM, Frausto S, Browning MD, Savage DD, Morato GS y Valenzuela CF (2001) Ionotropic glutamate receptor subunit expression in the rat hippocampus: lack of an effect of a long-term ethanol exposure paradigm. *Alcohol Clin Exp Res* 25:1536-41
- File SE, Cheeta S y Kenny PJ (2000) Neurobiological mechanisms by which nicotine mediates different types of anxiety. *Eur J Pharmacol* 393:231-6
- File SE, Kenny PG y Ouagazzal AM (1998) Bimodal modulation by nicotine of anxiety in the social interaction test: Role of dorsal hippocampus. *Behav Neurosci* 112:1-7
- Florian C y Roulet P (2004) Hippocampal CA3-region is crucial for acquisition and memory consolidation in Morris water maze task in mice. *Behav Brain Res* 154:365-74
- Fone KCF, Shalders K, Fox ZD, Arthur R y Marsden CA (1996) Increased 5-HT_{2c} receptor responsiveness occurs on rearing rats in social isolation. *Psychopharmacology* 123:346-52
- Fontana DJ, Daniels SE, Henderson C, Eglen RM y Wong EH (1995) Ondansetron improves cognitive performance in the Morris water maze spatial navigation task. *Psychopharmacology* 120:409-17
- Fordyce DE y Wehner JM (1993) Effects of aging on spatial learning and hippocampal protein kinase C in mice. *Neurobiol Aging* 14:309-17
- Frances H, Maurin Y, Lecrubier Y, Puech AJ y Simon P (1981) Effect of chronic lithium treatment on isolation-induced behavioral and biochemical effects in mice. *Eur J Pharmacol* 72:337-41
- Francis DD, Zaharia MD, Shanks N y Anisman H. (1995) Stress-induced disturbances in Morris water maze performance: interstrains variability. *Physiol Behav* 58:57-65
- Francis L, Liu Z y Bures J (1997) Retrieval of overtrained place navigation during occlusion of one eye and ipsi- or contralateral blockade of relevant brain centres in the rat. *Neurobiol Learn Mem* 68:60-7
- Francis PT, Palmer AM, Snape M y Wilcock GK (1999) The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 66:137-47
- Freedman R, Leonard S, Gault JM, Hopkins J, Cloninger CR, Kaufmann CA, Tsuang MT, Faraone SV, Malaspina D, Svrakic DM, Sanders A y Gejman P (2001) Linkage disequilibrium for schizophrenia at the chromosome 15q13-14 locus of the alpha7-nicotinic acetylcholine receptor subunit gene (CHRNA7). *Am J Med Genet* 105:20-2
- French SJ, Humby T, Horner CH, Sofroniew MV y Rattray M (1999) Hippocampal neurotrophin and trk receptor mRNA levels are altered by local administration of nicotine, carbachol and pilocarpine. *Brain Res Mol Brain Res* 67:124-36
- Fu Y, Matta SG, Valentine JD y Sharp BM (1998) Desensitization and resensitization of norepinephrine release in the rat hippocampus with repeated nicotine administration. *Neurosci Lett* 241:147-50
- Fulford AJ y Marsden CA (1997a) Effect of isolation-rearing on noradrenaline release in rat hypothalamus and hippocampus in vitro. *Brain Res* 748:93-9
- Fulford AJ y Marsden CA (1997b) Social isolation in the rat enhances α ₂-autoreceptor function in the hippocampus in vivo. *Neurosci* 77:57-64
- Galani R., Weiss I., Cassel, JC y Kelche C (1998) Spatial memory, habituation, and reactions to spatial and nonspatial changes in rats with selective lesions of the hippocampus, the entorhinal cortex or the subiculum. *Behav Br Res* 96:1-12

- Gallagher M, Burwell R y Burchinal M (1993) Severity of spatial learning impairment in aging: development of a learning index for performance in the Morris water maze. *Behav Neurosci* 107: 618-26
- Gamallo A, Villanua A, Trancho G y Fraile A (1986) Stress adaptation and adrenal activity in isolated and crowded rats. *Physiol Behav* 36:217-21
- Gariépy JL, Gendreau PL, Mailman RB, Tancer ME y Lewis MH (1995) Rearing conditions alter social reactivity and D1 dopamine receptors in high- and low-aggressive mice. *Pharmacol Biochem Behav* 51:767-73
- Gariépy JL, Rodríguez RM y Jones BC (2002) Handling, genetic and housing effects on the mouse stress system, dopamine function, and behavior. *Pharmacol Biochem Behav* 73: 7-17
- Gendreau PL, Petit JM, Gariépy JL y Lewis MH (1998) D2-like dopamine receptor mediation of social-emotional reactivity in a mouse model of anxiety: strain and experience effects. *Neuropsychopharmacol* 18:210-21
- Gendreau PL, Petit JM, Petrova A, Gariépy J, Lewis MH (2000) D₃ and D₂ dopamine receptor agonists differentially modulate isolation-induced social-emotional reactivity in mice. *Behav Brain Res* 114: 107-117
- Genedani S, Bernardi M, Bertolini A (1983) Sex-linked differences in avoidance learning in the offspring of rats treated with nicotine during pregnancy. *Psychopharmacol.*, 80:93-95
- Gentsch C, Lichtsteiner M, Frischknecht HR, Feer H y Siegfried B (1988) Isolation-induced locomotor hyperactivity and hypoalgesia in rats are prevented by handling and reversed by resocialization. *Physiol Behav* 43:13-6
- George TP y O'Malley SS (2004) Current pharmacological treatments for nicotine dependence. *Trends Pharmacol Sci* 25:42-8
- Getova D y Bowerly NG (1998) The modulatory effects of high affinity GABA_B receptor antagonist in an active avoidance learning paradigm in rats. *Psychopharmacology* 137:369-73
- Gevaerd MS, Miyoshi E, Silveira R, Canteras NS, Takahashi RN y Da Cunha C (2001) L-Dopa restores striatal dopamine level but fails to reverse MPTP-induced memory deficits in rats. *Int J Neuropsychopharmacol* 4:361-70
- Gilbert DG (1979) Paradoxical tranquilizing and emotion-reducing effects of nicotine. *Psychological Bulletin* 86:643-61
- Gilliam DM y Schlesinger K (1985) Nicotine-produced relearning deficit in C57BL/6J and DBA/2j mice. *Psychopharmacology* 86: 291-5
- Giorgi O, Lecca D, Piras G, Driscoll P y Corda MG (2003a) Dissociation between mesocortical dopamine release and fear-related behaviours in two psychogenetically selected lines of rats that differ in coping strategies to aversive conditions. *Eur J Neurosci* 17:2716-26
- Giorgi O, Piras G, Lecca D, Hansonn S, Driscoll P y Corda MG (2003b) Differential neurochemical properties of central serotonergic transmission in Roman high- and low-avoidance rats. *J Neurochem* 86:422-31
- Gluck M y Myers C (1993) Hippocampal mediation of stimulus representation: A computational theory. *Hippocampus* 3:491-516
- Gotti C, Fornasari D y Clementi F (1997) Human neuronal nicotinic receptors. *Prog Neurobiol* 53:199-237

- Gould TJ y Wehner JM (1999). Nicotine enhancement of contextual fear conditioning. *Behav Brain Res* 102:31-9
- Gower AJ y Lamberty Y (1993) The aged mouse as a model of cognitive decline with special emphasis on studies in NMRI mice. *Behav Brain Res* 57:163-73
- Granda JI (2004) El tabaquismo como enfermedad adictiva crónica. En: Jimenez CA y Fagerström KO. *Tratado De Tabaquismo*. Aula Médica. Madrid
- Gray JA (1993) La psicología del miedo y del estrés. Barcelona. Labor :193-220
- Gray JA y McNaughton N (1983) Comparison between the behavioural effects of septal and hippocampal lesions: A review. *Neurosci Biobehav Rev* 7:119-88
- Gray R, Rajan AS, Radcliffe KA, Yakehiro M y Dani JA (1996) Hippocampal synaptic transmission enhanced by low concentrations of nicotine. *Nature* 383:713-6
- Griebel G, Belzung C, Perrault G y Sanger DJ (2000) Differences in anxiety-related behaviours and in sensitivity to diazepam in inbred and outbred strains of mice. *Psychopharmacology* 148:164-70
- Grigoryan GA, Mitchell SN, Hodges H, Sinden JD y Gray JA (1994) Are the cognitive-enhancing effects of nicotine in the rat with lesions to the forebrain cholinergic projection system mediated by an interaction with the noradrenergic system?. *Pharmacol Biochem Behav* 49:511-21
- Guidotti A, Dong E, Matsumoto K, Pinna G, Rasmusson AM y Costa E (2001) The socially-isolated mouse: a model to study the putative role of allopregnanolone and 5alpha-dihydroprogesterone in psychiatric disorders. *Brain Res Rev* 37:110-5
- Guillazo-Blanch G, Marti-Nicolovius M, Vale-Martinez A, Gruart-Masso A, Segura-Torres P y Morgado-Bernal I (1995b) Effects of parafascicular electrical stimulation and lesion upon two-way active avoidance in rats. *Neurobiol Learn Mem* 64:215-25
- Guillazo-Blanch G, Nadal R, Vale-Martinez A, Martí-Nicolovius M, Arévalo R y Morgado-Bernal I (2002) Effects of fimbria lesions on trace two-way active avoidance acquisition and retention in rats. *Neurobiol Learn Mem* 78:406-25
- Guillazo-Blanch G, Vale-Martinez A, Marti-Nicolovius M y Morgado-Bernal I (1995a) Facilitatory and detrimental effects of parafascicular electrical stimulation upon two-way active avoidance conditioning in rats. *Neurobiol Learn Mem* 63:209-12
- Guillot PV y Chapouthier G (1996) Intermale aggression and dark/ light preference in ten inbred mouse strains. *Behav Brain Res* 77: 211-3
- Guo M, Fu Wu C, Liu W, Yu Yang J y Chen D (2004) Sex difference in psychological behavior changes induced by long-term social isolation in mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiat* 28:115-21
- Gutiérrez-Figueroa GP, Dalmaz C e Izquierdo I (1997) Effects of entorhinal cortex lesions on memory in different tasks. *Braz J Med Biol Res*. 30:769-74
- Hall FS (1998) Social deprivation of neonatal, adolescent, and adult rats has distinct neurochemical and behavioral consequences. *Crit Rev Neurobiol* 12:129-62
- Hall FS, Huang S, Fong GW, Pert A y Linnoila M (1998) Effects of isolation-rearing on locomotion, anxiety and responses to ethanol in Fawn Hooded and Wistar rats. *Psychopharmacology* 139:203-9
- Hall FS, Humby T, Wilkinson LS y Robbins TW (1997a) The effects of isolation rearing of rats on behavioural responses to food and environmental novelty. *Physiol Behav* 62:281-90

- Hall FS, Humby T, Wilkinson LS y Robbins TW (1997b) The effects of isolation rearing on sucrose consumption in rats. *Physiol Behav* 62:291-7
- Haller J y Halász J (1999) Mild social stress abolishes the effects of isolation on anxiety and chlordiazepoxide reactivity. *Psychopharmacology* 144: 311-5
- Haller J y Kruk MR (in press) Normal and abnormal aggression: human disorders and novel laboratory models. *Neurosci Biobehav Rev*
- Haller J, Baranyi J, Bakos N y Halasz J (2004) Social instability in female rats: effects on anxiety and buspirone efficacy. *Psychopharmacology* 174:197-202
- Haller J, Halasz J y Makara GB (2000) Housing conditions and the anxiolytic efficacy of buspirone: the relationship between main and side effects. *Behav Pharmacol* 11:403-12
- Hamid S, Dawe GS, Gray JA y Stephenson JD (1997) Nicotine induces long-lasting potentiation in the dentate gyrus of nicotine-primed rats. *Neurosci Res* 29:81-5
- Harmer CJ y Phillips GD (1998a) Isolation rearing enhances acquisition in a conditioned inhibition paradigm. *Physiol Behav* 65:525-33
- Harmer CJ y Phillips GD (1998b) Isolation rearing enhances the rate of acquisition of a discriminative approach task but does not affect the efficacy of a conditioned reward. *Physiol Behav* 63:177-84
- Heidbreder CA, Weiss IC, Domeney AM, Pryce C, Homberg J, Hedou G, Feldon J, Moran MC y Nelson P (2000) Behavioral, neurochemical and endocrinological characterization of the early social isolation syndrome. *Neuroscience* 100:749-68
- Heinrichs SC, Pich EM, Miczek KA, Britton KT y Koob GF (1992) Corticotropin-releasing factor antagonist reduces emotionality in socially defeated rats via direct neurotropic action. *Brain Res* 581:190-7
- Heishman SJ (1999) Behavioral and cognitive effects of smoking: relationship to nicotine addiction. *Nicotine Tob Res* 1:S143-7
- Heishman SJ y Henningfield JE (2000) Tolerance to repeated nicotine administration on performance, subjective, and physiological responses in nonsmokers. *Psychopharmacology* 152:321-33
- Hellems KGC, Bengel LC y Olmstead MC (2004) Adolescent enrichment partially reverses the social isolation syndrome. *Develop Brain Res* 150:103-15
- Helmstetter FJ (1992) The amygdala is essential for the expression of conditional hypoalgesia. *Behav Neurosci* 106:518-28
- Henniger MSH, Ohl F, Hölter SM, Weibenbacher P, Toschi N, Lörcher P, Wigger A, Spanagel R y Landgraf R (2000) Unconditioned anxiety and social behaviour in two rat lines selectively bred for high and low-anxiety-related behaviour. *Behav Brain Res* 111: 153-63
- Henriksson BG, Soderstrom S y Gower AJ (1992) Hippocampal nerve growth factor levels are related to spatial learning ability in aged rats. *Behav Brain Res* 48:15-20
- Hernández CM y Terry AV (2005) Repeated nicotine exposure in rats: Effects on memory function, cholinergic markers and nerve growth factor. *Neuroscience* 130:997-1112
- Hersi AI, Rowe W, Gaudreau P y Quirion R (1995) Dopamine D1 receptor ligands modulate cognitive performance and hippocampal acetylcholine release in memory-impaired aged rats. *Neuroscience* 69:1067-74

- Heyser CJ, McDonald JS, Polis IY y Gold LH (1999) Strain distribution of mice in discriminated Y-maze avoidance learning: genetic and procedural differences. *Behav Neurosci* 113:91-102
- Hilakivi LA, Ota M y Lister RG (1989) Effect of isolation on brain monoamines and the behavior of mice in tests of exploration, locomotion, anxiety and behavioral despair. *Pharmacol Biochem Behav* 33:371-4
- Ho Y, Cornelius RP, Guo L y Schwarting RK (2004) Acute and long-term consequences of single-MDMA administration in relation to individual anxiety levels in the rat. *Behav Brain Res* 149: 135-44
- Ho Y, Eichendorff J y Schwarting RK (2002) Individual response profiles of male Wistar rats in animal models of anxiety and depression. *Behav Brain Res* 136:1-12
- Hodges H (1996) Maze procedures: the radial-arm maze and water maze compared. *Cogn Brain Res* 3: 167-181
- Hodges H, Sinden J, Turner JD, Netto CA, Sowinski P y Gray JA (1992) Nicotine as a tool to characterise the role of the forebrain cholinergic projection system in cognition. In: *The Biology of Nicotine* (Eds. PM Lipiello, AC Collins, JA Gray, JH Robinson) 157-180 Raven Press, New York
- Hodges H, Sowinski P, Sinden JD, Netto CA y Fletcher A (1995) The selective 5-HT₃ receptor antagonist WAY100289, enhances spatial memory in rats with ibotenate lesions of the forebrain cholinergic projection system. *Psychopharmacology* 117:318-32
- Hoh TE, Kolb B, Eppel A, Vanderwolf CH y Cain DP (2003) Role of the neocortex in the water maze task in the rat: a detailed behavioral and Golgi-Cox analysis. *Behav Brain Res* 138:81-94
- Hölscher C (1999) Stress impairs performance in spatial water maze learning tasks. *Behav Brain Res* 100: 225-35
- Holson RR, Scallet AC, Ali SF y Turner BB (1991) "Isolation stress" revisited: isolation-rearing effects depend on animal care methods. *Physiol Behav* 49:1107-18
- Hood KE y Cairns RB (1989) A developmental-genetic analysis of aggressive behavior in mice: IV Genotype-environment interaction. *Agr Behav* 15:361-80
- Howes SR, Dalley JW, Morrison CH, Robbins TW y Everitt BJ (2000) Leftward shift in the acquisition of cocaine self-administration in isolation-reared rats: relationship to extracellular levels of dopamine, serotonin and glutamate in the nucleus accumbens and amygdala-striatal FOS expression. *Psychopharmacology* 151:55-63
- Hughes JR y Hatsukami D (1986) Signs and symptoms of tobacco withdrawal. *Arch Gen Psychiatry* 43: 289-94
- Irvine EE, Cheeta S y File SE (1999) Time-course of changes in the social interaction test of anxiety following acute and chronic administration of nicotine. *Behav Pharmacol* 10:691-7
- Irvine EE, Cheeta S, Marshall M y File SE (2001) Different treatment regimens and the development of tolerance to nicotine's anxiogenic effects. *Pharmacol Biochem Behav* 68: 769-76
- Ise Y, Narita M, Nagase H y Suzuki T (2000) Modulation of opioidergic system on mecamylamine-precipitated nicotine-withdrawal aversion in rats. *Psychopharmacology* 151:49-54
- Izquierdo I (1991) Role of NMDA receptors in memory. *Trends Pharmacol Sci* 12: 128-9

- Jahkel M, Rilke O, Koch R y Oehler J (2000) Open field locomotion and neurotransmission in mice evaluated by principal component factor analysis-effects of housing condition, individual activity disposition and psychotropic drugs. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 24:61-84
- Janas AM, Cunningham SC, Duffy KB, Devan BD, Greig NH, Holloway HW, Yu QS, Markowska AL, Ingram DK y Spangler EL (2005) The cholinesterase inhibitor, phenserine, improves Morris water maze performance of scopolamine-treated rats. *Life Sci* 76:1073-81
- Jarvis MJ (2004) ABC of smoking cessation. Why people smoke. *BMJ* 328:277-9
- Johansson IM y Nordberg A (1993) Pharmacokinetic studies of cholinesterase inhibitors. *Acta Neurol Scand Suppl* 149:22-5
- Johnson JG, Cohen P, Pine D, Klein DF, Kasen, S y Brook JS (2000) Association between cigarette smoking and anxiety disorders during adolescence and early adulthood. *JAMA* 284:2348-51
- Johnson SK, Carlson KM, Lee J, Burr LE y Wagner CE (2003) Effects of nicotine on target biting and resident-intruder attack. *Life Sci* 73:311-7
- Jones GH, Marsden CA y Robbins TW (1991) Behavioural rigidity and rule-learning deficits following isolation-rearing in the rat: neurochemical correlates. *Behav Brain Res* 43:35-50
- Jones GH, Hernández TD, Kendall DA, Marsden CA y Robbins TW (1992) Dopaminergic and serotonergic function following isolation rearing in rats: study of behavioural responses and postmortem and in vivo neurochemistry. *Pharmacol Biochem Behav* 43:17-35
- Jones GH, Marsden CA y Robbins TW (1990) Increased sensitivity to amphetamine and reward-related stimuli following social isolation in rats: possible disruption of dopamine-dependent mechanisms. *Psychopharmacology* 102:364-72
- Jones S, Sudweeks S y Yakel JL (1999) Nicotinic receptors in the brain: correlating physiology with function. *Trends Neurosci* 22:555-61
- Juraska JM, Henderson C y Muller J (1984) Differential rearing experience, gender and radial maze performance. *Dev Psychobiol* 17:209-25
- Kamin LJ (1956) The effects of termination of the CS and avoidance of the US on avoidance learning. *J Comp Physiol Psychol.* 49:420-4
- Karolewicz B y Paul IA (2001) Group housing of mice increases immobility and antidepressant sensitivity in the forced swim and tail suspension tests. *Eur J Pharmacol* 415:197-201
- Katz DM y Steinberg H (1972) Proceedings: Previous environment and responses to morphine. *Br J Pharmacol* 44:350P
- Keith JR y Galizio M (1997) Acquisition in the Morris swim task is impaired by a benzodiazepine but not an NMDA antagonist: a new procedure for distinguishing acquisition and performance effects. *Psychobiology* 25: 217-28
- Kenny PJ, File SE y Rattray M (2001) Nicotine regulates 5-HT_{1A} receptor gene expression in the cerebral cortex and dorsal hippocampus. *Eur J Neurosci* 13:1267-71
- Kim JH, Chung JY, Lee YJ, Park S, Kim JH, Hahm DH, Lee HJ y Shim I (2004) Effects of methanol extract of *Uncariae Ramulus et Uncus* on ibotenic acid-induced amnesia in the rat. *J Pharmacol Sci* 96:314-23
- Kim JJ, Koo JW, Lee HJ y Han JS (2005) Amygdalar inactivation blocks stress-induced impairments in hippocampal long-term potentiation and spatial memory. *J Neurosci* 25:1532-9

- Kim JW y Kirkpatrick B (1996) Social isolation in animal models of relevance to neuropsychiatric disorders. *Biol Psychiatry* 40:918-22
- Klapdor K y Van Der Staay J (1996) The Morris water-escape task in mice: strain differences and effects of intra-maze contrast and brightness *Physiol Behav* 60:1247-54
- Koolhaas JM, Korte SM, De Boer SF, Van Der Vegt BJ, Van Reenen CG, Hopster H, De Jong IC, Ruis MA y Blokhuis HJ (1999) Coping styles in animals: current status in behavior and stress-physiology. *Neurosci Biobehav Rev* 23:925-35
- Krazem A, Borde N y Beracochea D (2001) Effects of diazepam and beta-CCM on working memory in mice: relationships with emotional reactivity. *Pharmacol Biochem Behav.* 68:235-44
- Kudryavtseva NN, Bondar NP y Avgustinovich DF (2002) Association between experience of aggression and anxiety in male mice. *Behav Brain Res* 133:83-93
- Kudryavtseva NN, Bondar NP y Avgustinovich DF (2004) Effects of repeated experience of aggression on the aggressive motivation and development of anxiety in male mice. *Neurosci Behav Physiol* 34:721-30
- Kvist B (1989) Learning in mice selectively bred for high and low aggressiveness. *Psychol Rep* 64:127-30
- Kvist B (1992) Aggressive female mice and learning-sensitive open-field parameters. En Björkqvist, K., Niemellä P. (Eds.) "Of mice and woman: Aspects of female aggression" San Diego Academic Press 351-66
- Kvist B, Selander RK y Sandnabba NK (1997) Sex-related coping responses in mice selectively bred for aggression. *Percept Motor Skills* 84:911-4
- Lagerspetz KM (1964) Studies on the aggressive behaviour of mice. *Ann. Finnish Acad Sci B* 131:3
- Lamberty Y y Gower AJ (1991a) Age-related changes in spontaneous behavior and learning in NMRI mice from middle to old age. *Physiol Behav* 51:81-8
- Lamberty Y y Gower AJ (1991b) Cholinergic modulation of spatial learning in mice in a Morris-type water maze. *Arch Int Pharmacodyn* 309:5-19
- Lamberty Y y Gower AJ (1993) Spatial processing and emotionality in aged NMRI mice: a multivariate analysis. *Physiol Behav* 54:339-43
- Lamberty Y y Gower AJ (1996) Arm width and brightness modulation of spontaneous behaviour of two strains of mice tested in the elevated plus-maze. *Physiol Behav* 59:439-44
- Landgraf R (2003) Animal models of anxiety. *Stress* 6:73-5
- Landgraf R y Wigger A (2002) High vs low anxiety-related behavior rats: an animal model of extremes in trait anxiety. *Behav Genet* 32:301-14
- Landgraf R y Wigger A (2003) Born to be anxious: neuroendocrine and genetic correlates of trait anxiety in HAB rats. *Stress* 6:111-9
- Lapin EP, Maker HS, Sershen H y Lajtha A (1989) Action of nicotine on accumbens dopamine and attenuation with repeated administration. *Eur J Pharmacol* 24:160:53-9
- Lapiz MDS, Fulford A, Muchimapura S, Mason R, Parker T y Marsden CA (2003) Influence of postweaning social isolation in the rat on brain development, conditioned behaviour and neurotransmission. *Neurosci Behav Physiol* 33:13-29

- Lapiz MDS, Mateo Y, Durkin S, Muchimapura S, Parker T y Marsden CA (1999) Central noradrenergic depletion in isolated rats enhances retention but not acquisition in the water maze. *Behav Pharmacol* 10 [Suppl]:S55
- Lapiz MDS, Mateo Y, Durkin S, Parker T y Marsden CA (2001) Effects of central noradrenaline depletion by the selective neurotoxin DSP-4 on the behaviour of the isolated rat in the elevated plus maze and water maze. *Psychopharmacology* 155:251-9
- Lapiz MDS, Mateo Y, Parker T y Marsden CA (2000) Effects of noradrenaline depletion in the brain on response to novelty in isolation-reared rats. *Psychopharmacology* 152:302-20
- Laplante F, Sibley DR y Quirion R (2004) Reduction in acetylcholine release in the hippocampus of dopamine D5 receptor-deficient mice. *Neuropsychopharmacol* 29:1620-7
- Lathe R (2004) The individuality of mice. *Genes Brain Behav* 3:317-27
- Lavolette SR y van der Kooy D (2004) The neurobiology of nicotine addiction: bridging the gap from molecules to behavior. *Nat Rev Neurosci* 5:55-65
- Le Houezec J (2001) Non-Dopaminergic Pathways in Nicotine Dependence. *Psychology*:12 Nicotine Addiction
- Le Houezec J (2003) Role of nicotine pharmacokinetics in nicotine addiction and nicotine replacement therapy: a review. *Int J Tuberc Lung Dis* 7:811-9
- Le Novere N y Changeux JP (1995) Molecular evolution of the nicotinic acetylcholine receptor: an example of multigene family in excitable cells. *J Mol Evol* 40:55-72
- Lecca D, Piras G, Driscoll P, Giorgi O y Corda MG (2004) A differential activation of dopamine output in the shell and core of the nucleus accumbens is associated with the motor responses to addictive drugs: a brain dialysis study in Roman high- and low-avoidance rats. *Neuropharmacology* 46:688-99
- LeDoux JE (1992) Brain mechanisms of emotion and emotional learning. *Curr Opin Neurobiol* 2:191-7
- LeDoux JE (2000) Emotion circuits in the brain. *Ann Rev Neurosci* 23:155-84
- LeDoux JE, Cicchetti P, Xagoraris A y Romanski LM (1990) The lateral amygdaloid nucleus: sensory interface of the amygdala in fear conditioning. *J Neurosci* 10:1062-9
- Lehmann K, Hundsdorfer B, Hartmann T y Teuchert-Noodt G (2004) The acetylcholine fiber density of the neocortex is altered by isolated rearing and early methamphetamine intoxication in rodents. *Exp Neurol* 189:131-40
- Leng A, Feldon J y Ferger B (2004) Long-term social isolation and medial prefrontal cortex: dopaminergic and cholinergic neurotransmission. *Pharmacol Biochem Behav* 77:371-9
- Leonard S y Bertrand D (2001) Neuronal nicotinic receptors: from structure to function. *Nicotine Tob Res* 3:203-23
- Levin ED (1992) Nicotinic systems and cognitive function. *Psychopharmacology* 108:417-31
- Levin ED (2002) Nicotinic receptor subtypes and cognitive function. *J Neurobiol* 53:633-40
- Levin ED y Slotkin TA (1998) Developmental neurotoxicity of nicotine. *Handbook of Developmental Neurotoxicology* (W Slikker Jr. y LW Chang eds.), Academic Press, San Diego, 587-615
- Levin ED y Christopher CN (2003) Lobeline-induced learning improvement of rats in the radial-arm maze. *Pharmacol Biochem Behav* 76:133-9

- Levin ED y Rezvani AH (2000) Development of nicotinic drug therapy for cognitive disorders. *Eur J Pharmacol* 393:141-6
- Levin ED y Simon BB (1998) Nicotinic acetylcholine involvement in cognitive function in animals. *Psychopharmacology* 138:217-30
- Levin ED y Torry D (1996) Acute and chronic nicotine effects on working memory in aged rats. *Psychopharmacology* 123:88-97
- Levin ED, Christopher NC, Briggs SJ y Rose JE (1993) Chronic nicotine reverses working memory deficits caused by lesions of the fimbria or medial basalocortical projection. *Cogn Brain Res* 1:137-43
- Levin ED, Kim P y Meray R (1996) Chronic nicotine working and reference memory effects in the 16-arm radial maze: interactions with D1 agonist and antagonist drugs. *Psychopharmacology* 127:25-30
- Levin ED, Lee C, Rose JE, Reyes A, Ellison G, Jarvik M y Gritz E (1990) Chronic nicotine and withdrawal effects on radial-arm maze performance in rats. *Behav Neural Biol* 53:269-76
- Liao D, Hessler NA y Malinow R (1995) Activation of postsynaptically silent synapses during pairing-induced LTP in CA1 region of hippocampal slice. *Nature* 375:400-4
- Liebsch G, Montkowski A, Holsboer F y Landgraf R (1998) Behavioural profiles of two Wistar rat lines selectively bred for high or low anxiety-related behaviour. *Behav Brain Res* 94:301-10
- Lindstrom J (2000) The structure of nAChRs. En: F Clementi, D Fornasari y C Gotti (Eds.) *Neuronal Nicotinic Receptors, Handbook of Experimental Pharmacology Vol. 144* Springer-Verlag Berlin
- Lipp HP, Schwegler H, Crusio WE, Wolfer DP, Leisinger-Trigona MC, Heimrich B y Driscoll P (1989) Using genetically-defined rodent strains for the identification of hippocampal traits relevant for two-way avoidance behavior: a non-invasive approach. *Experientia* 45:845-59
- Lipp HP, Schwegler H, Heimrich B y Driscoll P (1988) Infrapyramidal mossy fibers and two-way avoidance learning: developmental modification of hippocampal circuitry and adult behavior of rats and mice. *J Neurosci* 8:1905-21
- Lippiello PM, Bencherif M, Gray JA, Peters S, Grigoryan G, Hodges H y Collins AC (1996) RJR-2403: a nicotinic agonist with CNS selectivity II In vivo characterization. *J Pharmacol Exp Ther* 279:1422-9
- Lister, RG (1987) The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology* 92:180-5
- Lodge DJ y Lawrence AJ (2003) The neurochemical effects of anxiolytic drugs are dependent on rearing conditions in fawn-hooded rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27:451-8
- Logue SF, Paylor R y Wehner JM (1997) Hippocampal lesions cause learning deficits in inbred mice in the Morris water maze and conditioned-fear task. *Behav Neurosci* 111:104-13
- Lopez V y García JC (2004) Tabaco y enfermedad cardiovascular. En: Jimenez CA y Fagerström KO. *Tratado De Tabaquismo*. Aula Médica. Madrid
- López-Mendoza D, Aguilar-Bravo H y Swanson H (1998). Combined effects of gepirone and (+) WAY 100135 on territorial aggression in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 61:1-8
- Lorza, JJ (2004) Diagnóstico de la dependencia a la nicotina. En: Jimenez CA y Fagerström KO. *Tratado De Tabaquismo*. Aula Médica. Madrid

- Lu Y, Grady S, Marks MJ, Picciotto M, Changeux JP y Collins AC (1998) Pharmacological characterization of nicotinic receptor-stimulated GABA release from mouse brain synaptosomes. *J Pharmacol Exp Ther* 287:648-57
- Lukas RJ y Bencherif M (1992) Heterogeneity and regulation of nicotinic acetylcholine receptors. *Int Rev Neurobiol* 34:25-31
- Lukonayov NV, Lukyanova EA, Andrade JP y Paula-Barbosa MM (2005) Impaired water maze navigation of Wistar rats with retrosplenial cortex lesions: effect of non spatial pretraining. *Behav Br Res* 158:175-82
- Lumley LA, Charles RF, Charles RC, Hebert MA, Morton DM y Meyerhoff JL (2000) Effects of social defeat and of diazepam on behavior in a resident-intruder test in male DBA/2 mice. *Pharmacol Biochem Behav* 67:433-47
- Maestriperi D, Badiani A y Puglisi-Allegra S (1991) Prepartal chronic stress increases anxiety and decreases aggression in lactating female mice. *Behav Neurosci* 105:663-8
- Magariños AM, García Verdugo JM y McEwen BS (1997) Chronic stress alters synaptic terminal structure in hippocampus. *Proc Natl Acad Sci* 94: 14002-8
- Maggio R, Riva M, Vaglini F, Fornai F, Molteni R, Armogida M, Racagni G y Corsini GU (1998) Nicotine prevents experimental parkinsonism in rodents and induces striatal increase of neurotrophic factors. *J Neurochem* 716:2439-46
- Maggio R, Riva M, Vaglini F, Fornai F, Racagni G y Corsini GU (1997) Striatal increase of neurotrophic factors as a mechanism of nicotine protection in experimental parkinsonism. *J Neural Transm* 104: 1113-23
- Maisonnette S, Morato S y Brandao ML (1993) Role of resocialization and of 5-HT_{1A} receptor activation on the anxiogenic effects induced by isolation in the elevated plus-maze test. *Physiol Behav* 54:753-8
- Majercsik E, Haller J, Leveleki C, Baranyi J, Halász J y Rodgers RJ (2003) The effect of social factors on the anxiolytic efficacy of buspirone in male rats, male mice and men. *Progress Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiat* 27:1187-99
- Mancuso G, Warburton DM, Melén M, Sherwood N y Tirelli E (1999) Selective effects of nicotine on attentional processes. *Psychopharmacology* 146:199-204
- Mangan GL y Golding JF (1984) *The Psychopharmacology of Smoking*. Cambridge University Press. Cambridge
- Mansvelder HD y McGehee DS (2000) Long-term potentiation of excitatory inputs to brain reward areas by nicotine. *Neuron* 27:349-57
- Mansvelder HD y McGehee DS (2002) Cellular and synaptic mechanisms of nicotine addiction. *J Neurobiol* 53:606-17
- Manzanaque JM, Brain PF y Navarro JF (2002) Effect of low doses of clozapine on behaviour of isolated and group-housed male mice in the elevated plus-maze test. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 26:349-55
- Maren S (2003) What the amygdala does and doesn't do in aversive learning. *Learn Mem* 10:306-8
- Maren S y Quirk GJ (2004) Neuronal signalling of fear memory. *Nat Rev Neurosci* 5: 844-52
- Markou A, Kosten TR y Koob GF (1998) Neurobiological similarities in depression and drug dependence: a self-medication hypothesis. *Neuropsychopharmacology* 18:135-74

- Marks MJ, Miner L, Burch JB, Fulker DW y Collins AC (1984) A diallel analysis of nicotine-induced hypothermia. *Pharmacol Biochem Behav* 21:953-9
- Marks MJ, Stitzel JA y Collins AC (1989) Genetic influences on nicotine responses. *Pharmacol Biochem Behav* 33:667-78
- Márquez FLM y Garrido JJ (2004) El consumo de tabaco como un proceso. En: Jiménez CA y Fagërstrom KO Tratado de tabaquismo. Aula Médica. Madrid
- Martin-Ruiz CM, Haroutunian VH, Long P, Young AH, Davis KL, Perry EK y Court JA (2003) Dementia rating and nicotinic receptor expression in the prefrontal cortex in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 54:1222-33
- Martin-Ruiz CM, Lee M, Perry RH, Baumann M, Court JA y Perry EK (2004) Molecular analysis of nicotinic receptor expression in autism. *Brain Res Mol Brain Res* 123:81-90
- Massanés-Rotger E, Aldavert-Vera L, Segura-Torres P, Marti-Nicolovius M y Morgado-Bernal I (1998) Involvement of the parafascicular nucleus in the facilitative effect of intracranial self-stimulation on active avoidance in rats. *Brain Res* 808:220-31
- Mathieu-Kia AM, Kellogg SH, Butelman ER y Kreek MJ (2002) Nicotine addiction: insights from recent animal studies. *Psychopharmacology* 162:102-18
- Matsuda T, Sakaue M, Ago Y, Sakamoto Y, Koyama Y y Baba A (2001) Functional alteration of brain dopaminergic system in isolated aggressive mice. *Jpn J Neuropsychopharmacol* 21:71-6
- McAllister, W.R., McAllister, D.E., Dieter S.E. y James, H.J. (1979). Pre-exposure to situational cues produces a direct relationship between two-way avoidance learning and shock intensity. *Animal Learning and Behavior* 7, 165-173
- McEwen BS (2000) Effects of adverse experiences for brain structure and function. *Biol Psychiatry* 48:721-31
- McGaugh JL (2002) Memory consolidation and the amygdala: a systems perspective. *Trends Neurosci* 25:456
- McGaugh JL (2004) The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. *Ann Rev Neurosci* 27:1-28
- McGehee DS y Role LW (1995) Physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors expressed by vertebrate neurons. *Ann Rev Physiol* 57:521-46
- McNamara RK y Skelton RW (1993) The neuropharmacological and neurochemical basis of place learning in the Morris water maze. *Brain Res Rev* 18:33-49
- McNaughton N y Morris RG (1992) Buspirone produces a dose-related impairments in spatial navigation. *Pharmacol Biochem Behav* 43:167-71
- Micheau J y Van Marrewijk B (1999) Stimulation of 5HT1A receptors by systemic or medial septum injection induces anxiogenic like effects and facilitates acquisition of a spatial discrimination task in mice. *Progr Neuropsychopharmacol Biol Psychia* 23:1113-33
- Miczek KA, Maxson SC, Fish EW y Faccidomo S (2001) Aggressive behavioral phenotypes in mice. *Behav Brain Res* 125:167-81
- Mihailescu S y Drucker-Colin R (2000) Nicotine and brain disorders. *Acta Pharmacol Sin* 21:97-104
- Misane I, Ögren SO y Med S (2000) Multiple 5-HT Receptors in Passive Avoidance: Comparative Studies of p-Chloroamphetamine and 8-OH-DPAT. *Neuropsychopharmacol* 22:168-90

- Mogensen J, Moustgaard A, Khan U, Wortwein G y Nielsen KS (2005) Egocentric spatial orientation in a water maze by rats subjected to transection of the fimbria-fornix and/or ablation of the prefrontal cortex. *Brain Res Bull* 65:41-58
- Molina-Hernández M, Téllez Alcántara P y Pérez-García J (2001) Isolation rearing induced fear-like behavior without affecting learning abilities of Wistar rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiat* 25:1111-23
- Moncek F, Duncko R, Johansson BB y Jezova D (2004) Effects of environmental enrichment on stress related systems in rats. *J Neuroendocrinol* 16:423-31
- Montero-Pastor A, Vale-Martínez A, Guillazo-Blanch G y Martí-Nicolovius M (2004) Effects of electrical stimulation of the nucleus basalis on two-way active avoidance acquisition, retention and retrieval. *Behav Br Res* 154 :41-54
- Moragrega I, Carrasco MC, Vicens P y Redolat R (2002) Motor activity in group-housed and isolated mice with short and long attack latencies: effects of scopolamine. *Aggress Behav* 8:328-36
- Morgado I (2002) Memoria y aprendizaje en las ratas. *Mente y Cerebro*, nº1 Monografías de Investigación y Ciencia:32-38
- Morgado I (2005) Psicobiología del aprendizaje y la memoria: fundamentos y avances recientes. *Rev Neurol* 40:289-97
- Morgan MA y Pfaff DW (2002) Estrogen's effects on activity, anxiety and fear in two mouse strains. *Behav Brain Res* 132:85-93
- Morinan A. y Parker V (1985) Are socially-isolated rats anxious? *Br J Pharmacol* 86:460
- Morris RGM (1984) Development of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 11: 47-60
- Morris RGM, Anderson E, Lynch JS y Baudry M (1986) Selective impairment of learning in rats and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist AP5. *Nature* 319:774-6
- Moser EI, Krobot KA, Moser MB y Morris RGM (1998). Impaired spatial learning after saturation of long-term potentiation. *Science* 281:2038-42
- Motta V, Maissonette S, Morato S, Castrechini P y Brandao ML (1992) Effects of blockade of 5-HT₂ receptors and activation of 5-HT_{1A} receptors on the exploratory activity of rats in the elevated plus-maze. *Psychopharmacology* 107:135-9
- Muchimapura S, Mason R y Marsden CA (2003) Effects of isolation rearing on pre- and post-synaptic serotonergic function in rat dorsal hippocampus. *Synapse* 47:209-17
- Mumby DG, Cameli L y Glenn MJ (1999) Impaired allocentric spatial working memory and intact retrograde memory after thalamic damage caused by thiamine deficiency in rats. *Behav Neurosci* 113:42-50
- Mumenthaler MS, Yesavage JA, Taylor JL, O'Hara R, Friedman L, Lee H y Kraemer HC (2003) Psychoactive drugs and pilot performance: a comparison of nicotine, donazepil and alcohol effects. *Neuropsychopharmacology* 28:1366-73
- Myhrer T (2003) Neurotransmitter systems involved in learning and memory in the rat: a meta-analysis based on studies of four behavioural tasks. *Br Res Rev* 41: 268-87
- Nakamura S y Ishihara T (1990) Task dependent memory loss and recovery following unilateral nucleus basalis lesion: Behavioral and neurochemical correlation. *Behav Br Res* 39 :113-22

- Nanri M, Yamamoto J, Miyake H y Watanabe H (1998) Protective effect of GTS-21, a novel nicotinic receptor agonist, on delayed neuronal death induced by ischemia in gerbils. *Jpn J Pharmacol* 76:23-9
- Newhouse PA, Potter A y Singh A (2004) Effects of nicotinic stimulation on cognitive performance. *Curr Opin Pharmacol* 4:36-46
- Nieto-Escámez FA, Sánchez-Santed F y de Bruin JPC (2002) Cholinergic receptor blockade in prefrontal cortex and lesions of the nucleus basalis: implications for allocentric and egocentric spatial memory in rats. *Behav Brain Res* 134:93-112
- Nieto-Escámez FA, Sánchez-Santed F y de Bruin JPC (2004) Pretraining or previous non-spatial experience improves spatial learning in the Morris water maze of nucleus basalis lesioned rats. *Behav Brain Res* 148:55-71
- Nilson OG, Shapiro ML, Gage FH, Olton DS y Björklund A (1989) Spatial learning and memory following fimbria-fornix transection and grafting of fetal septal neurons to the hippocampus. *Exp Brain Res* 67:195-215
- Nisell M, Nomikos GG, Hertel P, Panagis G y Svensson TH (1996) Condition-independent sensitization of locomotor stimulation and mesocortical dopamine release following chronic nicotine treatment in the rat. *Synapse*, 22: 369-81
- Nyberg J, Sandnabba K, Schalwyck L y Sluyter F (2004) Genetic and environmental (inter)actions in male mouse lines selected for aggressive and nonaggressive behaviour. *Genes Brain Behav* 3:101-9
- O'Keefe J y Dostrovsky J (1971) The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely moving rat. *Br Res*, 34:171-5
- O'Keefe J y Nadel L (1978) *The hippocampus as a cognitive map*. Oxford: Clarendon
- Ogren SO (1982) Forebrain serotonin and avoidance learning: behavioural and biochemical studies on the acute effect of p-chloroamphetamine on one-way active avoidance learning in the male rat. *Pharmacol Biochem Behav.* 16:881-95
- Ogren SO y Archer T (1994) Effects of typical and atypical antipsychotic drugs on two-way active avoidance. Relationship to DA receptor blocking profile. *Psychopharmacology* 114:383-91
- Ogren SO, Kehr J y Schott PA (1996) Effects of ventral hippocampal galanin on spatial learning and on in vivo acetylcholine release in the rat. *Neuroscience* 75:1127-40
- Orsingher OA y Fulginiti S (1973) Effects of alpha-methyl tyrosine and adrenergic blocking agents on the facilitating action of amphetamine and nicotine on learning in rats. *Psychopharmacology* 19: 231-40
- Ouagazzal AM, Kenny PJ y File SE (1999) Modulation of behavior on trials 1 and 2 in the elevated plus-maze test of anxiety after systemic and hippocampal administration of nicotine. *Psychopharmacology* 144:54-60
- Overmier JB (1979) *Avoidance learning*. Animal Learning. Survey and analysis Bitterman ME, LoLordo VM, Overmier JB y Rashotte ME Eds. Plenum Press. New York
- Overstreet DH, Rezvani AH y Janowsky DS (1992) Maudsley reactive and nonreactive rats differ only in some tasks reflecting emotionality. *Physiol Behav* 52:149-52
- Packard MG y Knowlton BJ (2002) Learning and memory functions of the basal ganglia. *Annu Rev Neurosci* 25:563-93

- Packard MG, Cahill L y McGaugh JL (1994) Amygdala modulation of hippocampal-dependent and caudate nucleus-dependent memory processes. *Proc Natl Acad Sci* 91:8477-81
- Palanza P (2001) Animal models of anxiety and depression: how are females different? *Neurosci Biobehav Rev* 25:219-33
- Parker V y Morinan A (1986) The socially isolated rat as a model for anxiety. *Neuropharmacol* 25:663-4
- Parrott AC (1999) Does cigarette smoking cause stress? *American Psychologist* 54:817-20
- Pascual R (2001) Deterioro cerebeloso inducido por aislamiento social temprano: estudio morfológico e inmunocitoquímico. *Rev Chil Neuro-Psiquiat* 39:56-67
- Pascual R (2002) La interrupción temprana del vínculo social altera la organización citoarquitectónica y expresión de neuropéptidos en la corteza prefrontal. *Rev Chil Neuro-Psiquiat* 40:9-20
- Pascual R, Catalán M y Fuentealba M (2003) Rasgos de ansiedad y alteraciones neuronales en la corteza prefrontal media, ocasionadas por experiencias adversas tempranas. *Rev Chil Neuro-Psiquiat* 41:201-11
- Paterson D y Nordberg A (2000) Neuronal nicotinic receptors in the human brain. *Prog Neurobiol* 61:75-111
- Paul ES, Haring EJ y Mendl M (2005) Measuring emotional processes in animals: the utility of a cognitive approach. *Neurosci Biobehav Rev* 29:469-91
- Paulus MP, Varty Gb y Geyer MA (2000) The genetic liability to stress and postweaning isolation have a competitive influence on behavioral organization in rats. *Physiol Behav* 68:389-94
- Pavone F, Capone F, Battaglia M y Sansone M (1998) Shuttle-box avoidance learning in mice: Improvement by combined glucose and tacrine. *Neurobiol Learn Mem* 69:204-10
- Pawlak CR, Ho I, Schwarting RKW y Bauhofer A (2003) Relationship between striatal levels of interleukin-2 mRNA and plus-maze behaviour in the rat. *Neurosci Lett* 341:205-8
- Pelletier JG, Likhtik E, Filali M y Pare D (2005) Lasting increases in basolateral amygdala activity after emotional arousal: Implications for facilitated consolidation of emotional memories. *Learn Mem* 12:96-102
- Pellow S, Chopin P, File SE y Briley M (1985) Validation of open:closed arms entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety. *J Neurosci Methods* 14:149-67
- Pepeu G y Giovanelli L (1994). The central cholinergic system during aging. En: Bloom F (Eds.) *Progress in Brain Research* 100:67-71
- Pereira ME, Rosat R, Huang CH, Godoy MG e Izquierdo I (1989) Inhibition by diazepam of the effect of additional training and of extinction of the retention of a shuttle avoidance behavior in rats. *Behav Neurosci* 103:202-5
- Peres RC y Leite JR (2002) The influence of competitive status (winner/loser) on the behavior of male rats in three models of anxiety. *Aggr Behav* 28:164-71
- Perkins KA, Gerlach D, Broge M, Grobe JE, Sanders M, Fonte C, Vender J, Cherry C y Wilson A (2001) Dissociation of nicotine tolerance from tobacco dependence in humans. *J Pharmacol Exp Ther* 296:849-56
- Perrot-Sinal TS, Kostenuik MA, Ossenkopp KP y Kavaliers M (1996) Sex differences in performance in the Morris water maze and the effects of initial nonstationary hidden platform training. *Behav Neurosci* 110:1309-20

- Perry EK, Martin-Ruiz CM y Court JA (2001) Nicotinic receptor subtypes in human brain related to aging and dementia. *Alcohol* 24:63-8
- Perry EK, Perry RH, Smith CJ, Purohit D, Bonham J, Dick DJ, Candy JM, Edwardson JA y Fairbairn A (1986) Cholinergic receptors in cognitive disorders. *Can J Neurol Sci* 13:521-7
- Phillips GD, Harmer CJ y Hitchcott PK (2002) Isolation rearing-induced facilitation of Pavlovian learning: abolition by postsession intra-amygdala nafadotride. *Physiol Behav* 76:677-84
- Phillips GD, Howes SR, Whitelaw RB, Robbins TW y Everitt BJ (1994b) Isolation rearing impairs the reinforcing efficacy of intravenous cocaine or intra-accumbens d-amphetamine: impaired response to intra-accumbens D1 and D2/D3 dopamine receptor antagonists. *Psychopharmacology* 115:419-29
- Phillips GD, Howes SR, Whitelaw RB, Wilkinson LS, Robbins TW y Everitt BJ (1994a) Isolation rearing enhances the locomotor response to cocaine and a novel environment, but impairs the intravenous self-administration of cocaine. *Psychopharmacology* 115:407-18
- Phillips HA, Scheffer IE, Berkovic SF, Hollway GE, Sutherland GR y Mulley JC (1995) Localization of a gene for autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy to chromosome 20q 13.2. *Nat Genet* 10:117-8
- Picciotto MR (2003) Nicotine as a modulator of behavior: beyond the inverted U. *Trends Pharmacol Sci* 24:493-9.
- Pidoplichko VI, Noguchi J, Areola OO, Liang Y, Peterson J, Zhang T y Dani JA (2004) Nicotinic cholinergic synaptic mechanisms in the ventral tegmental area contribute to nicotine addiction. *Learn Mem* 11:60-9
- Pineda J (1999) Bases biológicas de la adicción y abstinencia de nicotina. En: Meana JJ, Markez L, Pantonja L *Nicotina y Tabaquismo Nuevas Perspectivas*. Instituto Deusto de Drogodependencias. Universidad de Deusto. Bilbao cap 2:51-9
- Pogun (2001) Sex differences in brain and behavior: emphasis on nicotine, nitric oxide and place learning. *Int J Psychophysiol* 42:195-208
- Poirier MF, Canceil O, Bayle F, Millet B, Bourdel MC, Moatti C, Olie JP y Attar-Levy D (2002) Prevalence of smoking in psychiatric patients. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 26:529-37
- Pomerleau OF (1998) Endogenous opioids and smoking: a review of progress and problems. *Psychoneuroendocrinology* 23:115-30
- Potter A, Corwin J, Lang J, Piasecki M, Lenox R y Newhouse PA (1999) Acute effects of the selective cholinergic channel activator (nicotinic agonist) ABT-418 in Alzheimer's disease. *Psychopharmacology* 142:334-42
- Poucet B, Lenck-santini PP, Paz-Villagran V y Save E (2003) Place cells, enocortex and spatial navigation: a short review. *J Physiol Paris* 97:537-46
- Pouzet B, Veenman CL, Yee BK, Feldon J y Weiner I (1999) The effects of radiofrequency lesion or transection of the fimbria-fornix on latent inhibition in the rat. *Neuroscience* 91:1355-68
- Powell SB, Geyer MA, Preece MA, Pitcher LK, Reynolds GP y Swerdlow NR (2003) Dopamine depletion of the nucleus accumbens reverses isolation-induced deficits in prepulse inhibition in rats. *Neuroscience* 119:233-40
- Prior H, Schwegler H y Dückler G (1997) Dissociation of spatial reference memory, spatial working memory, and hippocampal mossy fiber distribution in two rat strains differing in emotionality. *Behav Brain Res* 87:183-94

- Prior H, Schwegler H, Marashi V y Saschser N (2004) Exploration, emotionality and hippocampal mossy fibers in nonaggressive AB/Gat and congenic highly aggressive mice. *Hippocampus* 14:135-40
- Radcliffe KA, Fisher JL, Gray R y Dani JA (1999) Nicotinic modulation of glutamate and GABA synaptic transmission of hippocampal neurons. *Ann New York Acad Sci* 868:591-610
- Ramírez-Amaya V, Escobar ML, Chao V y Bermúdez-Rattoni F (1999) Synaptogenesis of mossy fibers induced by spatial water maze overtraining. *Hippocampus* 9:631-6
- Ramos A y Mormede (1998) Stress and emotionality: a multidimensional and genetic approach. *Neurosci Biobehav Rev* 22:33-57
- Rebouças RC y Schmidek WR (1997) Handling and isolation in three strains of rats affect open field, exploration, hoarding and predation. *Physiol Behav* 62:1159-64
- Redolar-Ripoll D, Aldavert-Vera L, Soriano-Mas C, Segura-Torres P y Morgado-Bernal I (2002) Intracranial self-stimulation facilitates memory consolidation, but not retrieval: its effects are more effective than increased training. *Behav Br Res* 129:65-75
- Redolar-Ripoll D, Soriano-Mas C, Guillazo-Blanch G, Aldavert-Vera L, Segura-Torres P y Morgado-Bernal I (2003) Posttraining intracranial self-stimulation ameliorates the detrimental effects of parafascicular thalamic lesions on active avoidance in young and aged rats. *Behav Neurosci* 117: 246-56
- Redolat R, Brain PF y Simón VM (1991). Sulpiride has an antiaggressive effect in mice without markedly depressing motor activity. *Neuropharmacology* 30:441-6
- Redolat R, Carrasco MC y Simón Pérez V (1994) Efectos cognitivos de la nicotina y el tabaco en sujetos humanos. *Psicothema* 6:5-20
- Redolat R, Carrasco MC y Simón Pérez V (1998) Efectos de la administración aguda de MK-801, antagonista no competitivo de los receptores NMDA, sobre la evitación activa en ratones. *Psicothema* 10:135-41
- Redolat R, Gomez MC, Vicens P y Carrasco MC (2005) Bupropion effects on aggressiveness and anxiety in OF1 male mice. *Psychopharmacology* 177:418-27
- Redolat R, Oterino MC, Carrasco MC y Brain PF (2002) A specific anti-aggressive effect of repeatedly administered lobeline. *Addict Biol* 7: 301-6
- Redolat R, Oterino MC, Carrasco MC, Berry MS y Brain PF (2000) Effects of acute administration of nicotine and lobeline on agonistic encounters in male mice. *Agr Behav* 26:386-400
- Rex A, Morgenstern E y Fink H (2002) Anxiolytic-like effects of kava-kava in the elevated plus maze test--a comparison with diazepam. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 26:855-60
- Rezvani AH y Levin ED (2001) Cognitive effects of nicotine. *Biol Psychiatry* 49:258-67
- Ribeiro RL, Andreatini R, Wolfman C, Viola H, Medina JH y Da Cunha C (1999) The "Anxiety State" and its relation with rat models of memory and habituation. *Neurobiol Learn Mem* 72:78-94
- Riekkinen M y Riekkinen P (1997) Nicotine and D-cycloserine enhance acquisition of water maze spatial navigation in aged rats. *Neuroreport* 8:699-703
- Riekkinen M, Aroviita L, Kivipelto M, Taskila K y Riekkinen P (1996a) Depletion of serotonin, dopamine and noradrenaline in aged rats decreases the therapeutic effect of nicotine, but not of tetrahydroaminoacridine. *Eur J Pharmacol* 308:243-50

- Riekkinen M, Kemppainen S y Riekkinen P (1997) Effects of stimulation of α_1 -adrenergic and NMDA/glycine- β receptors on learning defects in aged rats. *Psychopharmacology* 131:49-56
- Riekkinen M, Stefanski R, Kuitunen J y Riekkinen P Jr (1996b). Effects of combined block of α_1 -adrenergic and NMDA receptors on spatial and passive avoidance behavior in rats. *Eur J Pharmacol* 300:9-16
- Riekkinen P Jr, Sirvio J y Riekkinen P (1990) Interaction between raphe dorsalis and nucleus basalis magnocellularis in spatial learning. *Brain Res* 527:342-5
- Riekkinen P, Aaltonen M, Sirvió J y Riekkinen P (1991) Tetrahydroaminoacridine alleviates medial septal lesion-induced and age-related spatial reference but not working memory deficits. *Physiol Behav* 49:1147-52
- Rilke O, Freier D, Jähkel M y Oehler J (1998a) Dynamic alterations of serotonergic metabolism and receptors during social isolation of low- and high-active mice. *Pharmacol Biochem Behav* 59:891-6
- Rilke O, Jähkel M y Oehler J (1998b) Dopaminergic parameters during social isolation in low- and high-active mice. *Pharmacol Biochem Behav* 60:499-505
- Ripoll N, Bronnec M y Bourin M (2004) Nicotinic receptors and schizophrenia. *Curr Med Res Opin* 20:1057-74
- Robbins TW, Jones GH y Wilkinson LS (1996) Behavioural and neurochemical effects of early social deprivation in the rat. *J Psychopharmacol* 10:39-47
- Rodgers RJ y Cole JC (1993) Influence of social isolation, gender, strain and prior novelty in plus-maze behaviour in mice. *Physiol Behav* 54:729-36
- Rolinski A y Herbut M (1981) The significance of central nicotinic receptors in the aggression of isolated mice. *Pol J Pharm Pharmacol* 37:479-86
- Rolls ET (2000) Memory systems in the brain. *Ann Rev Psychol* 51:599-630
- Roman FS, Truchet B, Marchetti E, Chaillan FA y Soumireu-Mourat B (1999) Correlation between electrophysiological observations of synaptic plasticity modifications and behavioral performance in mammals. *Prog Neurobiol* 58:61-87
- Roosendaal B, Koolhaas JM y Bohus B (1993) The central amygdala is involved in conditioning but not in retention of active and passive shock avoidance in male rats. *Behav Neural Biol* 59:143-9
- Ross SA, Wong JY, Clifford JJ, Kinsella A, Massalas JS, Horne MK, Scheffer IE, Kola I, Waddington JL, Berkovic SF y Drago J (2000) Phenotypic characterization of an alpha 4 neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit knock-out mouse. *J Neurosci* 20:6431-41
- Rubio S, Miranda R, Cuesta M, Begega A, Santín LJ y Arias JL (1999) Active avoidance conditioning in rats: absence of sex difference and estrous effect. *Psicothema* 11:655-61
- Sahakian BJ, Jones G, Levy R, Gray J y Warburton DM (1989) The effects of nicotine on attention, information processing, and short-term memory in patients with dementia of the Alzheimer type. *British Journal of Psychiatry* 154:797-800
- Sahakian BJ, Robbins TW e Iversen SD (1977) The effects of isolation rearing on exploration in the rat. *Anim Learn Behav* 5:193-8
- Sakaue M, Ago Y, Sowa C, Sakamoto Y, Nishihara B, Koyama Y, Baba A y Matsuda T (2002) Modulation by 5-HT_{2A} receptors of aggressive behavior in isolated mice. *Jpn J Pharmacol* 89:89-92

- Salas R, Pieri F, Fung B, Dani JA y De Biasi M (2003) Altered anxiety-related responses in mutant mice lacking the beta4 subunit of the nicotinic receptor. *J Neurosci* 23:6255-63
- Sánchez MM, Aguado F, Sanchez-Toscano F y Saphier D (1995) Effects of prolonged social isolation on responses of neurons in the bed nucleus of the stria terminalis, preoptic area, and hypothalamic paraventricular nucleus to stimulation of the medial amygdala. *Psychoneuroendocrinology* 20:525-41
- Sánchez MM, Aguado F, Sánchez-Toscano F y Saphier D (1998) Neuroendocrine and immunocytochemical demonstrations of decreased Hypothalamo-Pituitary-Adrenal axis responsiveness to restraint stress after long-term social isolation. *Endocrinology* 139:579-87
- Sandford JJ, Argyropoulos SV y Nutt DJ (2000) The psychobiology of anxiolytic drugs: part 1. Basic neurobiology *Pharmacol Ther* 88:197-212
- Sandi C, Woodson JC, Haynes VF, Park CR, Touyarot K, Lopez-Fernandez MA, Venero C y Diamond DM (2005) Acute stress-induced impairment of spatial memory is associated with decreased expression of neural cell adhesion molecule in the hippocampus and prefrontal cortex. *Biol Psychiatry* 57:856-64
- Sandnabba NK (1995) Predatory aggression in male mice selectively bred for isolation-induced intermale aggression. *Behav Genet* 25:361-6
- Sandnabba NK (1996) Selective breeding for isolation-induced intermale aggression in mice: associated responses and environmental influences. *Behav Genet* 26:477-88
- Sansone M, Battaglia M y Castellano C (1994) Effects of caffeine and nicotine on avoidance learning in mice. *J Pharm Pharmacol* 46:765-7
- Sansone M, Battaglia M y Pavone F (2000) Shuttle-Box avoidance learning in mice: Improvement by glucose combined with stimulant drugs. *Neurobiol Learn Mem* 73:94-100
- Sansone M, Castellano C, Battaglia M y Amassari-Teule M (1991) Effects of oxiracetam-nicotine combinations on active and passive avoidance learning in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 39:197-200
- Sansone M, Castellano C, Palazzesi S, Battaglia M y Ammassari-Teule M (1993) Effects of oxiracetam, physostigmine, and their combination on active and passive avoidance learning in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 44:451-5
- Santín LJ, Rubio S, Begega A, Miranda R y Arias JL (2000) Aprendizaje especial e hipocampo. *Rev Neurol* 31:455-62
- Sasaki H, Yanai M, Meguro K, Sekizawa K, Ikarashi Y, Maruyama Y, Yamamoto M, Matsuzaki Y y Takishima T (1991) Nicotine improves cognitive disturbance in rodents fed with a choline-deficient diet. *Pharmacol Biochem Behav* 38:921-5
- Satorra-Marín N, Coll-Andreu M, Portell-Cortés I, Aldavert-Vera L y Morgado-Bernal I (2001) Impairment of two-way active avoidance after pedunculo-pontine tegmental nucleus lesions: effects of conditioned stimulus duration. *Behav Br Res* 118:1-9
- Savage LM, Sweet AJ, Castillo R y Langlais PJ (1997) The effects of lesions to thalamic lateral internal medullary lamina and posterior nuclei on learning, memory and habituation in the rat. *Behav Brain Res* 82:133-47
- Save E, Poucet B, Foreman N y Thinus-Blanc C (1998) The contribution of the associative parietal cortex and hippocampus to spatial processing in rodents. *Psychobiology* 26:153-61

- Savic MM, Obradovic DI, Ugresic ND, Cook JM, Sarma PV y Bokonjic DR (in press) Bidirectional effects of benzodiazepine binding site ligands on active avoidance acquisition and retention: differential antagonism by flumazenil and beta-CCT. *Psychopharmacology*
- Savonenko A, Werka T, Nikolaev E, Zielinski K y Kaczmarek L (2003) Complex effects of NMDA receptor antagonist APV in the basolateral amygdala on acquisition on two-way avoidance reaction and long-term fear memory. *Learn Mem* 10:293-303
- Scheufele PM, Faraday MM y Grunberg NE (2000) Nicotine administration interacts with housing conditions to alter social and non-social behaviors in male and female Long-Evans rats. *Nicotine Tob Res* 2:169-78
- Schiller L, Jähkel M, Kretzschmar M, Brust P y Oehler J (2003) Autoradiographic analyses of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors after social isolation in mice. *Br Res* 980:168-78
- Schrijver NC y Würbel H (2001) Early social deprivation disrupts attentional, but not affective, shifts in rats. *Behav Neurosci* 115:437-42
- Schrijver NCA, Bahr NI, Weiss IC y Würbel H (2002) Dissociable effects of isolation rearing and environmental enrichment on exploration, spatial learning and HPA activity in adult rats. *Pharmacol Biochem Behav* 73:209-224
- Schrijver NCA, Pallier PN, Brown VJ y Würbel H (2004) Double dissociation of social and environmental stimulation on spatial learning and reversal learning in rats. *Behav Brain Res* 152:307-14
- Schuller I y Renne N (1988) Relationship of social rank in mice to growth, endurance and fertility. *Aggr Behav* 14:205-11
- Schutz MT, da Silva VA y Masur J (1978) Genetically selected winner and loser rats: what was selected? *Act Nerv Super* 20:178-85
- Schutz RA e Izquierdo I (1979) Effect of brain lesions on rat shuttle behavior in four different tests. *Physiol Behav* 23:97-105
- Schwartz RK, Thiel CM, Muller CP y Huston JP (1998) Relationship between anxiety and serotonin in the ventral striatum. *Neuroreport* 9:1025-9
- Scott JP (1966) Agonistic behavior of mice and rats: a review. *American Zoologist* 6:683-701
- Segura-Torres P, Capdevila-Ortiz L, Marti-Nicolovius M y Morgado-Bernal I (1988) Improvement of shuttle-box learning with pre- and post-trial intracranial self-stimulation in rats. *Behav Brain Res* 29:111-7
- Segura-Torres P, Portell-Cortes I y Morgado-Bernal I (1991) Improvement of shuttle-box avoidance with post-training intracranial self-stimulation, in rats: a parametric study. *Behav Brain Res* 42:161-7
- Seidenbecher T, Laxmi TR, Stork O y Pape HC (2003) Synchronization of amygdalar an hippocampal theta oscillations during retrieval of Pavlovian fear memory. *Science* 301:846:50
- Serra M, Pisu MG, Littera M, Papi G, Sanna E, Tuveri F, Usala L, Purdy RH y Biggio G. (2000) Social isolation-induced decreases in both the abundance of neuroactive steroids and GABA(A) receptor function in rat brain. *J Neurochem* 75:732-40
- Serra M, Pisu MG, Floris I, Floris S, Cannas R, Mossa A, Trapani G, Latrofa A, Purdy RH y Biggio G (2004) Social isolation increases the response of peripheral benzodiazepine receptors in the rat. *Neurochem Int* 45:141-8

- Sershen H, Balla A, Lajtha A y Vizi ES (1997) Characterization of nicotinic receptors involved in the release of noradrenaline from the hippocampus. *Neuroscience* 77:121-30
- Sgoifo A, Coe C, Parmigiani S y Koolhaas J (2005) Individual differences in behavior and physiology: causes and consequences. *Neurosci Biobehav Rev* 29: 1-2
- Sgoifo A, deBoer SF, Haller J y Koolhaas J (1996) Individual differences in plasma catecholamine and corticosterone-stress responses in wild-type rats: relationship with aggression. *Physiol Behav* 60: 1403-7
- Shacka JJ y Robinson SE (1996) Central and peripheral anatomy of nicotinic sites. *Med Chem Res* 6:444-64
- Sharp BM y Matta SG (1993) Detection by in vivo microdialysis of nicotine-induced norepinephrine secretion from the hypothalamic paraventricular nucleus of freely moving rats: dose-dependency and desensitization. *Endocrinology* 133:11-9
- Sharp JL, Zammit TG, Azar TA y Lawson DM (2002) Stress-like responses to common procedures in male rats housed alone or with other rats. *Contemp Top Lab Anim Sci* 41:8-14
- Sherif F y Oreland L (1995) Effect of the GABA-transaminase inhibitor vigabatrin on exploratory behaviour in socially isolated rats. *Behav Brain Res* 72:135-40
- Shytle RD, Silver AA, Lukas RJ, Newman MB, Sheehan DV y Sanberg PR (2002) Nicotinic acetylcholine receptors as targets for antidepressants. *Mol Psychiatry* 7:525-35
- Silva AJ, Giese KP, Fedorov NB, Frankland PW y Kogan JH (1998) Molecular, cellular, and neuroanatomical substrates of place learning. *Neurobiol Learn Mem* 70:44-61
- Slotkin TA (2002) Nicotine and the adolescent brain: insights from an animal model. *Neurotoxicol Teratol* 24:369-84
- Sluyter F, Jamot L, van Oortmerssen GA y Crusio WE (1994) Hippocampal mossy fiber distributions in mice selected for aggression. *Brain Res* 646:145-8
- Smith C y Rose GM (1996) Evidence for a paradoxical sleep window for place learning in the Morris water maze. *Physiol Behav* 59:93-7
- Smith MA (1996) Hippocampal vulnerability to stress and aging: possible role of neurotrophic factors. *Behav Brain Res* 78:25-36
- Smith MA, Bryant PA y McClean JM (2003) Social and environmental enrichment enhances sensitivity to the effects of kappa opioids: studies on antinociception, diuresis and conditioned place preference. *Pharmacol Biochem Behav* 76:93-101
- Smith MA, Chisholm KA, Bryant PA, McClean JM, Stoops WW y Yancey DL (in press) Social and environmental influences on opioid sensitivity in rats: importance of an opioid's relative efficacy at the mu-receptor. *Psychopharmacology*
- Socci DJ, Sanberg PR y Arendash GW (1995) Nicotine enhances morris water maze performance of young and aged rats. *Neurobiol Aging* 16:857-60
- Sos-Hinojosa H, Guillazo-Blanch G, Vale-Martinez A, Nadal R, Morgado-Bernal I y Marti-Nicolovius M (2003) Parafascicular electrical stimulation attenuates nucleus basalis magnocellularis lesion-induced active avoidance retention deficit. *Behav Brain Res* 144:37-48
- Spanis CW, Bianchin MM, Izquierdo I y McGaugh JL (1999) Excitotoxic basolateral amygdala lesions potentiate the memory impairment effect of muscimol injected into the medial septal area. *Brain Res* 816: 329-36

- Squire LR (1992) Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys and humans. *Psychol Rev* 99:195-231
- Stancampiano R, Cocco S, Cugusi C, Sarais L y Fadda F (1999) Serotonin and acetylcholine release response in the rat hippocampus during a spatial memory task. *Neuroscience* 89:1135-43
- Steckler T y Holsboer F (1999) Enhanced conditioned approach responses in transgenic mice with impaired glucocorticoid receptor function. *Behav Brain Res* 102:151-63
- Stefanski V, Knopf G y Schulz S (2001) Long-term colony housing in Long Evans rats: immunological, hormonal, and behavioral consequences. *J Neuroimmunol* 114:122-30
- Steimer T, Driscoll P y Schulz PE (1997) Brain metabolism of progesterone, coping behaviour and emotional reactivity in male rats from two psychogenetically selected lines. *J Neuroendocrinol* 9:169-75
- Steinmetz M (1998) Contributions of posterior parietal cortex to cognitive functions in primates. *Psychobiology* 26:9-18
- Sthal SM (2002). *Psicofarmacología esencial. Bases neurocientíficas y aplicaciones clínicas*. Ariel Neurociencia. Barcelona.
- Stiedl O, Radulovic J, Lohmann R, Birkenfeld K, Palve, Kammermeier J, Sananbenesi F y Spiess J (1999) Strain and substrain differences in context- and tone-dependent fear conditioning of inbred mice. *Behav Brain Res* 104:1-12
- Stolerman IP (1991) Behavioural pharmacology of nicotine: multiple mechanisms. *Br J Addict* 86:533-6
- Stolerman IP, Garcha HS, y Mirza NR (1995b) Dissociations between the locomotor stimulant and depressant effects of nicotine agonists in rats. *Psychopharmacology* 117:430-7
- Stolerman IP, Mirza NR y Shoaib M (1995a) Nicotine psychopharmacology: addiction, cognition and neuroadaptation. *Med Res Rev* 15:47-72
- Sullivan MA y Covey LS (2002) Nicotine dependence: the role for antidepressants and anxiolytics. *Curr Opin Investig Drugs* 3:262-71
- Sutherland G, Stapleton JA, Russell MAH, y Feyerabend C (1995) Naltrexone, smoking behaviour and cigarette withdrawal. *Psychopharmacology* 120:418-25
- Sutherland RJ y Hamilton DA (2004) Rodent spatial navigation: at the crossroads of cognition and movement. *Neurosci Biobehav Rev* 28:687-97
- Swan GE, Habina K, Means B, Jobe JB y Esposito JL (1993) Saliva cotinine and recent smoking--evidence for a nonlinear relationship. *Public Health Rep* 108:779-83
- Tang YP, Shimizu E, Dube GR, Rampon C, Kerchner GA y Zhuo M (1999) Genetic enhancement at learning and memory in mice. *Nature* 401:63-9
- Tarpy RM (1987) *Principios básicos del aprendizaje*. Debate, Madrid
- Tenas-Huerga N, Coll-Andreu M, Guillazo-Blanch G, Marti-Nicolovius M y Morgado-Bernal I (1998) Facilitatory effects of thalamic reticular nucleus lesions on two-way active avoidance in rats. *Exp Brain Res* 118:511-6
- Thiel CM, Muller CP, Huston JP y Schwarting RK (1999) High versus low reactivity to a novel environment: behavioural, pharmacological and neurochemical assessments. *Neuroscience* 93:243-51

- Topic B, Dere E, Schulz D, de Souza Silva MA, Jocham G, Kart E y Huston JP (2005) Aged and adult rats compared in acquisition and extinction of escape from the water maze: focus on individual differences. *Behav Neurosci* 119:127-44
- Torras-García M, Costa-Miserachs D, Morgado-Bernal I y Portell-Cortes I (2003) Improvement of shuttle-box performance by anterodorsal medial septal lesions in rats. *Behav Brain Res* 141:147-58
- Touyarot K, Venero C y Sandi C (2004) Spatial learning impairment induced by chronic stress is related to individual differences in novelty reactivity: search for neurobiological correlates. *Psychoneuroendocrinology* 29:290-305
- Trauth JA, Seidler FJ y Slotkin TA (2000) Persistent and delayed behavioral changes after nicotine treatment in adolescent rats. *Brain Res* 880:167-72
- Trauth JA, Seidler FJ, Ali SF y Slotkin TA (2001) Adolescent nicotine exposure produces immediate and long-term changes in CNS noradrenergic and dopaminergic function. *Brain Res* 892:269-80
- Troncoso AC, Osaki MY, Mason s, Borelli KG y Brandão ML (2003) Apomorphine Enhances Conditioned Responses Induced by Aversive Stimulation of the Inferior Colliculus. *Neuropsychopharmacol* 28:284-91
- Trullas R y Skolnick P (1993) Differences in fear motivated behaviors among inbred mouse strains. *Psychopharmacology* 111:323-31
- Turchi J, Holley LA y Sarter M (1995) Effects of nicotinic acetylcholine receptor ligands on behavioral vigilance in rats. *Psychopharmacology* 118:195-205
- Unwin N (1996) Projection structure of the nicotinic acetylcholine receptor: distinct conformations of the alpha subunits. *J Mol Biol* 257:586-96
- Uzum G, Diler AS Bahcekapili N, Tasyurekli M y Ziyilan YZ (2004) Nicotine improves learning and memory in rats: morphological evidence for acetylcholine involvement. *Int J Neurosci* 114: 1163-79
- Vaglenova J, Birru S, Pandiella NM y Breese CR (2004) An assessment of the long-term developmental and behavioral teratogenicity of prenatal nicotine exposure. *Behav Brain Res* 150:159-70
- Vailati S, Hanke W, Bejan A, Barabino B, Longhi R, Balestra B, Moretti M, Clementi F y Gotti C (1999) Functional alpha6-containing nicotinic receptors are present in chick retina. *Mol Pharmacol* 56:11-9
- Vainio PJ y Tuominen RK (2001) Cotinine binding to nicotinic acetylcholine receptors in bovine chromaffin cell and rat brain membranes. *Nicotine Tob Res* 3:177-82
- Vale-Martinez A, Guillazo-Blanch G, Marti-Nicolovius M, Nadal R, Arevalo-Garcia R y Morgado-Bernal I (2002) Electrolytic and ibotenic acid lesions of the nucleus basalis magnocellularis interrupt long-term retention, but not acquisition of two-way active avoidance, in rats. *Exp Brain Res* 142:52-66
- Vale-Martinez A, Marti-Nicolovius M, Guillazo-Blanch G y Morgado-Bernal I (1998) Differential site-specific effects of parafascicular stimulation on active avoidance in rats. *Behav Brain Res* 93:107-18
- Vale AL, Montgomery AM (1997) Social interaction: responses to chlordiazepoxide and the loss of isolation-reared effects with paired-housing. *Psychopharmacology* 133:127-32
- Valencia-Alfonso CE, Feria-Velasco A, Luquín S, Diaz-Burque Y y García-Estrada J (2004) Efectos cerebrales del medio ambiente social. *Rev Neurol* 38:869-78

- Valzelli L (1973) The "isolation syndrome" in mice. *Psychopharmacologia* 31:305-20
- Valzelli L, Bernasconi S y Cusumano G (1977) Prolonged isolation and alcohol effect on avoidance learning in two strains of mice. *Neuropsychobiology* 3:135-43
- Van der Borgh K, Meerlo P, Luiten PGM, Eggen BJL y Van der Zee EA (2005) Effects of active shock avoidance learning on hippocampal neurogenesis and plasma levels of corticosterone. *Behav Brain Res* 157:23-30
- Van der Heyden JA, Molewijk E, Olivier B (1987) Strain differences in response to drugs in the tail suspension test for antidepressant activity. *Psychopharmacology* 92:127-30
- Van der Heyden JA y Bradford LD (1988) A rapidly acquired one-way conditioned avoidance procedure in rats as a primary screening test for antipsychotics: influence of shock intensity on avoidance performance. *Behav Brain Res* 31:61-7
- Van der Heyden JA, Zethof TJ y Olivier B (1997) Stress-induced hyperthermia in singly housed mice. *Physiol Behav* 62:463-70
- Van der Vegt BJ, de Boer SF, Buwalda B, de Ruiter AJH, de Jong JG y Koolhaas JM (2001) Enhanced sensitivity of postsynaptic serotonin-1A receptors in rats and mice with high trait aggression. *Physiol Behav* 74:205-11
- Van der Vegt BJ, Lieuwes N, Van de Wall EHEM, Kato K, Moya-Albiol L, Martínez-Sánchez S, de Boer SF y Koolhaas JM (2003) Activation of serotonergic neurotransmission during the performance of aggressive behaviour in rats. *Behav Neurosci* 117:667-74
- Veenema AH, Koolhaas JM y de Kloet R (2004) Basal and stress-induced differences in HPA axis, 5-HT responsiveness, and hippocampal cell proliferation in two mouse lines. *Ann NY Acad Sci* 1018: 255-65
- Veenema AH, Meijer OC, de Kloet ER, Koolhaas JM y Bohus BG (2003) Differences in basal and stress-induced HPA regulation of wild house mice selected for high and low aggression. *Horm Behav* 43:197-204
- Vicens P, Bernal MC, Carrasco MC y Redolat R (1999) Previous training in the water maze: differential effects in NMRI and C57BL mice. *Physiol Behav* 67:197-203
- Vicens P, Carrasco MC y Redolat R (2003b) Effects of early training and nicotine treatment on the performance of male NMRI mice in the water maze. *Neural Plast* 10:303-17
- Vicens P, Redolat R y Carrasco MC (2002) Effects of early spatial training on water maze performance: a longitudinal study in mice. *Exp Gerontol* 37:575-81
- Vicens P, Redolat R y Carrasco MC (2003a) Aprendizaje espacial y laberinto de agua: metodología y aplicaciones. *Psicothema* 15:539-44
- Vinader-Caerols C, Aguilar MA, Pérez-Iranzo M, Miñarro J, Parra A y Simón VM (1996) Apparent vs. real effects of scopolamine on the learning of an active avoidance task. *Neurobiol Learn Mem* 66: 246-51
- Wada E, Waka K, Boulter J, Deneris E, Heinemann S, Patrik J y Swanson LW (1989) Distribution of alpha 2, alpha 3, alpha 4 and beta 2 neuronal nicotinic receptor subunit mRNAs in the central nervous system: a hybridization histochemical study in the rat. *J Comp Neurol* 284:314-35
- Wade SE y Maier SF (1986) Effects of individual housing and stressor exposure upon the acquisition of watermaze escape. *Learn Motiv* 17:287-310

- Wall PM y Messier C (2001) Methodological and conceptual issues in the use of the elevated plus-maze as a psychological measurement instrument of animal anxiety-like behavior. *Neurosci Biobehav Rev* 25:275-86
- Wallenstein GV, Eichenbaum H y Haselmo ME (1998). The hippocampus as an associator of discontiguous events. *Trends Neurosci* 21:317-23
- Warburton DM (1992) Nicotine as a cognitive enhancer. *Progr Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 16:181-91
- Warburton DM y Rusted JM (1993). Cholinergic control of cognitive resources. *Neuropsychobiology* 28:43-6
- Weiss IC y Feldon J (2001) Environmental animal models for sensorimotor gating deficiencies in schizophrenia: a review. *Psychopharmacology* 156:305-26
- Weiss IC, Domeney AM, Heidbreder CA, Moreau JL y Feldon J (2001) Early social isolation, but not maternal separation, affects behavioral sensitization to amphetamine in male and female adult rats. *Pharmacol Biochem Behav* 70:397-409
- Weiss IC, Feldon J y Domeney AM (2000) Isolation rearing-induced disruption of prepulse inhibition: further evidence for fragility of the response. *Behav Pharmacol* 10:139-49
- Weiss IC, Pryce CR, Jongen-Rêlo AL, Nanz-Bahr NI y Feldon J (2004) Effects of social isolation on stress-related behavioural and neuroendocrine state in the rat. *Behav Brain Res* 152: 279-95
- Wesnes K y Warburton DM (1983) Stress and drugs. En Hockey GRJ (Ed.) *Stress and fatigue in human performance* Wiley 203-43
- Whishaw IQ (1985) Cholinergic receptor blockade in the rat impairs locale but not taxon strategies for place navigation in a swimming pool. *Behav Neurosci* 99:979-1005
- Whishaw IQ y Jarrard LE (1995) Similarities vs differences in place learning and circadian activity in rats after fimbria-fornix section or ibotenate removal of hippocampal cells. *Hippocampus* 5:595-604
- Wiedenmayer CP (2004) Adaptations or pathologies? Long term changes in brain and behavior after a single exposure to severe threat. *Neurosci Biobehav Rev* 28:1-12
- Wong PT, Neo LH, Teo WL, Feng H, Xue YD y Loke WH (1997) Deficits in water escape performance and alterations in hippocampal cholinergic mechanisms associated with neonatal monosodium glutamate treatment in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 57:383-8
- Wongwitdecha N y Marsden CA (1995) Isolation rearing prevents the reinforcing properties of amphetamine in a conditioned place preference paradigm. *Eur J Pharmacol* 279:99-103
- Wongwitdecha N y Marsden CA (1996a) Effects of social isolation rearing in the Morris water maze. *Brain Res* 715:119-24
- Wongwitdecha N y Marsden CA (1996b) Social isolation increases aggressive behaviour and alters the effects of diazepam in the rat social interaction test. *Behav Brain Res* 75:27-32
- Wongwitdecha N y Marsden CA (1996c) Effect of social isolation on the reinforcing properties of morphine in the conditioned place preference test. *Pharmacol Biochem Behav* 53:531-4
- Wonnacott S (1997) Presynaptic nicotinic ACh receptors. *Trends Neurosci* 20:92-8
- Wonnacott S (2001) Nicotinic Receptors in Relation to Nicotine Addiction, *Psychology*:12,6 Nicotine addiction

- Wonnacott S, Sidhpura N y Balfour DJ (2005) Nicotine: from molecular mechanisms to behaviour. *Curr Opin Pharmacol* 5:53-9
- Wright IK, Upton N y Marsden CA (1991) Resocialisation of isolation-reared rats does not alter their anxiogenic profile on the elevated X-maze model of anxiety. *Physiol Behav* 50:1129-32
- Wu CW, Liao PC, Yu L, Wang ST, Chen ST, Wu CM y Kuo YM (2004) Hemoglobin promotes A β oligomer formation and localizes in neurons and amyloid deposits. *Neurobiol Dis* 17:367-77
- Wu W y Yu LC (2004) Roles of oxytocin in spatial learning and memory in the nucleus basalis of Meynert in rats. *Regul Pept* 120:119-25
- Wyss JM, Chambless BD, Kadish I y van Groen T (2000) Age-related decline in water maze learning and memory in rats: strain differences. *Neurobiol Aging* 21:671-81
- Xu J, Kang N, Jiang L, Nedergaard M y Kang J (2005) Activity-dependent long-term potentiation of intrinsic excitability in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* 25:1750-60
- Xu W, Gelber S, Orr-Urtreger A, Armstrong D, Lewis RA, Ou CN, Patrick J, Role L, De Biasi M y Beaudet AL (1999) Megacystis, mydriasis, and ion channel defect in mice lacking the $\alpha 3$ neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:5746-51
- Xu Z, Seidler FJ, Cousins MM, Slikker W Jr y Slotkin TA (2002) Adolescent nicotine administration alters serotonin receptors and cell signaling mediated through adenylyl cyclase. *Brain Res* 951:280-92
- Yeudall LT y Walley RE (1977) Methylphenidate, amygdectomy, and active avoidance performance in the rat. *J Comp Physiol Psycho* 91:1207-19
- Yildiz D (2004) Nicotine, its metabolism and an overview of its biological effects. *Toxicol* 43:619-32
- Yilmaz Ö, Kanit L, Okur BE y Pöğün S (1997) Effects of nicotine on active avoidance learning in rats: Sex differences. *Behav Pharmacol* 8:253-60
- Yilmazer-Hanke DM, Wigger A, Linke R, Landgraf R y Schwegler H (2004) Two Wistar rat lines selectively bred for anxiety-related behavior show opposite reactions in elevated plus maze and fear-sensitized acoustic startle tests. *Behav Genet* 34:309-18
- Yin R y French ED (2000) A comparison of the effects of nicotine on dopamine and non-dopamine neurons in the rat ventral tegmental area: an in vitro electrophysiological study. *Brain Res Bull* 51:507-14
- Zangrossi H Jr y File SE (1992) Chlordiazepoxide reduces the generalised anxiety, but not the direct responses, of rats exposed to cat odor. *Pharmacol Biochem Behav* 43:1195-200
- Zarrindast MR, Sadegh M y Shafaghi B (1996) Effects of nicotine on memory retrieval in mice. *Eur J Pharmacol* 295:1-6
- Zarrindast M, Rostami P y Sadeghi-Hariri M (2001) GABA(A) but not GABA(B) receptor stimulation induces antianxiety profile in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 69:9-15
- Zhang S, Amstein T, Shen J, Brush FR y Gershenfeld HK (2005) Molecular correlates of emotional learning using genetically selected rat lines. *Genes Brain Behav* 4:99-109
- Zheng XG, Li XW, Yang XY y Sui N (2002) Effects of scopolamine and physostigmine on acquisition of morphine-treated rats in Morris water maze performance. *Acta Pharmacol Sin* 23:477-80
- Zhou M, Suszkiw JB (2004). Nicotine attenuates spatial learning deficit in the rat by perinatal lead exposure. *Brain Res* 999:142-7

Zoli M (2000) Neuronal nicotinic acetylcholine receptors in development in neuronal nicotinic receptors. Handbook of Experimental Pharmacology vol 144 (Clementi F, Fornasari D, and Gotti C eds) pp 13-26 Springer-Verlag Berlin

Zoli M, Le Novere N, Hill JA Jr y Changeux JP (1995) Developmental regulation of nicotinic receptor subunit mRNAs in the rat central and peripheral nervous systems. J. Neurosci 15:1912-39

