

**TESIS EN OPCIÓN AL TÍTULO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**MECANISMOS DE CONSOLIDACIÓN MOTIVACIONAL DE LA  
PLASTICIDAD SINÁPTICA DURADERA. EFECTOS DEL  
ENVEJECIMIENTO CEREBRAL**

Autor: Lic. William Almaguer Melian

Tutor: Drc. Jorge A. Bergado Rosado

**Centro Internacional de Restauración Neurológica (CIREN)**

**La Habana, marzo de 2004**

**Pero Pasteur, encorvado sobre los átomos, ha vivido penetrado de asombro de las maravillas de la obra viva; y ha sacado del examen del cerebro el respeto del Dios que lo crea; y no la negación del que concentra en aquel montón de masa blanda todos los efluvios del universo, todos los tonos de la luz, todo el oleaje de las fuerzas eternas, y todos los presentimientos, suaves como luz de luna, que calman y fortalecen al magno ser humano (...) El comercio de lo pequeño no hace más que exaltar la fe en lo grande. Aira y rebela el alma, que se aparta de lo ruin, piafa como caballo árabe y va a su centro.**

*José Martí*

(De una carta al editor de *La Opinión Nacional* publicada el 6 de Mayo de 1882: O.C TXV P 273)

**INDICE**

<b>ABREVIATURAS</b>	<b>III</b>
<b>SÍNTESIS</b>	<b>IV</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>6</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>24</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>44</b>
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>69</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>91</b>
<b>RECOMENDACIONES</b>	<b>92</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>93</b>
<b>AUTOBIBLIOGRAFÍA</b>	<b>109</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>112</b>

---

---

**ABREVIATURAS**

AMPA	ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico
AMPC	monofosfato de adenosina cíclico
ANOVA	Análisis de varianza
BLA	Amígdala basolateral
CA1, 2, 3, 4	Cuerno de Amón del hipocampo, regiones 1, 2, 3 y 4
CENPALAB	Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio
CREB	<i>cAMP response element binding protein</i>
GABA	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
E-LTP	LTP temprana (< 4 h)
EAFR	Estímulo eléctrico de alta frecuencia de repetición (3 trenes de 15 pulsos a 200 Hz)
L-LTP	LTP tardía (> 4 h)
LTD	Depresión sináptica duradera
LTP	Potenciación sináptica duradera
NMDA	N-metil-D-aspartato
P	Amplitud de la espiga poblacional (potencial de acción compuesto)
PKA	Proteína cinasa activada por el AMP
PKC	Proteína cinasa activada por dialcil glicerol
% PSA	Porcentaje de cambio respecto a los valores basales obtenidos antes del EAFR

## **SÍNTESIS**

La eficacia de la transmisión sináptica puede modificarse en dependencia de la actividad y de la historia reciente de la sinapsis. Se ha propuesto que cambios de esta naturaleza están en la base de los procesos de aprendizaje y la memoria. La forma más conocida de plasticidad sináptica es la potenciación sináptica duradera o LTP (del Inglés **L**ong-**T**erm **P**otential) y consiste en un incremento sostenido en la eficacia sináptica después de aplicar estímulos eléctricos de alta frecuencia de repetición (EAFR) a una vía aferente. La LTP tiene una fase inicial, independiente de la síntesis de proteínas (E-LTP < 4 h) y una tardía que requiere de la síntesis de nuevas proteínas (L-LTP > 4 h). Recientemente se ha demostrado que una E-LTP puede convertirse en una L-LTP por efecto de influencias con significado emocional/motivacional, o por estimulación de estructuras relacionadas como la amígdala basolateral o el área septal. Todas estas formas de consolidación de la E-LTP son mediadas por receptores beta-adrenérgicos. Sin embargo, quedan muchas incógnitas sobre estos procesos de reforzamiento. El objetivo de este trabajo fue conocer posibles mecanismos y estructuras implicadas en el reforzamiento motivacional de la LTP, así como conocer el efecto del envejecimiento sobre el reforzamiento por estimulación eléctrica de la amígdala y el producido por un estímulo emocional/motivacional.

Nuestros resultados han mostrado que la amígdala está implicada en el reforzamiento motivacional de la LTP y que este proceso depende de la síntesis de nuevas proteínas. Por otra parte, la norepinefrina administrada en dosis bajas fue suficiente para provocar la consolidación de una E-LTP en una L-LTP, en tanto la oxotremorina, un agonista colinérgico, no tuvo igual efecto. Los estudios por microdiálisis cerebral mostraron que la estimulación de la amígdala aumentó la liberación de acetilcolina en el giro dentado y redujo la de norepinefrina y serotonina. Sin embargo, el reforzamiento motivacional sólo redujo el glutamato y la glicina. Por último, hemos mostrado que el envejecimiento deteriora la potencialidad de consolidación de la E-LTP, tanto por estimulación de la amígdala basolateral, como por el estímulo emocional/motivacional. Además, los niveles basales de algunos neurotransmisores están reducidos en los animales envejecidos y ni la de estimulación de la amígdala ni el reforzamiento motivacional modificaron la liberación de ninguno de ellos, como ocurrió en los animales jóvenes.

Nuestros hallazgos constituyen una contribución importante a la comprensión de los complejos mecanismos implicados en la interacción entre procesos afectivos y de plasticidad sináptica, y su deterioro con el envejecimiento.

## INTRODUCCIÓN

Aprender y recordar son tal vez unas de las capacidades más subyugantes e inquietantes de los animales. El hombre siempre ha sentido un gran interés por conocer qué parte de nosotros y por qué medios se logra el milagro del aprendizaje y la memoria. A lo largo de la historia se han dado explicaciones especulativas que van desde aquellas que las atribuyen a un alma o espíritu inmortal e inmaterial y por tanto inescrutable, hasta las que consideran que tales fenómenos tienen lugar en el Sistema Nervioso, especialmente en el cerebro, lo cual hace posible que sean estudiados.

El aprendizaje y la memoria permiten a los animales interactuar con más éxito con su entorno variable, inestable y no pocas veces, adverso. Preservar el medio interno es una función de todo el organismo, en especial del Sistema Nervioso y del Sistema Endocrino. Dentro del Sistema Nervioso se destaca, en relación con estas funciones, el Sistema Límbico o Cerebro Emocional (Iversen et al., 2000). Esta importante área del cerebro no sólo participa en el control de la homeostasis, sino que nos dice qué parte de nuestra experiencia resulta placentera y cuál angustiante o dolorosa. De modo que puede acercarnos a lo agradable y alejarnos de lo que no lo es. Más importante aún, el Sistema Límbico desencadena una serie de eventos que pueden dejar huellas, consolidar memoria acerca de los hechos y circunstancias evaluadas por él, que son potencialmente importantes en el futuro (Rolls, 2000; Iversen et al., 2000; Kupfermann et al., 2000).

El Sistema Nervioso tiene la capacidad de modificarse como consecuencia de su propia actividad. A esta característica se le conoce como neuroplasticidad (Kolb, 1999; Bergado Rosado and Almaguer Melian, 2000). En condiciones fisiológicas, el incremento de la actividad nerviosa está determinado por el procesamiento de la información a partir de los cambios energéticos que se producen tanto en el medio interno como en el medio externo. Así pues, es presumible que tal incremento de la actividad de los circuitos activados produzca cambios en ellos de diferente naturaleza que pueden tener una duración variable. De modo que, la plasticidad le permite al Sistema Nervioso almacenar información acerca de experiencias y eventos pasados.

Cajal dio la primera pista objetiva de donde podían tener lugar los cambios subyacentes en la memoria y el aprendizaje, y con ello mostró un lugar donde buscar. Cajal demostró que el Sistema Nervioso estaba compuesto de unidades discretas, las neuronas, interconectadas entre sí por medio de estructuras especializadas denominadas sinapsis (unión en griego, denominación dada por Sherrington más tarde); y supuso que en esas uniones podían ocurrir cambios como consecuencia de la actividad de dichas neuronas y que tales cambios estaban

en la base de la memoria (Cajal, 1894). Más tarde Hebb, siguiendo la idea de Cajal, hipotetizó que la activación simultánea de la célula pre y post-sináptica puede inducir cambios funcionales y morfológicos que modifiquen el modo en que se transmiten las señales de una célula nerviosa a otra (Hebb, 1949).

En los años setenta se encuentran las primeras evidencias experimentales que confirman la predicción de Cajal. Es decir, que la actividad de las sinapsis puede modificar la eficacia con que se transmite la información de una neurona a otra. Este fenómeno se conoce como potenciación sináptica duradera (LTP, del inglés *Long-Term Potentiation*), y consiste en un cambio de conectividad sostenido, después de estimular una vía aferente con pulsos de corriente de alta frecuencia de repetición (EAFR) (Lomo, 1971b; Bliss and Lomo, 1973) (Bliss and Gardner-Medwin, 1973; López Planes et al., 1999). La LTP ha sido propuesta como un modelo celular de aprendizaje y memoria (Bliss and Collingridge, 1993).

La LTP tiene al menos dos fases. La fase inicial o temprana tiene una duración de unas 4 horas y es independiente de la síntesis de nuevas proteínas (*early-LTP*, E-LTP). A este estadio le sigue una fase tardía que depende de la síntesis de nuevas proteínas (*late-LTP*, L-LTP) (Krug et al., 1984; Frey et al., 1988; Matthies et al., 1989; Frey et al., 1991a).

Recientemente, se ha demostrado que una LTP débil y de corta duración puede ser reforzada si poco antes o después de inducido el cambio plástico se les permite beber a animales privados de agua durante 24 horas. De modo que la LTP puede ser modulada, como la memoria, por factores emocionales-motivacionales. A este fenómeno se le conoce como reforzamiento motivacional (Seidenbecher et al., 1995). El reforzamiento motivacional es mediado por receptores noradrenérgicos (Seidenbecher et al., 1995).

En la última década se ha podido establecer que la LTP puede ser modulada por la estimulación de otras estructuras, como la amígdala basolateral. Se sabe que la estimulación de alta frecuencia repetitiva de la amígdala puede incrementar la magnitud inicial de la LTP (Ikegaya et al., 1994; Ikegaya et al., 1995a; Ikegaya et al., 1995d; Ikegaya et al., 1996b; Ikegaya et al., 1997b). La amígdala es una estructura límbica relacionada con los procesos de memoria emocional (LeDoux, 1993; LeDoux, 1994; Rogan et al., 1997), y actúa reforzando contenidos de memoria en otras zonas del cerebro (Roosendaal and McGaugh, 1997; McGaugh et al., 1996; Roosendaal et al., 1998; Ferry et al., 1999a; Roosendaal et al., 1999a; McGaugh, 2000; Roesler et al., 2002; McGaugh et al., 2002).

También se ha podido demostrar que la LTP en el giro dentado puede ser prolongada si se estimula la amígdala basolateral (BLA) en un período de 30 minutos antes, hasta 30 minutos después de inducir la LTP. Este reforzamiento de la LTP está mediado por la norepinefrina y la

acetilcolina, las cuales parecen inducir la síntesis de nuevas proteínas, que pudieran incorporarse a las sinapsis y de ese modo prolongar el cambio de conectividad apreciado (Frey et al., 2001). Esto sugiere que la amígdala pudiera ser una estructura implicada en los procesos de reforzamiento motivacional de la LTP, pero no existen evidencias que lo prueben.

Estudios farmacológicos, empleando antagonistas noradrenérgicos y colinérgicos han sugerido la participación de estos sistemas en los procesos de reforzamiento (Seidenbecher et al., 1995; Frey et al., 2001). La inducción de la síntesis de nuevas proteínas es un proceso que parece mediado por receptores metabotrópicos como los activados por las catecolaminas y la acetilcolina, esta última sobre los receptores muscarínicos; pero no se ha probado que el reforzamiento motivacional dependa de la síntesis de proteínas, ni el efecto que pudieran tener sobre estos procesos agonistas directos de ambos sistemas.

La lesión de la fimbria-fornix bloquea el efecto reforzador de la estimulación de la amígdala (Jas et al., 2000) y la estimulación del *septum* prolonga la LTP más allá de las 4 horas (Frey et al., 2003). Por otra parte, es conocido que durante el envejecimiento se produce un deterioro de las habilidades cognitivas (Barnes, 1979; Barnes and McNaughton, 1985; Barnes et al., 1997), y que en las ratas viejas se deteriora la plasticidad sináptica (Barnes, 1993; Barnes et al., 1996; Bergado et al., 1997a; Barnes et al., 2000). Este deterioro ha sido asociado con la pérdida de neuronas colinérgicas en el *septum* (Shen and Barnes, 1996; Bartus et al., 1982; Cassel et al., 1997). El tratamiento con factor de crecimiento nervioso (NGF), que restaura la actividad colinérgica (Bergado et al., 1997a), así como el transplante de células fetales en el *septum* (Bergado et al., 1997b; Bergado et al., 1996) mejoran la LTP en ratas viejas con déficit cognitivo. También con los años se reduce la potencialidad de las respuestas emocionales o reactividad emocional (Aggleton, 1993), lo cual puede contribuir al deterioro cognitivo al no poder consolidarse muchos engramas de memoria por un reforzamiento motivacional deficiente.

Por lo antes enunciado resulta de interés e importancia conocer la posible vinculación funcional de la amígdala con los mecanismos de reforzamiento motivacional. Asimismo, estudiar la dependencia de estos procesos del metabolismo celular es un aporte importante a la comprensión de sus mecanismos moleculares. Un aspecto esencial es también la confirmación del papel de los sistemas de neurotransmisores, particularmente el noradrenérgico y colinérgico en la mediación de estos efectos. Finalmente, fue de nuestro interés comprobar si el envejecimiento afecta los efectos reforzadores de la estimulación de la amígdala basolateral y del reforzamiento motivacional sobre la LTP en el giro dentado.

## **HIPÓTESIS**

La amígdala basolateral participa en el reforzamiento motivacional de procesos de plasticidad sináptica por mecanismos que involucran sistemas neurotransmisores de tipo metabotrópico que estimulan la síntesis de proteínas, los cuales se deterioran como consecuencia del envejecimiento cerebral.

## **OBJETIVOS**

### *General*

Estudiar los mecanismos implicados en el reforzamiento motivacional de procesos de plasticidad sináptica duradera en el giro dentado y la influencia del proceso de envejecimiento sobre estos.

### *Específicos*

- I. Determinar si la amígdala basolateral forma parte de los circuitos involucrados en el reforzamiento motivacional.
- II. Determinar si el reforzamiento motivacional depende de la síntesis de nuevas proteínas.
- III. Determinar el efecto de agonistas de sistemas neurotransmisores metabotrópicos sobre la potenciación sináptica duradera.
- IV. Determinar los efectos del envejecimiento sobre el reforzamiento por la estimulación eléctrica de la amígdala y el reforzamiento motivacional, en los procesos de plasticidad sináptica duradera en el giro dentado de la rata vieja.
- V. Determinar los efectos del reforzamiento por estimulación eléctrica de la amígdala y del reforzamiento motivacional sobre la liberación de neurotransmisores en el giro dentado del hipocampo en ratas jóvenes y en ratas viejas.

## **IMPORTANCIA TEÓRICA**

Se ha postulado que la amígdala participa en los procesos de aprendizaje y memoria, reforzando, en otras zonas del cerebro, aquellos trazos de memoria asociados a experiencias emocionales. Se desconoce, sin embargo, cuáles son los mecanismos celulares y moleculares de esta interacción, y de qué modo la actividad de la amígdala puede influir sobre los procesos neuroplásticos que tienen lugar durante el aprendizaje. La información obtenida a partir de este estudio aportará conocimientos sobre este importante aspecto.

### **IMPORTANCIA PRÁCTICA**

Durante mucho tiempo se ha pensado que durante los procesos de aprendizaje y memoria tienen lugar cambios plásticos en las conexiones entre las neuronas implicadas. Por otra parte, se conoce que tanto, en el envejecimiento normal como en el patológico se producen deterioros sustanciales en las capacidades cognitivas. El conocimiento de los procesos fisiológicos afectados por el envejecimiento y las enfermedades neurodegenerativas, contribuirá a elaborar nuevas estrategias más eficaces en el tratamiento de enfermedades como la demencia de Alzheimer, lo cual implicará un potencial incremento en la calidad de vida tanto de personas enfermas como de las que envejecen de la manera que suele considerarse como normal.

### **NOVEDAD CIENTÍFICA**

En este trabajo se muestra por primera vez que la amígdala está implicada en el reforzamiento motivacional de procesos de plasticidad sináptica; que el reforzamiento motivacional depende de la síntesis de nuevas proteínas; que el reforzamiento por estimulación de la amígdala y el reforzamiento motivacional se afectan con el envejecimiento. Además se aportan evidencias sobre la posible participación de sistemas de neurotransmisores en estos procesos. Por otra parte, se confirma el importante hallazgo –por primera vez fuera del laboratorio donde fue descrito– de que la LTP puede ser consolidada por factores emocionales.

El documento esta formado por 7 capítulos (Introducción, Antecedentes, Materiales y Métodos, Resultados, Discusión, Conclusiones y Recomendaciones, y Bibliografía) con 39 figuras, 9 tablas y 350 referencias bibliográficas.

Los resultados de este trabajo han sido publicados en 4 artículos aparecidos en revistas indexadas de alto impacto; se han presentado en más de 10 eventos internacionales y, uno de ellos ha sido premiado en el concurso Premio Anual de la Salud del Ministerio de Salud Pública.

Esta tesis fue expuesta en acto de predefensa el 20 de enero de 2004 ante el Consejo Científico de la Facultad de Biología de la Universidad de la Habana.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### *Plasticidad, una propiedad del Sistema Nervioso*

El Sistema Nervioso tiene la capacidad de modificarse a sí mismo como consecuencia de su propia actividad. Continuamente está analizando y elaborando respuestas a la información cambiante que le llega desde la periferia. A esta maravillosa potencialidad del Sistema Nervioso se le conoce como neuroplasticidad (Kolb, 1999; Bergado Rosado and Almaguer Melian, 2000). Una de las manifestaciones más llamativas y cautivadoras de la neuroplasticidad es la memoria y el aprendizaje. A lo largo de nuestras vidas incorporamos una gran cantidad de información acerca del mundo que nos rodea y además se mantiene una continuidad de nuestra personalidad. Responder a la pregunta de qué es lo que se modifica en el Sistema Nervioso cuando se aprende y cuáles son las bases celulares y moleculares de la memoria es un antiguo anhelo de la humanidad.

Hoy, con el incremento en las expectativas de vida, tales interrogantes abandonan un tanto el plano filosófico y gnoseológico para convertirse en un imperativo de calidad de vida, de salud. Al prolongarse más el tiempo de vida, se incrementa la incidencia de enfermedades, en las cuales se produce una pérdida progresiva e irreversible de la memoria y otras capacidades. Una de las dificultades que nos ha imposibilitado adentrarnos en el conocimiento de la memoria es que no sabemos cómo, qué y dónde buscar. Sólo en la segunda mitad del siglo pasado aparecieron técnicas y procedimientos que permiten estudiar y comenzar a dilucidar estas interrogantes.

### *Sinapsis, posible locus de la memoria*

La neuroplasticidad tiene lugar en diferentes niveles de organización de la materia y los acercamientos experimentales a ella van desde estudios conductuales hasta los análisis de actividad y expresión de proteínas. Probablemente, en muchas de las formas de plasticidad, si no en todas, subyacen modificaciones en las conexiones de los circuitos neurales implicados (Bergado Rosado and Almaguer Melian, 2000).

La sinapsis es un tipo de unión celular sumamente especializada y constituye el sitio físico que sirve de puente para el paso de información de una neurona a otra (Sherrington, 1947; Kandel and Siegelbaum, 2000b). Las neuronas no sirven al Sistema Nervioso, si no están adecuadamente conectadas entre sí. Las sinapsis posibilitan que las diferentes partes interactúen funcionalmente, y de esa interacción surge el Sistema Nervioso. En esta importante estructura se determina cuál información y en qué magnitud pasa a la próxima población neural (Kandel and Siegelbaum, 2000a).

Las propiedades de cualquier sistema dependen del número y propiedades de sus elementos, así como del número y propiedades de sus relaciones mutuas o conexiones. Un cambio en la relación estímulo-respuesta (*input-output*) o en la conducta del sistema necesita de cambios en la estructura, pero un cambio en la estructura del sistema no implica necesariamente un cambio en su conducta. En el Sistema Nervioso podemos considerar a las neuronas como los principales elementos del sistema, las sinapsis representan la principal relación o conexión. Asumiendo que el número de neuronas no cambia durante los procesos de aprendizaje y memoria, podemos considerar que las alteraciones en la conducta observadas después del aprendizaje son debidas a cambios en las propiedades y número de las sinapsis. No se producen grandes modificaciones en el número de neuronas a lo largo de la vida que puedan explicar los grandes volúmenes de información que son almacenados en forma de memoria (Matthies, 1989b). Así es que las sinapsis son un buen candidato de sustratos que sustenten la memoria.

Cajal fue el primero en sugerir que en las terminales nerviosas, descubiertas por él, podían tener lugar cambios de conectividad como consecuencia de la actividad de las neuronas y que cambios de esa naturaleza estaban en la base de la memoria (Cajal, 1894). Esta idea fue formalizada más tarde por Hebb, quien predijo que 'cuando el axón de una célula A está suficientemente cerca para excitar a la célula B, repetida o consistentemente, algunos procesos de crecimiento o cambios metabólicos pueden ocurrir en una o ambas células, de tal modo que la eficacia de estas sinapsis aumenta' (Hebb, 1949). En los años setenta Matthies propuso un sugerente modelo celular para explicar como podía ocurrir el proceso de consolidación de la memoria (Fig. 1). Para Matthies el estímulo condicionado produce cambios transitorios en las sinapsis activadas, aunque estas resultan demasiado débiles como para provocar una respuesta. Si dentro de un período, se produce una activación de sinapsis fuertes sobre las mismas neuronas, capaz de producir una respuesta (estímulo incondicionado), entonces se producirá simultáneamente la activación de la síntesis de nuevas proteínas, las cuales pueden llegar hasta las sinapsis débiles antes activadas e incorporarse a ellas y modificar su eficacia. La repetición de este apareamiento temporal entre estímulo condicionado y estímulo incondicionado conduce al desarrollo de un reflejo condicionado (Matthies, 1989b).

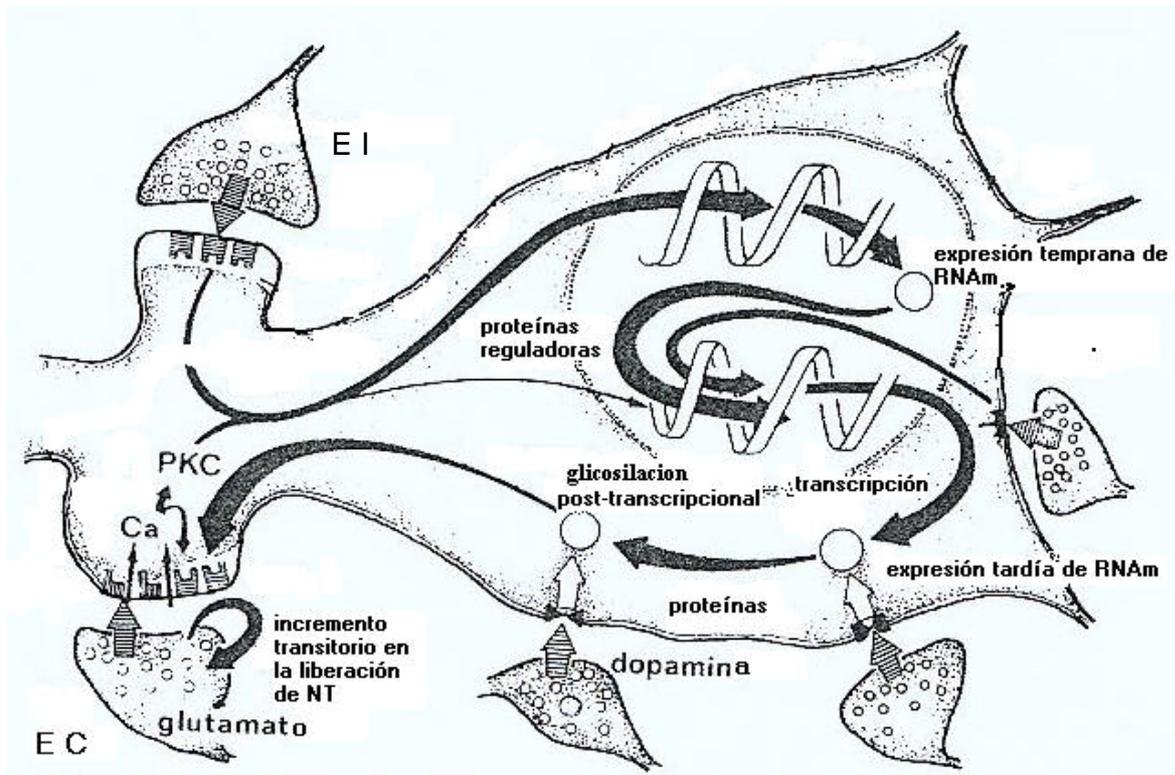


Fig. 1 Señales intracelulares que pueden conducir a la consolidación de la memoria según Matthies. La activación transitoria de una sinapsis (Estímulo Condicionado) puede consolidarse si en un período dado se produce la activación de una sinapsis fuerte (Estímulo Incondicionado). La activación de esta segunda sinapsis puede inducir la síntesis de nuevas proteínas, las cuales se incorporan a la sinapsis débil y de este modo persiste el cambio de conectividad. E C, estímulo condicionado; E I, estímulo incondicionado; PKC, proteína cinasa C (Matthies, 1989b).

Los primeros estudios clínicos sobre los procesos de memoria sugirieron que estos pasaban por dos fases fundamentales. Un estado inicial frágil y poco estable en el tiempo que eventualmente se consolidaba y se hacía más duradero y estable en el tiempo (Müller and Pilzecker, 1900). La hipótesis de la consolidación, como se le nombró, fue la base para los estudios posteriores que estuvieron encaminados a establecer los mecanismos y procesos que se relacionan con el fenómeno de la memoria y su consolidación

Hoy se considera que la memoria tiene dos grandes fases temporales. Una memoria a corto plazo que puede convertirse en una memoria de larga duración en determinadas circunstancias (Matthies, 1974; Matthies, 1976; Matthies, 1988; Matthies, 1989a; Matthies, 1989b). Es decir, la información almacenada inicialmente de forma lábil y transitoria (*short-term memory* <4h) se convierte en memoria a largo plazo (*long-term memory* >4h) mediante un proceso de consolidación de ese trazo de memoria. Si no tiene lugar la consolidación; se pierde la

información. El proceso de consolidación es dependiente del tiempo (McGaugh, 1966). Deben ocurrir una serie de eventos en una secuencia precisa, entre los cuales está la síntesis de nuevas proteínas (Flexner et al., 1963; Ott and Matthies, 1973; Grecksch et al., 1980; Grecksch and Matthies, 1980; Ott and Matthies, 1985); (Castellucci et al., 1989).

El aprendizaje es la adquisición de información acerca de un evento ocurrido y la memoria es la tenencia ya en el Sistema Nervioso de datos sobre determinados estímulos, que permiten interactuar con el medio de un modo más eficaz (Kandel et al., 2000).

### *El Hipocampo*

El hipocampo es una estructura límbica cortical, que desde los años cincuenta se sabe que está implicado en algunas formas de memoria (Penfield and Milner, 1958). Si bien el hipocampo no parece ser el almacén definitivo de contenidos de memoria bien establecidos, las evidencias clínicas y experimentales indican que el hipocampo cumple funciones importantes en la consolidación de la memoria (Milner et al., 1998). Aunque no se excluye su participación en otras formas de memoria, se conoce que está involucrado tanto en la memoria espacial en roedores como en la memoria explícita en humanos (Eichenbaum et al., 1996; Eichenbaum, 1997; Eichenbaum, 1999; Shapiro and Eichenbaum, 1999). El hipocampo recibe de la corteza grandes volúmenes de información multimodal, la asocia, la retiene durante el procesamiento, la amplifica, probablemente la compara con la ya existente y contribuye a su consolidación en la corteza cerebral (Holscher, 2003).

Esta estructura cerebral recibe información procedente de todas las áreas asociativas corticales a través de su principal puerta de entrada, la llamada vía perforante originada en la corteza entorrinal. Esta proyección es fundamentalmente glutamatérgica y excitadora. También recibe aferencias subcorticales por medio del sistema de la fimbria-fornix. A través de este sistema ingresan al hipocampo fibras colinérgicas varicosas (con sinapsis al paso) que se originan en el *septum* medial y están presentes en todas las capas del hipocampo, aunque con una frecuencia de uniones sinápticas de sólo un 7%. Ingresan además aferencias GABAérgicas procedentes de la región septal que contactan sinápticamente con las células hipocampales. También conforman este sistema, pero en menor grado, aferentes dopaminérgicas, que arriban del área tegmental del tronco encefálico; noradrenérgicas provenientes del *locus coeruleus* (15 % de contactos sinápticos) y serotoninérgicas que llegan del rafe medial (21 % de contactos sinápticos). La mayoría de las varicosidades (80-90%) presentes en estas aferencias subcorticales no hacen contactos sinápticos, sino que liberan el transmisor al intersticio (Vizi and Kiss, 1998). De este modo se puede mantener un control tónico en todas las células del hipocampo.

La fimbria-fornix es además una importante vía eferente, cuyos gruesos axones mielinizados, los cuales se originan en las grandes células piramidales del cuerno de Ammón y el subículo, constituyen primero el *alveus* de la formación del hipocampo, para irse reuniendo mesialmente en la fimbria o pilares posteriores del fórnix (Estrada and Pérez, 1986).

Las tres áreas más conocidas del hipocampo están interconectadas entre sí formando un circuito trisináptico. Estas conexiones permiten el flujo de información a través de las células granulares del giro dentado y las piramidales del Cuerno de Amón (Brown TH, Zador AM, 1990). Este circuito se caracteriza por una organización particular de fibras glutamatérgicas excitadoras que presentan la siguiente secuencia sináptica: las sinapsis de las fibras de la vía perforante descargan sobre las células granulares del giro dentado, estas a su vez envían sus axones a la región CA3 donde hacen sinapsis con las neuronas piramidales, las cuales envían colaterales axónicas (colaterales de Schaeffer) hacia la región CA1 para hacer sinapsis allí con las células piramidales de donde se originan las principales proyecciones extrínsecas del hipocampo hacia el *subiculum* y la corteza entorrinal cerrando el lazo córtico-hipocampal (Taylor and Brown, 1999) (ver Fig. 2). En el hipocampo el 90 % de las neuronas son glutamatérgicas y el otro 10 % GABAérgicas (Freund and Buzsáki, 1996).

Estudios previos, tanto de nuestro grupo (Almaguer Melian et al., 1999) como de otros (Hannesson and Skelton, 1998) muestran que la lesión por transección de la fimbria-fornix, que es la principal aferencia colinérgica al hipocampo (Brown and Zador, 1990), afecta el aprendizaje espacial. También, la lesión extensa del propio hipocampo daña el aprendizaje espacial en roedores (Aggleton et al., 1992) (Bannerman et al., 1999). Incluso la isquemia prolongada, daña los capilares del hipocampo y produce la pérdida de neuronas en esta estructura y reducen la memoria espacial (De et al., 1999). La administración de escopolamina, un antagonista colinérgico de los receptores muscarínicos, induce una pérdida en la memoria espacial en un protocolo de entrenamiento de exploración de objeto (Buhot and Said, 1995).

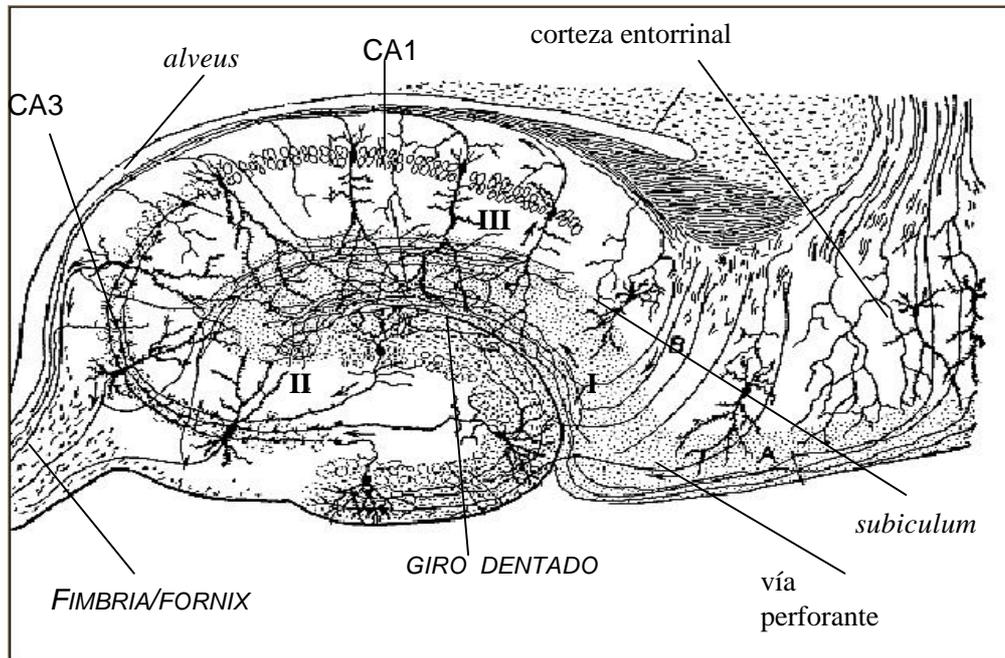


Fig. 2. Esquema de corte transversal de la formación hipocampal. Modificado de Cajal. Los números romanos señalan los tres relevos más importantes entre las neuronas principales de la formación del hipocampo (circuito trisináptico) (Brown TH, Zador AM (1990) Hippocampus. In: The synaptic organization of the brain. Shepherd D, ed, pp 346-388. New York: Oxford University Press).

### *Receptores de membrana que median la transmisión sináptica en el hipocampo*

El glutamato es el neurotransmisor excitatorio por excelencia en el Sistema Nervioso Central, y está presente en todos los relevos de la vía trisináptica del hipocampo. En las terminales postsinápticas hay dos tipos de receptores al glutamato. Los receptores del tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) que median corrientes de calcio y los no NMDA. Existen dos grandes tipos de receptores no NMDA: metabotrópicos e ionotrópicos. Entre estos últimos se encuentran los del tipo ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico (AMPA) y kainato. Los AMPA/kainato una vez activados, modifican la permeabilidad de la membrana postsináptica al ion sodio y son los responsables de la transmisión sináptica rápida (Dingledine and McBain, 1999). La corriente de calcio a través de los canales de NMDA se activa lentamente y tiene un largo curso temporal. En cambio las corrientes mediadas por los receptores/canales AMPA se activan y decaen rápidamente (Ozawa et al., 1991).

Los receptores metabotrópicos al glutamato son de tres tipos, I, II, III. Los de clase I, activan a una proteína G que a su vez fosforila a la fosfolipasa C. Esta enzima escinde fosfolípidos de

membrana y produce diacilglicerol (DAG) e inositol-trifosfato ( $IP_3$ ). El DAG puede activar a la proteína cinasa C (PKC) en una reacción que es catalizada por el calcio. Por su parte, el  $IP_3$  se une a receptores propios de los almacenes intracelulares de calcio, lo cual produce la liberación de este ión hacia el citoplasma celular y con ello el incremento en la concentración celular de calcio (Dingledine and McBain, 1999).

Los receptores al glutamato de las clases II y III activan una proteína G que inhibe a la adenilato ciclasa, lo que a su vez reduce los niveles de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) y de la proteína cinasa A activa (PKA) (Dingledine and McBain, 1999).

Por otra parte, el principal neurotransmisor inhibitorio presente en el hipocampo es el GABA (Mody et al., 1995). En las terminales postsinápticas existen dos subtipos de receptores a este neurotransmisor. Los  $GABA_A$  que median corrientes de cloruro, lo cual puede ocasionar una hiperpolarización de la membrana postsináptica y los  $GABA_B$  que están asociados indirectamente a los canales de potasio y disminuyen las concentraciones intracelulares de AMPc (Olsen and Delorey, 2003).

En cuanto a los neurotransmisores neuromoduladores, la acetilcolina liberada por las terminaciones colinérgicas que llegan al hipocampo desde el *septum*, es uno de los más importantes y está ampliamente distribuida en toda la estructura. Su acción está mediada por receptores muscarínicos (Iga et al., 1996) y nicotínicos (Sargent, 1993). Los receptores muscarínicos se dividen a su vez en 5 subtipos. Los M2 y los M4 producen la inhibición de la adenilato ciclasa así como la actividad de canales de potasio y los M1,3 y 5 producen la activación de la fosfolipasa C y aumentan la concentración del calcio intracelular (Taylor and Brown, 1999). Los receptores nicotínicos pueden estar distribuidos en las terminales pre y postsináptica y en cualquier otra parte del axón, aunque su mayor densidad se registra en las terminales presinápticas y su activación media inlfujos de calcio hacia el interior de las neuronas (Itier and Bertrand, 2001).

Otra de las sustancias que puede modular la actividad neuronal y desencadenar fenómenos a nivel sináptico en el hipocampo es la norepinefrina, la cual provoca decremento de la inhibición a las neuronas piramidales, realizando la respuesta a su excitación (Bergles et al., 1996; Brinton and McEwen, 1989).

Existen dos grandes familias de receptores noradrenérgicos descritas. Los de tipo beta con sus correspondientes subtipos y los de tipo alfa también con distintas subclases.

Los receptores beta-1 predominan en la corteza cerebral y en casi todas las regiones del encéfalo, mientras que los receptores beta-2 predominan en el cerebelo. Sin embargo, en muchos casos, los receptores beta-1 y beta-2 coexisten en el mismo tejido y algunas veces

mediando el mismo efecto fisiológico. La densidad de los receptores beta-1 varía en un rango mayor de áreas cerebrales diferentes que los receptores beta-2. Esto también está suscrito por la presencia casi exclusiva de los receptores beta-2 en la glia o en los vasos sanguíneos. La activación de receptores beta-adrenérgicos estimula la síntesis de AMPc que resulta en la activación de la PKA (Kuhar et al., 1999).

Los receptores noradrenérgicos de tipo alfa también se diferencian en dos subtipos principales, los alfa-1 y alfa-2. La estimulación de los receptores alfa-1 provoca la activación de la fosfolipasa C, la cual desencadena la cascada del inositol trifosfato y consecuentemente la liberación de calcio de los almacenes intracelulares. Los receptores noradrenérgicos alfa-2 en su mayoría son autorreceptores y están distribuidos por todas las regiones del Sistema Nervioso Central. La principal acción de este tipo de receptores es inhibir la actividad de la adenilato ciclasa (Kuhar et al., 1999).

#### *Potenciación sináptica duradera (LTP)*

En 1973, se encontraron las primeras evidencias experimentales que apoyaban las suposiciones de Cajal y de Hebb, es decir, que las sinapsis tienen la capacidad de modificarse como consecuencia de su actividad (Bliss and Gardner-Medwin, 1973). A este fenómeno se le ha conocido como potenciación sináptica duradera o más usualmente por sus siglas en Inglés LTP (*Long-term potentiation*), y consiste en un incremento sostenido en la eficacia de la transmisión sináptica después de estimular una vía aferente con EAFR, esto es, todo el proceso de transmisión ocurre más rápidamente y en mayor magnitud (Lomo, 1971b; Bliss and Lomo, 1973). Tales cambios se producen inmediatamente y poseen una duración variable, en dependencia del protocolo utilizado para su inducción, que va desde algunas horas, días y hasta semanas. La LTP, desde su descubrimiento ha sido propuesta como un modelo celular de los procesos que subyacen en el aprendizaje y la memoria (Bliss and Lomo, 1973). Dos analogías fundamentales sustentan la sugerencia de que la LTP pueda considerarse un buen modelo de aprendizaje y memoria: el hecho de que la potenciación a largo plazo es un cambio de conectividad duradero que depende de la actividad y que fue descrito en el hipocampo, una estructura relacionada con diferentes tipos de memoria.

*La LTP tiene fases mediadas por diferentes mecanismos*

Como la memoria, la LTP tiene fases (Fig. 3). Una fase inicial, denominada LTP temprana (*early-LTP*, <4h, E-LTP), que depende de la entrada masiva de  $Ca^{++}$  a través de los canales de los receptores glutamatérgicos del tipo NMDA. La entrada masiva de  $Ca^{++}$  incrementa las concentraciones intracelulares de este ion, lo que a su vez activa proteína cinasas que producen modificaciones covalentes y funcionales en proteínas preexistentes (Reymann, 1993) tales como la calcio-calmodulina-cinasa II, PKC, proteínas del citoesqueleto, proteínas de adhesión, canales iónicos (Matthies et al., 1989). A esta LTP-temprana le sigue una LTP-tardía (*late-LTP*, >4h, L-LTP), que depende de la síntesis de nuevas proteínas relacionadas con la plasticidad sináptica (Krug et al., 1984; Frey et al., 1988; Krug et al., 1991; Frey et al., 1991a). En los últimos años ha sido postulado que la fase tardía de la LTP es heterosináptica, es decir, que depende de la activación de sinapsis no glutamatérgicas. Estas sinapsis 'moduladoras', que pueden ser dopaminérgicas, noradrenérgicas o colinérgicas, inducen la síntesis de nuevas proteínas necesarias para que se mantenga la LTP más allá de las cuatro horas (Frey et al., 1995) (Fig. 3). La síntesis de nuevas proteínas es activada por la cascada AMPc/PKA (Abel et al., 1997; Nguyen and Kandel, 1996; Frey et al., 1993a). Hallazgos más recientes han mostrado que la MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) está implicada en la LTP (Komiyama et al., 2002) y en algunas formas de aprendizaje y memoria (Walz et al., 2000).

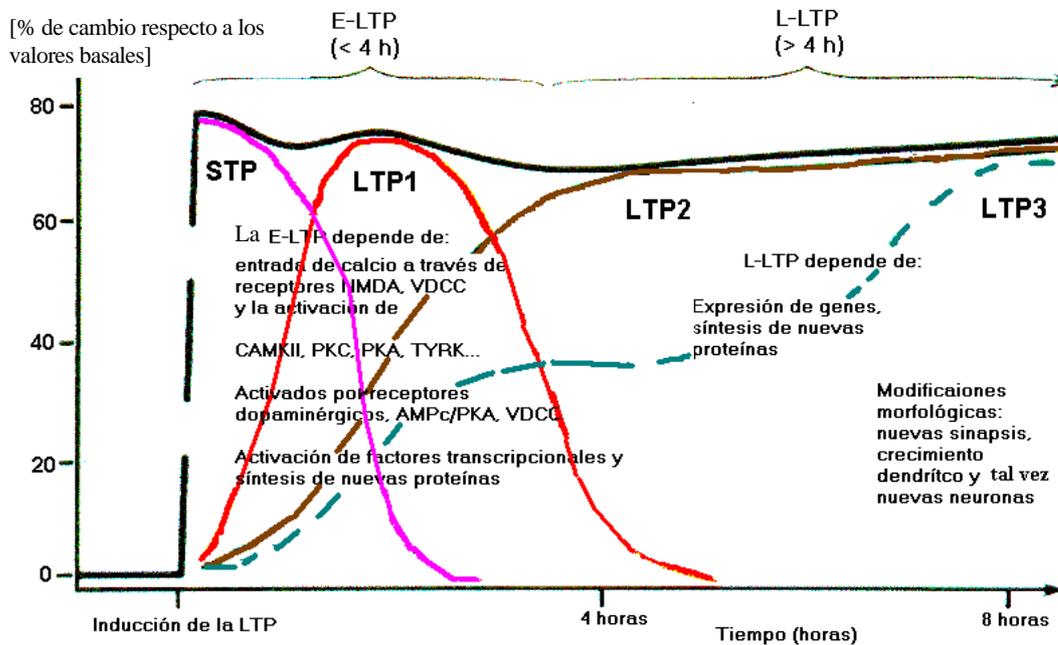


Fig. 3 Mecanismos de la LTP. Después de aplicar un estímulo eléctrico a una vía aferente se produce un incremento en la eficacia de la transmisión sináptica en la cual subyacen una serie de mecanismos moleculares. Inicialmente se activan y modifican proteínas ya existentes, pero para que este fenómeno se prolongue más allá de las 4 horas requiere de la síntesis de nuevas proteínas. STM, *short-term potentiation*, VDCC, canales de calcio dependientes de voltaje. LTP1, es la fase temprana; LTP2 es la LTP tardía. Algunos postulan la existencia de una fase ulterior: LTP3.

### LTP y memoria

Como hemos mencionado la LTP ha sido considerada como un mecanismo celular de memoria y aprendizaje. Esta especulación se basa en la coincidencia entre las características de la LTP y las atribuidas a la memoria. Dentro de las características que hacen de este fenómeno plástico un buen modelo celular de memoria están (Collingridge, 1992):

- ◆ La LTP es un incremento en la eficacia de la transmisión sináptica dependiente de la actividad. Desde finales del siglo XIX se ha pensado que en los procesos de memoria subyacen cambios en la eficacia de la transmisión sináptica de los circuitos activados.
- ◆ La LTP se desarrolla en muy corto tiempo y puede durar por varias semanas, meses y, tal vez, años.
- ◆ La LTP es un evento sináptico/específico. Sólo las sinapsis activadas por el EAFR muestran potenciación.

- ◆ La LTP es asociativa. Las sinapsis estimuladas subumbralmente se pueden potenciar si simultáneamente se estimula con fuerza un ingreso vecino.
- ◆ La LTP como la memoria tiene fases. Una fase inicial independiente de la síntesis de proteínas y una fase tardía que sí requiere la síntesis de *ново* de macromoléculas. Además puede ser consolidada por factores de naturaleza afectiva (Fig. 4).

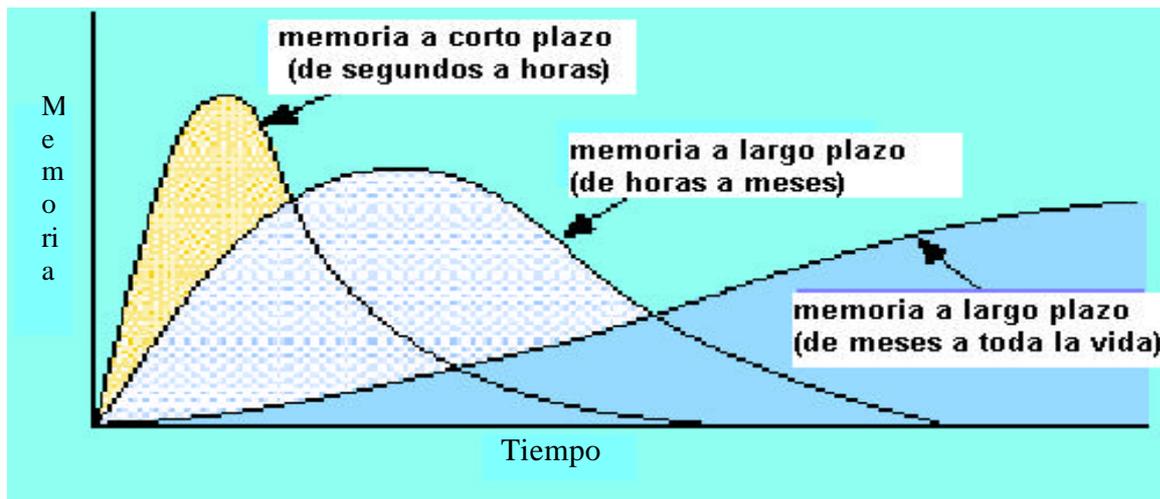


Fig. 4 Diferentes fases de la memoria. Estos diferentes estadios se han distinguido bloqueando los diferentes mecanismos que las median. Notese la correspondencia con las fases propuestas para la LTP Modificado de J. MacGaugh, Science (2000); 287:248-251.

Existen algunas evidencias que muestran que durante algunas formas de aprendizaje y memoria se producen cambios de conectividad similares a los que ocurren en la LTP post-tetánica. Por ejemplo, el condicionamiento del reflejo corneal en los conejos (Weisz DJ and Clark GA, 1984) produce un incremento de la eficacia en la transmisión de las sinapsis vía perforante-células granulares. También el aprendizaje discriminativo en la cámara Y conduce a un incremento en la amplitud de la espiga poblacional en el giro dentado 24 horas después del entrenamiento (Rüthrich et al., 1982). Skelton y cols. observaron un aumento en la amplitud de los potenciales de acción compuesto (P) durante una prueba de condicionamiento operante con motivación apetitiva (Skelton et al., 1987). El condicionamiento al miedo produce LTP en la amígdala (Rogan et al., 1997), e induce un incremento en la eficacia sináptica en la vía núcleo geniculado medial-amígdala lateral (McKernan and Shinnick-Gallagher, 1997). El aprendizaje en pruebas de discriminación espacial produce en el *septum* lateral cambios similares a los de la LTP (García et al., 1993). La adquisición de habilidades motoras puede conducir a la inducción de una LTP en la corteza (Rioult-Pedotti et al., 1998) (Martin and Morris, 2001).

Un problema común en todos esos estudios es que no puede afirmarse que las sinapsis estudiadas participen en el proceso de aprendizaje. Una estrategia para resolver ese problema consistió en utilizar la estimulación eléctrica de baja frecuencia de repeticiones como estímulo condicionado en una prueba de evitación activa. Se pudo demostrar que los animales no solo aprenden la prueba, sino que, simultáneamente, se desarrolla un incremento en la reactividad sináptica de esa misma población. Resultó significativo el hecho de que esa potenciación post-entrenamiento no se observó en animales que no aprendieron la prueba (Matthies et al., 1986; Bergado et al., 1988).

Los estudios de saturación de la LTP también han pretendido establecer una relación entre LTP y memoria. La fundamentación teórica de estos estudios es la siguiente. Si durante el aprendizaje tienen lugar modificaciones como la LTP en determinada población sináptica, se puede esperar que si todas las sinapsis de esa población neuronal están potenciadas al máximo, esto afectará la adquisición de nuevos contenidos de memoria dependientes de esa población. Algunos resultados han mostrado que en estas condiciones de saturación se deteriora la capacidad de aprendizaje espacial (Barnes et al., 1994). Sin embargo, los resultados de otros estudios no han sido tan convincentes o incluso contradictorios (Bliss, 1998; Moser and Moser, 1999).

Otra estrategia utilizada para establecer una posible relación entre LTP y memoria ha sido actuando sobre los mecanismos subyacentes en la LTP con el fin de observar sus efectos sobre la memoria. Morris en la década del ochenta probó que antagonistas de los receptores al glutamato del tipo NMDA y que bloquean la inducción de la LTP, reducen también el aprendizaje espacial (Morris et al., 1986).

La LTP depende de que prime la actividad de las proteínas cinasas sobre la de las fosfatasa. La inhibición genética de la calcineurina, una importante fosfatasa, facilita el aprendizaje, la memoria y la LTP (Malleret et al., 2001). El aprendizaje espacial incrementa en el hipocampo los niveles de la proteína calcio-calmodulina cinasa II ( $Ca^{++}/CaM$ ), una cinasa que se activa durante la inducción de la LTP, y la inhibición de esa proteína deteriora el aprendizaje espacial (Tan and Liang, 1996; Cammarota et al., 2002). La modificación transgénica de la  $Ca^{++}/CaM$  en la treonina 286, el sitio autofosforilable, deteriora la plasticidad dependiente de la experiencia en la corteza somatosensorial primaria donde están representadas las vibrisas en los roedores (*barrel cortex*). Análogos del AMPc, cuya activación es decisiva para el mantenimiento de la LTP (Frey et al., 1990; Frey et al., 1991b; Frey et al., 1993a), mejoran la retención del aprendizaje de evitación inhibitorio (Bernabeu et al., 1996). La activación de la cascada AMPc/PKA es mediada por receptores dopaminérgicos D1/D5 en el hipocampo (Bernabeu et

al., 1997). Los antagonistas beta-adrenérgicos y los inhibidores de la PKA afectan el aprendizaje (Bevilaqua et al., 1997). Es notorio que, tanto la LTP como la memoria tengan una fase inicial transitoria (<4h, en ambos fenómenos) y una fase tardía que depende de la síntesis de proteínas.

Los estudios en el molusco marino *Aplysia californica* han demostrado que hay una relación directa entre el aprendizaje y cambios plásticos en las sinapsis de los circuitos implicados en el desarrollo de la conducta aprendida (Carew and Kandel, 1973; Carew et al., 1979; Bailey et al., 1981; Carew et al., 1981), lo cual muestra que cambios de esta naturaleza pueden subyacer en los procesos de aprendizaje y memoria. Mecanismos similares a los antes mencionados –como la síntesis de nuevas proteínas– inducido por la cascada de activación AMPc/PKA/CREB (CREB, *cAMP response element binding protein*) se ha encontrado que son necesarios para el aprendizaje en la mosca *Drosophila melanogaster* (Yin et al., 1995a; Yin et al., 1995b), lo cual sugiere que estamos frente a mecanismos que son universales.

De cualquier modo, en lo que si no hay duda es que el procesamiento de información, como consecuencia de la experiencia, produce modificaciones morfofuncionales en el Sistema Nervioso, como han mostrado los trabajos con ambientes enriquecidos (Kolb, 1999). En tales condiciones, los animales mejoran la memoria, la adquisición de habilidades motoras y se

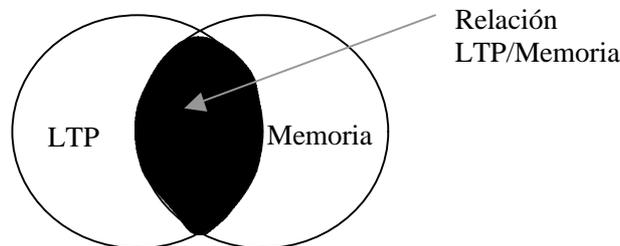


Fig. 5 Posible relación entre la LTP y la memoria. La zona en negro representa el subconjunto de mecanismos comunes a la LTP y a la memoria. Existe un subconjunto de la LTP cuyos mecanismos podrían no estar implicados en la memoria e igualmente hay un subconjunto de la memoria que involucra mecanismos que no son puramente sinápticos, como la neurogénesis.

hacen más resistentes a traumas y enfermedades (Van Praag et al., 2000).

En su conjunto estas evidencias muestran que cambios como los que tienen lugar en la LTP están implicados (Fig. 5), al menos, en el procesamiento de la información que será eventualmente almacenada (Abel and Lattal, 2001; Martin and Morris, 2002).

Aunque no existen evidencias que demuestren una relación funcional directa entre LTP y memoria por las dificultades antes citadas, la acumulación de analogías y evidencias indirectas ha conducido a la aceptación de la idea de que procesos de tipo LTP pueden estar implicados

en las bases fisiológicas de diferentes tipos de memoria (Matthies et al., 1989;Agranoff et al., 1999) y que existen diferentes tipos de memoria (Milner et al., 1998). La LTP, por tanto, es un buen modelo para estudiar los procesos subyacentes en la memoria y en todo caso, ha contribuido a conocer mejor cómo funcionan las sinapsis centrales y el flujo de información en el Sistema Nervioso.

#### *Amígdala. Relaciones con la memoria*

La amígdala es una estructura límbica, conformada por varios núcleos, que presenta múltiples conexiones recíprocas con otras estructuras límbicas y con la corteza (Maren, 1996). En la década del treinta del pasado siglo se pudo establecer que la amígdala está implicada en conductas emocionales (Klüver and Bucy, 1939) lo cuál ha sido confirmado después en estudios en animales y humanos (Aggleton, 1993;Kalin, 1993;LeDoux, 1994;Furmark et al., 1997;Davidson and Irwin, 1999;Critchley et al., 2000;Baron-Cohen et al., 2000). Recientemente, se ha demostrado que la amígdala está relacionada con los procesos de memoria emocional (LeDoux, 1993), y que pudiera actuar reforzando contenidos de memoria en otras zonas del cerebro (McGaugh et al., 1996;McGaugh and Cahill, 1997;McGaugh, 2000;McGaugh, 2002;McGaugh et al., 2002). Se sabe que la lesión de la amígdala basolateral bloquea el efecto potenciador sobre la memoria de la administración de glucocorticoides en el hipocampo dorsal (Roosendaal and McGaugh, 1997). Además, la lesión de la amígdala daña la adquisición de conductas discriminativas de evitación (Poremba and Gabriel, 1997). Por otra parte, el condicionamiento al miedo induce un incremento en la eficacia de la transmisión sináptica de la vía núcleo geniculado medial-amígdala lateral (McKernan and Shinnick-Gallagher, 1997) e induce LTP en la amígdala (Rogan et al., 1997).

El hipocampo y la amígdala participan simultáneamente, tanto en los estados iniciales de la formación de la memoria, como en la recuperación (Izquierdo et al., 1997;Izquierdo et al., 1992;Bianchin et al., 1993;Bianchin et al., 1999;Antoniadis and McDonald, 2000).

#### *Importancia del estado emocional-motivacional en el aprendizaje*

El sistema límbico o emocional constituye una interfase flexible entre la información sensorial y el sistema de acción, que apareció en los mamíferos primitivos, y evalúa la información proveniente de la periferia no en términos de qué, dónde y cómo; sino en términos de recompensa y castigo. Del resultado del análisis que hace este sistema se derivan casi todas las conductas de los animales por cuanto establece el valor afectivo de la información que puede entonces quedar almacenada en el Sistema Nervioso. De modo que cuando el animal se expone a ese estímulo nuevamente se desenvuelve con más eficiencia y éxito (Kandel et al., 2000;Iversen et al., 2000).

La simple observación ha mostrado que el estado emocional-motivacional es importante en los procesos de aprendizaje y memoria. Una motivación elevada o un estado emocional excepcional nos ayuda a recordar eventos y sucesos que en otras condiciones hubiéramos olvidado. Más tarde, se ha podido comprobar experimentalmente que ciertamente el estado emocional/motivacional es decisivo para la consolidación de la memoria (Aggleton, 1993). Los estudios experimentales que muestran una relación entre motivación-emoción y cognición son tantos que resulta imposible citarlos. Sin embargo, es interesante reseñar algunos estudios que contribuyen a establecer las vías y mecanismos implicados en esas relaciones. Así, se ha podido demostrar la participación de sistemas neurotransmisores que incluyen a la norepinefrina, la dopamina, la acetilcolina y el GABA (Gasbarri et al., 1997; Dickinson-Anson and McGaugh, 1997; Izquierdo and McGaugh, 1987; Ammassari-Teule et al., 1991; Gasbarri et al., 1993; Hatfield and McGaugh, 1999; Ferry and McGaugh, 1999; Ferry et al., 1999a; Ferry et al., 1999b; Ferry et al., 1999c) y hormonas como los glucocorticoides (Roosendaal et al., 1997; Roosendaal et al., 1999b). Esos estudios confirmaron también la participación de estructuras límbicas como la amígdala y el *septum* en el reforzamiento emocional/motivacional de la memoria (McGaugh et al., 1996; Nagahara and McGaugh, 1992; Packard et al., 1994; Ferry et al., 1999a). Estos sistemas y estructuras median también las influencias del estrés sobre los procesos de aprendizaje y memoria (Roosendaal et al., 1997). Los efectos del estrés sobre la memoria parecen depender de cuanto resulte activado el eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal y, consecuentemente, cuanto se eleven los niveles circulantes de glucocorticoides y noradrenalina. Un incremento moderado facilita la memoria, pero uno excesivo la deteriora (Sandi et al., 1997; Heinrichs et al., 1996; Lupien et al., 1997; Dachir et al., 1997; Arbel et al., 1994; Radulovic et al., 1999; Conrad et al., 1999; Roosendaal et al., 1999a; Roosendaal, 2000).

#### *Reforzamiento motivacional de la LTP*

Un resultado muy interesante proviene del paradigma conocido como reforzamiento motivacional de la LTP (Seidenbecher et al., 1997; Seidenbecher et al., 1995). Estos estudios han demostrado que una LTP temprana en el giro dentado, inducida por estímulos débiles, puede ser prolongada si se le suministra agua a animales previamente privados de ella o si se les aplica un estímulo eléctrico moderado en las patas, dentro de una ventana temporal de aproximadamente 30 minutos antes o después de la inducida la E-LTP en la vía perforante. Lo más importante de estos estudios es que brindaron las primeras evidencias de que la E-LTP, al igual que la memoria, puede ser influida por factores emocionales y motivacionales. Además muestran que la LTP puede ser consolidada si de alguna manera logramos activar los

mecanismos implicados en las fases tardías de la LTP. El proceso de consolidación de la E-LTP es también dependiente del tiempo.

En este tipo de estudio se combina un estímulo artificial arbitrario que produce un incremento en la eficacia de las conexiones activadas y que carece de significado para el animal; pero que pudiera simular los producidos durante el aprendizaje de una tarea particular, con un estímulo fisiológico con una importancia vital para el animal, como beber agua cuando está sediento. De este modo se pueden estudiar los elementos moleculares y celulares que median la influencia de las emociones y las motivaciones sobre la consolidación de la memoria.

#### *Relación amígdala-hipocampo en la plasticidad sináptica*

En la década pasada se realizaron una serie de trabajos que mostraron que la LTP hipocampal podía ser modulada por otras estructuras subcorticales, como la amígdala basolateral (BLA). Se sabe que la estimulación tetánica de la amígdala puede incrementar la magnitud inicial de la LTP (Ikegaya et al., 1995a; Ikegaya et al., 1995c; Ikegaya et al., 1996b). La inactivación (Ikegaya et al., 1995d; Ikegaya et al., 1996a) o la lesión de la BLA (Ikegaya et al., 1994) atenúa la magnitud de la LTP. Estos autores concluyeron que la amígdala modula la inducción de la LTP y que tal efecto es mediado por la activación de receptores NMDA (Ikegaya et al., 1995b) y receptores beta adrenérgicos (Ikegaya et al., 1997a).

Recientemente, se ha estudiado el efecto de la estimulación tetánica de la amígdala sobre la LTP. En el experimento, la amígdala fue estimulada en períodos de tiempo similares a los utilizados en el estudio del reforzamiento motivacional, esto es, 30 minutos antes y después del estímulo de alta frecuencia repetida de la vía perforante. Se pudo comprobar que, en efecto, la estimulación de la amígdala también prolonga las fases tardías de la LTP en el giro dentado y produce efectos similares a los observados en el estudio del reforzamiento motivacional (Frey et al., 2001). En esencia, la estimulación eléctrica de la amígdala basolateral es capaz de prolongar una LTP de corta duración más allá de las cuatro horas, de modo que se convierte en una LTP tardía. Los estudios farmacológicos mostraron que tal reforzamiento de la LTP temprana es dependiente de la síntesis de nuevas proteínas. Está bien establecido que la LTP tardía depende de la síntesis de nuevas proteínas inducida desde fases más tempranas (Frey et al., 1996; Krug et al., 1984; Matthies et al., 1989; Matthies et al., 1990; Frey et al., 1993b). Esto sugiere que, de alguna forma y por alguna vía, la amígdala, al ser estimulada, induce la síntesis de nuevas proteínas imprescindibles para mantener una LTP más allá de las cuatro horas. El efecto de la estimulación de la amígdala sobre el mantenimiento de la LTP es heterosináptico, pues es mediado por receptores muscarínicos de acetil colina y beta-adrenérgicos (Frey et al., 2001). Esto coincide con el reforzamiento motivacional, pues también es mediado por

receptores noradrenérgicos. Además, ninguna de las dos formas de reforzamiento es mediada por receptores dopaminérgicos (Seidenbecher et al., 1997; Frey et al., 2001). La activación de receptores muscarínicos y/o beta-adrenérgicos podría inducir la síntesis de nuevas proteínas requeridas para la potenciación a largo plazo de las sinapsis del giro dentado activadas por el estímulo eléctrico de la vía perforante.

Estudios más recientes confirman que el efecto de amígdala sobre la LTP en el hipocampo es mediado por la norepinefrina y también por la corticotropina (Akirav and Richter-Levin, 1999; Akirav and Richter-Levin, 2002).

*Significado de la síntesis de proteínas para la LTP tardía. Hipótesis de la marca sináptica*

En la LTP hipocampal pueden ser distinguidas fases caracterizadas por mecanismos celulares distintos en una precisa secuencia temporal. Como ya dijimos, se describe una E-LTP que se prolonga hasta cerca de 4 horas después de la inducción de la LTP y una L-LTP que puede durar, *in vivo* varias semanas. La L-LTP puede ser bloqueada y separada de las fases precedentes por la administración de inhibidores de la síntesis de RNA y proteínas (Frey et al., 1988; Fazeli et al., 1993; Frey et al., 1993b; Frey, 1997). En experimentos farmacológicos se pudo demostrar que la síntesis de RNAm y proteínas debe ser activada inmediatamente después de la inducción de la LTP para permitir el desarrollo de una L-LTP (Frey et al., 1996). Estos hallazgos son apoyados por resultados que demuestran un aumento en la síntesis de proteínas en las horas siguientes a la inducción de la LTP, es decir durante la E-LTP (Frey et al., 1991a). Debido a que la síntesis de proteínas ocurre principalmente en el cuerpo neuronal y a que la LTP es homosináptica, cabría preguntarse cómo estas proteínas encuentran, en las dendritas, las sinapsis adecuadas para la estabilización de la LTP.

Hallazgos recientes *in vitro* muestran que las proteínas recién sintetizadas como consecuencia de la actividad, no necesitan mecanismos especiales de tráfico de proteínas para garantizar la especificidad sináptica (Frey and Morris, 1997a; Frey and Morris, 1997b). En su lugar se desarrolla, en las correspondientes sinapsis activadas, un marcaje transitorio (*synaptic tag*) el cual es capaz de atraer y fijar las proteínas sintetizadas de modo inespecífico durante la E-LTP. Las proteínas unidas de esta forma a las sinapsis activadas son presumiblemente responsables del mantenimiento prolongado de la LTP. Este proceso podría representar un mecanismo clave para el mantenimiento de las fases tardías de la LTP y, posiblemente para la conversión de un trazo de memoria transitorio en uno duradero. En este sentido resulta también interesante que el marcaje sináptico sólo se activa transitoriamente (por períodos de menos de 3 horas).

Durante esta ventana temporal post-tetánica se bloquea el procesamiento de otros ingresos neuronales por la misma vía, a lo que se le denomina oclusión (Frey et al., 1995).

#### *Plasticidad sináptica y envejecimiento*

El envejecimiento es un proceso destructivo, progresivo e intrínseco que acontece en todo ser vivo con el tiempo, como expresión de la interacción del programa genético y el medio ambiente. No es una enfermedad, sin embargo, contiene una gran cantidad de cambios sustanciales que conllevan al deterioro del organismo y finalmente a la muerte.

Si bien el Sistema Nervioso mantiene durante toda la vida la potencialidad de cambiar como consecuencia de la experiencia, existen períodos críticos. En algunos de estos períodos críticos las capacidades neuroplásticas son elevadas; en otros momentos no lo son tanto. Se sabe que entre 7-15 días de nacidas las ratas tienen un nivel máximo de plasticidad cortical. El período que le antecede es de muy poca plasticidad. A partir del día 15 hasta el 30 nuevamente el cerebro se hace más plástico. Otro importante estadio en el que el cerebro se hace más dúctil es la pubertad, que en las ratas es alrededor de los 60 días. En este momento son las hormonas gonadales las que elevan esta capacidad. Después de la pubertad van disminuyendo lentamente las propiedades neuroplásticas (Kolb, 1999).

Con el envejecimiento se deteriora la plasticidad. Uno de los rasgos del envejecimiento es la pérdida notable de la memoria. El aprendizaje, que es una manifestación de la plasticidad del Sistema Nervioso, se reduce en animales viejos (Barnes, 1979; Zyzak et al., 1995; Rasmussen et al., 1996). En este estadio de la vida se afectan también los procesos emocionales. Esto posiblemente se deba a modificaciones sustanciales que sufre el cerebro a lo largo de la vida, de las que no están exentos el hipocampo (Deupree et al., 1993; Geinisman et al., 1995; Papatheodoropoulos and Kostopoulos, 1996) y la amígdala (Aggleton, 1993).

Se ha descrito que el desarrollo de la LTP en animales de experimentación es dependiente de la edad. En los animales viejos el umbral de inducción de la LTP es superior al de los animales jóvenes (Barnes et al., 2000), y su magnitud inicial es menor (Garcia and Jaffard, 1993; Froc et al., 2003). En ellos, la LTP se desarrolla lentamente y decae con rapidez (de Toledo-Morrell et al., 1988; Bergado et al., 1997a). Además, las ratas viejas con deterioro cognitivo presentan afectaciones en la plasticidad sináptica a largo plazo (Bach et al., 1999).

Las fases tardías se han estudiado poco en los animales viejos y hasta el momento nada se sabía sobre el reforzamiento motivacional y por estimulación eléctrica de la amígdala de la E-LTP en animales viejos. En este trabajo se aportan evidencias al respecto.

## MATERIALES Y MÉTODOS

De nuestros objetivos se derivaron una serie de tareas, las que están vinculadas a seis experimentos (Fig. 6). A continuación describimos las tareas por objetivos.

### TAREAS

#### COMUNES A TODOS LOS OBJETIVOS

1. Comprobar la estabilidad de la transmisión sináptica basal en el giro dentado del hipocampo (línea base) durante el tiempo en que se realizan los registros experimentales y que no se presentan oscilaciones circadianas.
2. Comprobar que el protocolo de estimulación (EAFR) induce una LTP temprana, es decir con una duración de aproximadamente 4 horas.
3. Verificar el efecto del estímulo motivacional sobre la LTP temprana inducida en el giro dentado del hipocampo (sólo en los Experimentos I y V)

#### CORRESPONDIENTES AL OBJETIVO I:

##### *Estudios controles*

4. Estudiar el efecto de la inyección de lidocaína en la amígdala basolateral sobre la transmisión sináptica basal y la LTP temprana en el giro dentado del hipocampo.
5. Estudiar el efecto del vehículo (NaCl 0.9 %) inyectado en la amígdala basolateral sobre el reforzamiento motivacional de una LTP temprana.

##### *Estudios problemas*

6. Estudiar el efecto de la inactivación temporal por inyección de lidocaína en la amígdala basolateral sobre el reforzamiento motivacional de una LTP temprana.
7. Estudiar el efecto de la lesión electrolítica de la amígdala basolateral sobre el reforzamiento motivacional de una LTP temprana.

#### CORRESPONDIENTES AL OBJETIVO II:

##### *Estudios controles*

8. Verificar el efecto de la anisomicina o del vehículo inyectado en el ventrículo lateral derecho sobre la transmisión sináptica basal en el giro dentado del hipocampo.

##### *Estudio problema*

9. Estudiar el efecto de la inyección de anisomicina, un inhibidor de la síntesis de proteínas, en el ventrículo derecho sobre el reforzamiento motivacional de una LTP temprana.

CORRESPONDIENTES AL OBJETIVO III:

*Estudios controles*

10. Estudiar el efecto de los vehículos en los cuales se disolvió la norepinefrina y la oxotremorina sobre la transmisión sináptica basal.
11. Estudiar el efecto de la norepinefrina y la oxotremorina sobre la transmisión sináptica basal.

*Estudio problema*

12. Estudiar el efecto de la norepinefrina y la oxotremorina sobre la LTP temprana inducida en el giro dentado del hipocampo.

CORRESPONDIENTES AL OBJETIVO IV:

13. Clasificar los animales viejos, mediante una prueba de aprendizaje espacial, en animales viejos con o sin déficit cognitivo.

*Estudio control*

14. Estudiar la LTP temprana en ratas viejas con o sin déficit cognitivo.

*Estudios problema*

15. Estudiar el efecto del reforzamiento de la LTP temprana por estimulación eléctrica de la amígdala basolateral en las ratas viejas.
16. Estudiar el efecto del reforzamiento motivacional en las ratas viejas.

CORRESPONDIENTES AL OBJETIVO V:

*Estudios problema*

17. Cuantificar los niveles de los neurotransmisores clásicos y sus metabolitos (aminoácidos, acetilcolina, catecolaminas y serotonina) en el giro dentado del hipocampo de ratas jóvenes y viejas, en condiciones basales y sometidas a protocolos de reforzamiento motivacional y por estimulación eléctrica de la amígdala.

Lo anterior se resume en el siguiente esquema (Fig. 6). Un grupo de experimentos estuvo dedicado a conocer vías, estructuras y mecanismos subyacentes en el reforzamiento de la E-LTP; mientras que otros indagaban en el efecto del envejecimiento sobre dos formas de reforzamiento de la E-LTP: el reforzamiento motivacional y reforzamiento por estimulación de la amígdala basolateral.

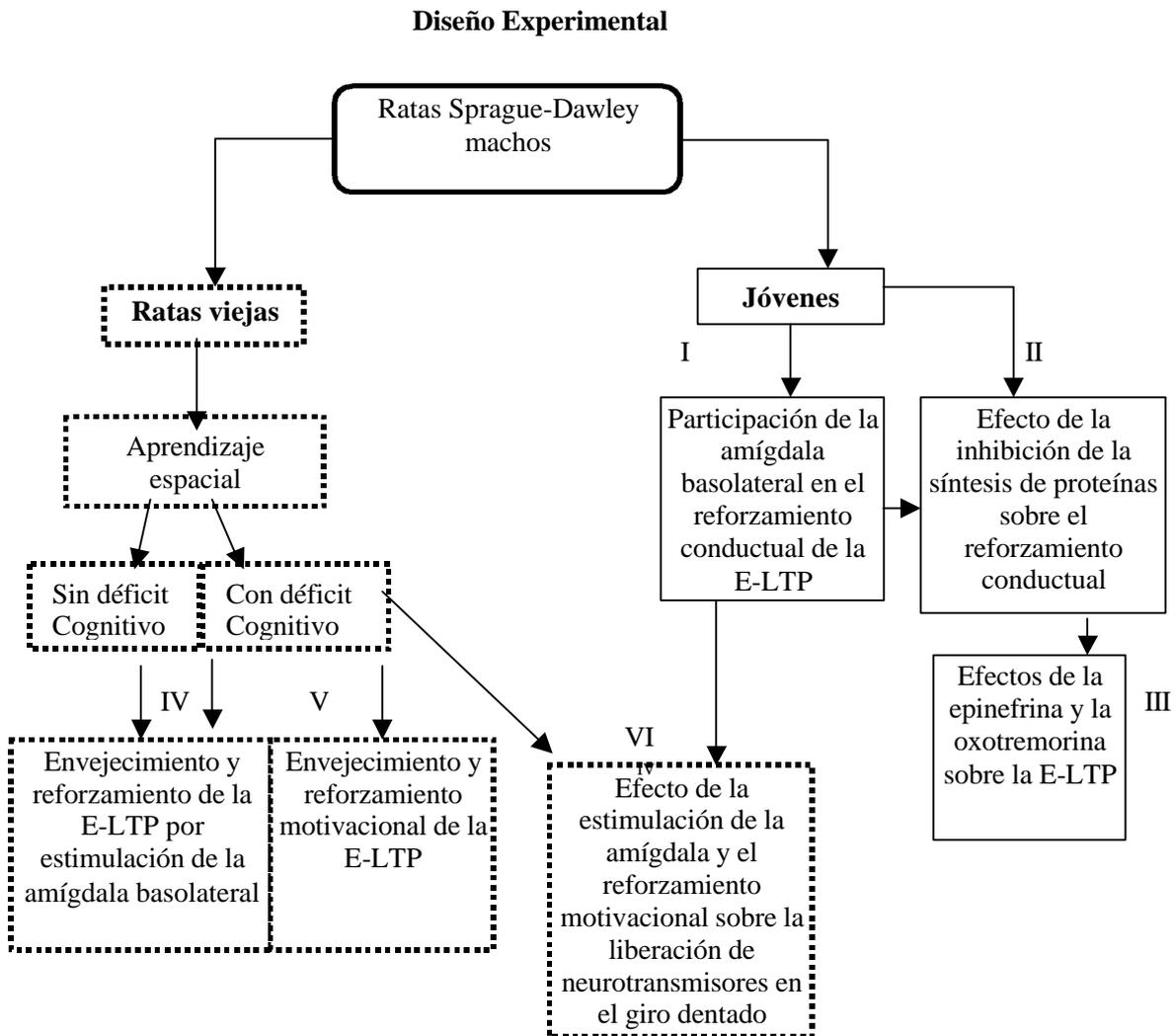


Fig. 6. Diseño experimental. Los números romanos representan los experimentos realizados y dentro de los rectángulos aparece una breve descripción del estudio. Los experimentos I, II, III y VI indagaron sobre posibles estructuras y mecanismos implicados; en tanto que el IV y V en el efecto del envejecimiento sobre los fenómenos estudiados (rectángulos en líneas discontinuas).

### *Animales*

Se utilizaron ratas (*Rattus norvegicus*) de la línea Sprague-Dawley, machos, con peso entre 230-300g, obtenidas del CENPALAB (Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio). Los animales permanecieron en el bioterio del centro en cajas plásticas translúcidas (cinco animales por caja) con condiciones de luz y temperatura controladas (ciclos de 12h luz y 12h oscuridad) y libre acceso a comida y agua (excepto durante las 24 horas requeridas para el estudio del reforzamiento motivacional). En el **Experimento IV, V y VI** además de los animales jóvenes controles se incluyó un grupo de ratas que tenían 24 meses de edad al comienzo del experimento. Las ratas viejas fueron obtenidas también del CENPALAB como reproductores retirados a los 8-10 meses de edad y mantenidos en nuestro bioterio en las condiciones señaladas hasta alcanzar la edad requerida.

En todo momento se veló por garantizar el bienestar de los animales y reducir al mínimo el dolor asociado a los procedimientos empleados de acuerdo con las Regulaciones del CENPALAB para el uso y cuidado de animales de laboratorio.

### *Cirugía*

#### Narcosis

Las ratas jóvenes recibieron una dosis de carga de 420 mg/kg de peso, de hidrato de cloral [Merck (Darmstadt, Germany)] por vía intraperitoneal, lo que garantiza una narcosis de aproximadamente dos horas. Los animales envejecidos fueron anestesiados con una dosis inicial de 25 mg/kg de Ketalar [Liorad (La Habana, Cuba)]. Se decidió utilizar este narcótico, en el caso de las ratas viejas, debido a que brinda una narcosis menos profunda y los animales se recuperan rápidamente, lo cual asegura una mayor sobrevivencia de estos. Cuando fue necesario se aplicó una dosis de mantenimiento, la cual fue un tercio de la dosis inicial. Esto se cumple para los dos narcóticos utilizados.

Una vez narcotizados y rasurada la parte superior de la cabeza, los animales se fijaron en un marco estereotáxico (David Kopf, USA). A continuación se aplicó Timerosal. Se practicó una incisión a lo largo de la línea media sagital en la piel del cráneo con un bisturí o se cortó la piel del cráneo en dependencia del experimento. Después de lavar con peróxido de hidrógeno, fue cortado el periostio a lo largo de la sutura sagital con un escalpelo y eliminado. En caso de sangramiento profuso, se aplicaron compresas de algodón embebidas de epinefrina, un poderoso vasoconstrictor, sobre los puntos de la hemorragia.

Se comprobó la orientación correcta de la cabeza, verificando que los puntos de referencia anatómica *bregma* y *lambda* se encontrasen a la misma altura (Paxinos and Watson, 1998).

Tomando a *bregma* como referencia, se calcularon las coordenadas de las estructuras de interés (Paxinos and Watson, 1998). Después de marcar con tinta las coordenadas sobre el cráneo, se trepanaron los puntos utilizando un taladro pequeño y fresas dentales.

#### Implantación de los electrodos

Los electrodos fueron montados en las torres del marco estereotáxico y se bajaron lentamente a través de los trépanos hasta la profundidad seleccionada.

La población sináptica que se estudió en todos los experimentos fue la de la vía perforante/células granulares del giro dentado. Para ello, se colocó en el giro dentado un electrodo monopolar para el registro de los potenciales evocados (anteroposterior, AP: -3,8; mediolateral, ML: 2,0 mm) a una profundidad inicial de 3,5 mm bajo la superficie del cráneo. Dos tornillos de relojería fijados a los huesos frontal izquierdo y parietal izquierdo sirvieron de tierra y electrodo indiferente respectivamente. En la vía perforante se implantó un electrodo bipolar de estimulación (AP: -7,5; ML: 4,0 mm a una profundidad inicial de 3,0 mm bajo la superficie del cráneo). En los experimentos donde se estimuló la amígdala basolateral, además se ubicó un electrodo monopolar en el núcleo amigdalino basolateral (AP: -2,8; L: 5,0; a una profundidad inicial de 8,0 mm) (Paxinos and Watson, 1998). Para ajustar definitivamente la posición en profundidad de los electrodos de registro y estimulación de la vía perforante, se registraron y compararon potenciales evocados a medida que se fue descendiendo con el electrodo de estimulación en etapas de 0,1 mm (Fig. 7). Se aplicaron pulsos cuadrados aislados de corriente de 600  $\mu$ A de intensidad y 0,1 ms de duración usando un estimulador SEN-3301 (Nihon Kohden, Japan) conectado al animal mediante un aislador SS-104J (Nihon Kohden, Japan). Los potenciales se registraron utilizando un osciloscopio VC-11 (Nihon Kohden, Japan) filtrando entre 1, 5 Hz-3 kHz. Se utilizó como criterio de profundidad óptima la presencia en el potencial evocado de una espiga poblacional bien definida sobre el flanco ascendente del potencial con amplitud máxima nunca menor de 2 mV. Cuando fue necesario poner un electrodo de estimulación en la amígdala basolateral su posición se ajustó de la misma forma.

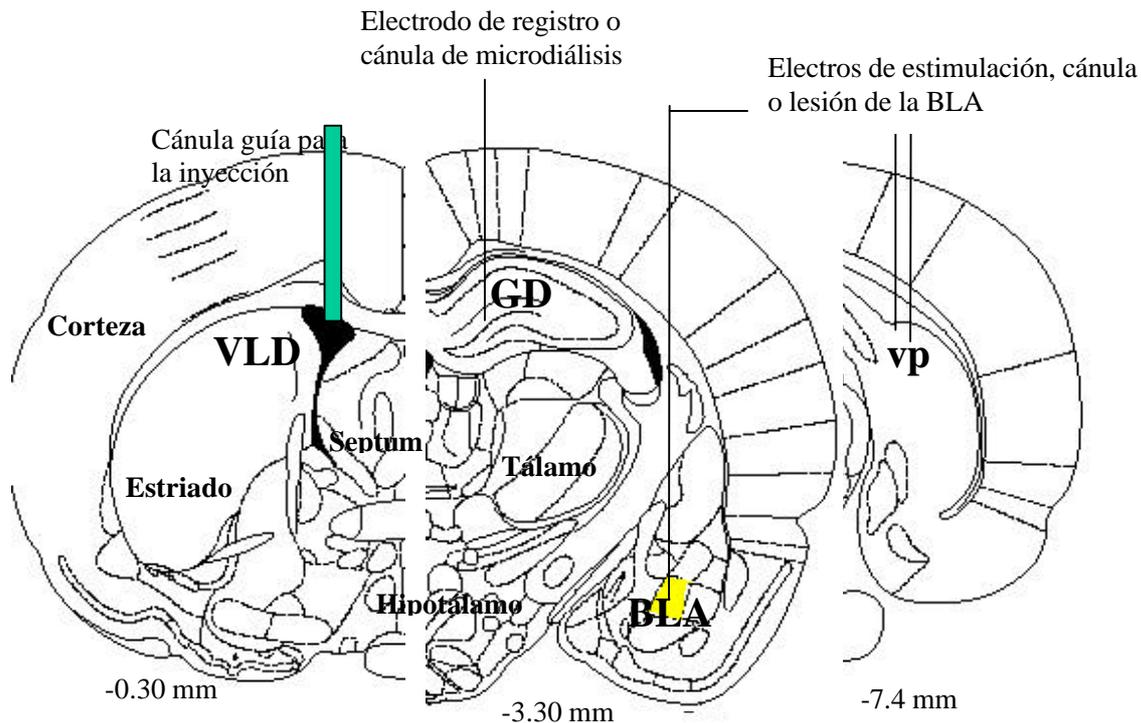


Fig. 7. Esquemas de cortes transversales del cerebro de la rata sobre los cuales se han ubicado esquemáticamente los electrodos de registro, estimulación y las cánulas. En la parte inferior se muestran las coordenadas anteroposterior respecto a bremma de cada corte. BLA, amígdala basolateral; GD, giro dentado del hipocampo; vp, vía perforante; VLD, ventrículo lateral derecho.

Los elementos implantados fueron asegurados con acrílico dental (Paladur, Germany) luego de ser conectados a uniones de goma flexibles, para la ulterior conexión de los animales al sistema de estimulación y registro. Los bordes de la herida fueron tratados con crema antibiótica (nitrofurazona).

#### *Electrodos*

Los electrodos utilizados fueron construidos con alambre de acero inoxidable de 0.125 mm de diámetro aislado con resina epóxica y con una impedancia aproximada de 50 k Ohm.

#### *Cánulas*

En los **Experimentos I, II y III** se implantó además una cánula guía. En el caso del primer experimento la cánula se colocó en la amígdala basolateral (AP= -2.4mm, ML= 5.0mm y DV= 6.5 mm) para estudiar su participación en el reforzamiento motivacional. A través de la cánula se inyectó lidocaína (anestésico local) para inactivar esta estructura (Fig. 7). Se inyectó una solución de 1  $\mu$ L de solución de lidocaína al 2%.

En los otros dos experimentos la cánula se dirigió al ventrículo lateral derecho (AP= 0.3 mm, ML= 1.3 y DV= 2.4 mm) para estudiar, en el primero de ellos, el efecto de la síntesis de proteínas sobre el reforzamiento motivacional; y en el segundo el efecto de un agonista beta-adrenérgico y uno muscarínico sobre la E-LTP. En el estudio de la participación de la síntesis de nuevas proteínas, se inyectó anisomicina que es un inhibidor de tal proceso (Fig. 7). Las dosis de norepinefrina utilizadas fueron 1.5, 5 y 50 nm/L y de oxotremorina, 5, 25 y 50 nm/L, todas en un volumen de 1 µL y la de anisomicina de 240 µg en un volumen de 5 µL.

La inyección de lidocaína, norepinefrina, oxotremorina, anisomicina, vehículo o solución salina fisiológica en los grupos correspondientes se realizó por medio de una cánula de inyección conectada a una jeringuilla (Hamilton Co. USA) con precisión de hasta 0.05 µL. La longitud total de la aguja fue tal que, una vez introducida en la cánula guía, su extremo sobresalía 2 mm más allá de esta, alcanzando una profundidad total que permitía acceder al blanco.

Las inyecciones se realizaron lentamente, a razón de 1 microlitro por minuto. La cánula de inyección se mantuvo en su sitio durante 5 minutos adicionales después de terminada la inyección para evitar el flujo retrógrado de la sustancia.

En el **Experimento VI** se colocó una cánula de microdialísis (CMA/12, Suecia) en el giro dentado (Fig. 7). A través de la cánula se hizo pasar líquido cefalorraquídeo artificial mediante una bomba de microinyección (CMA/100, Suecia). Las cánulas tienen una membrana que es permeable a las moléculas relativamente pequeñas como los neurotransmisores. Los neurotransmisores y otras moléculas difunden hacia el líquido que circula por la cánula, al moverse a favor del gradiente de concentraciones. Luego se recoge el líquido perfundido por el otro extremo de la cánula. Los dializados fueron analizados mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

El líquido cefalorraquídeo artificial con concentraciones normales de potasio contenía NaCl 125 mmol/L, KCl 2.5 mmol/L, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5 mmol/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5 mmol/L, MgCl<sub>2</sub>•6H<sub>2</sub>O 1 mmol/L, ácido ascórbico 0.2 mmol/L, y CaCl<sub>2</sub>•2H<sub>2</sub>O 1.2 mmol/L. El líquido cefalorraquídeo artificial con altas concentraciones de potasio se diferenciaba en que tenía NaCl 43.4 mmol/L y KCl 100 mmol/L.

#### *Mediciones de los neurotransmisores en los dializados*

##### Aminoácidos

La concentración de aminoácidos en los dializados se determinó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección de conjugados fluorescentes con OPA (o-ftaldialdeído). La muestra derivatizada se inyectó en una columna SphereClone ODS(2) de 15.0 cm x 3.2 mm

y partículas de 3  $\mu\text{m}$ , mantenida a 38 °C. La separación se logró mediante un gradiente de eluentes producido por una bomba binaria (Beckman 126, Fullerton, CA, USA) a una velocidad de flujo de 0.525 mL/min. El eluente A fue acetato de sodio 39.8 mmol/L con metanol 10 % pH 5.7 y el eluente B fue metanol con 20 % del eluente A a pH 6.7.

#### Catecolaminas

Las monoaminas y sus catabolitos fueron medidos mediante HPLC con detección electroquímica. El detector (Waters, Milford, USA) se fijó a +0.65 V para la oxidación de las catecolaminas. La fase móvil consistió en NaCl 10 mmol/L, acetato de sodio 80 mmol/L, ácido octanosulfónico 0.8 mmol/L, EDTA 0.3 mmol/L y metanol 5% a pH 4.5. Una bomba isocrática (Gynkotek M480, Macclesfield, Reino Unido) impulsó la fase móvil a una velocidad de 0.210 mL/min a través de una columna de fase inversa SphereClone ODS(2) de 15.0 cm x 2.0 mm de tamaño, empaquetada con partículas de 3  $\mu\text{m}$  y mantenida a 43 °C.

#### Acetilcolina

Las concentraciones de acetilcolina fueron determinadas mediante HPLC con reacción postcolumna y detección electroquímica. La fase móvil consistió en  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  85 mmol/L, NaCl 6.6 mmol/L and Kathon 0.5%(antibacteriano) pH 8.5. El fluido fue impulsado a 0.120 mL/min. por una bomba isocrática (CMA/250, Solna, Suecia) a través de una columna de microboro UniJet de 530 x 1 mm acoplada a un *kit* de electrodo con dos enzimas inmovilizadas: acetilcolinesterasa y colina oxidasa, que producen peróxido de hidrógeno. La señal derivada de la reducción del peróxido de hidrógeno por la peroxidasa fue recibida por un detector electroquímico (LC-4C, BAS, West Lafayette, USA) fijado a un potencial de reducción de 0V.

Todos los reactivos empleados fueron de calidad analítica (Sigma, Dorset, UK).

#### *Variables estudiadas*

Las concentraciones de los neurotransmisores se calcularon empleando estándares externos de concentración conocida. Los datos fueron expresados en nmol/L o pg/mL.

#### Estudio electrofisiológico

Cada estudio contó con una curva estímulo/respuesta, registros basales, EAFR y registros de prueba.

#### Potenciales evocados

El hipocampo tiene una alta densidad de neuronas que se ubican paralelamente en una sola capa, por lo que los potenciales que se generan en ellas pueden sumarse en el registro. Esta característica posibilita que con relativa facilidad puedan estudiarse los potenciales de campo

generados en esta zona del cerebro. Una consecuencia del arreglo espacial particular del hipocampo es que se tiene seguridad de cuáles eventos celulares eléctricos producen los componentes del potencial evocado de campo. En el giro dentado al estimular la vía perforante, el potencial evocado muestra dos componentes. Una primera deflexión negativa corresponde al potencial postsináptico excitatorio poblacional de las neuronas granulares del giro dentado (Fig. 8), el cual es interrumpido abruptamente por un segundo componente positivo en forma de espiga. La espiga es producida por la descarga poblacional de potenciales de acción. La duración del potencial postsináptico excitatorio poblacional es superior al de la generación de potenciales de acción, por lo que tal fenómeno se continúa después de haber cesado la descarga de potenciales de acción. Los estudios clásicos que establecieron el modelo, mostraron que la espiga poblacional es producida por la descarga de potenciales de acción en la población de neuronas estudiados (potencial de acción multiunitarios) (Andersen et al., 1969; Andersen et al., 1971; Lomo, 1971a). En general las variables estudiadas en los trabajos de plasticidad sináptica son, la pendiente del potencial postsináptico excitatorio y la amplitud de la espiga poblacional (PSA).

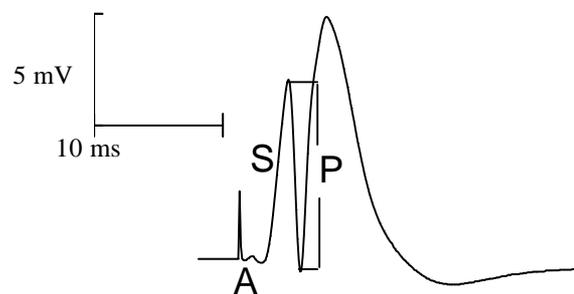


Fig. 8 Potencial evocado en giro dentado al estimular la vía perforante. Es un potencial bifásico, cuyo primer componente es producido por la generación de potenciales postsinápticos excitatorios sumados (S, se mide su pendiente). El segundo componente es producido por la descarga poblacional de potenciales de acción (P, se mide su amplitud). A. artefacto de estímulo.

#### *Curva estímulo/respuesta*

Al inicio de todos los estudios electrofisiológicos, se estudió la respuesta de la población sináptica al alcance de los electrodos. Se aplicaron pulsos cuadrados aislados de corriente con una duración de 0.1 ms, con intensidades crecientes. Cada registro fue el promedio de las respuestas a cinco estímulos a una frecuencia de 0.1 Hz. La intensidad inicial del estímulo fue en todos los casos de 100  $\mu$ A, a partir de la cual se incrementó a 200, 400, 600, 800  $\mu$ A. A

partir de los resultados, se determinó, para cada animal, la intensidad capaz de producir una respuesta del 40 % de la amplitud máxima de la espiga poblacional. Esta fue la intensidad empleada en el resto del estudio.

#### *Registros basales*

Cada registro basal es el promedio de cinco respuestas consecutivas, las cuales se inducen con pulsos aislados cuadrados de corriente de una duración de 0.1ms. La frecuencia de estímulos es de 0.1 Hz. La intensidad se determinó por la curva estímulo/respuesta. Se realizaron hasta 12 registros con intervalo de cinco minutos en cada animal. En el caso del experimento del efecto de la anisomicina sobre el reforzamiento motivacional se hicieron 12 registros antes y 12 después de inyectar la sustancia, para conocer el posible efecto de la anisomicina sobre la transmisión basal. La amplitud de la espiga poblacional P de los registros basales fue promediada y todos los valores fueron expresaron como valores porcentuales respecto a este valor promedio (%PSA).

#### *Estímulos de alta frecuencia de repetición (EAFR)*

Cinco minutos después del último registro basal, se aplicó un EAFR, para inducir una potenciación duradera (Fig. 9). La E-LTP se indujo aplicando 3 trenes de 15 pulsos a 200 Hz, con un intervalo entre trenes de 10 seg. La intensidad es la misma de los registros basales, determinada por la curva estímulo/respuesta. La duración de los pulsos aislados cuadrados de

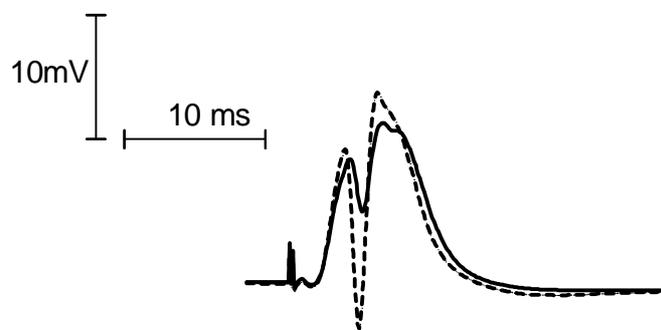


Fig. 9 Potenciales evocados en el giro dentado antes (línea continua) y 5 minutos después (línea discontinua) del EAFR de la vía perforante. Nótese como se modifica el potencial después del EAFR, en especial la amplitud de la espiga poblacional.

corriente fue de 0.1ms. Los estímulos aplicados en la porción basolateral de la amígdala fueron similares. Este estímulo eléctrico inductor puede ser considerado relativamente débil y es capaz de inducir una E-LTP (< 4 h)(Frey et al., 2001), lo cual permite estudiar el efecto reforzador de diferentes manipulaciones.

### *Registros de prueba*

Tienen las características de los registros basales. El primer registro se realizó siempre después de transcurridos cinco minutos después de la inducción de la E-LTP. A partir de los 30 minutos de la inducción del fenómeno plástico, se hicieron registros cada 15 minutos hasta las 6 horas de inducida la LTP.

En una serie de animales no se indujo la E-LTP, sino que solamente se aplicaron estímulos simples para estudiar la transmisión sináptica en condiciones basales durante 6 horas. Este es un grupo control de la transmisión sináptica basal.

### *VARIABLES ESTUDIADAS*

En todos los estudios electrofisiológicos la variable medida fue la amplitud de la espiga poblacional, la cual se expresó en porcentaje respecto a los valores basales (%PSA). El objetivo de esta transformación es destacar el cambio operado en la variable de estudio luego de las manipulaciones experimentales a que fueron sometidos los animales. El cambio porcentual con relación a los valores basales se consideró como un indicador de las modificaciones operadas en la eficacia de la transmisión sináptica de esa población como resultado de las manipulaciones a que son sometidas.

Todos los estudios electrofisiológicos crónicos se iniciaron una semana después de la cirugía. Transcurrida la semana, los animales fueron llevados al *set* de registro, donde se mantuvieron aproximadamente 6 horas con el propósito de que se habituaran. Con este procedimiento se evita que el estado de alerta o el estrés produjeran cambios fisiológicos que pudieran afectar la transmisión sináptica. Al día siguiente se realizó el estudio electrofisiológico, para lo cual los animales fueron conectados al sistema de registro mediante un cable conectado a un conmutador giratorio, que permitió su libre movimiento dentro del *set*. Las señales bioeléctricas obtenidas en el giro dentado fueron amplificadas y filtradas (1Hz-3000Hz) utilizando las gavetas amplificadoras (AB-621G) de un polígrafo *Nihon Kohden* (Japón), digitalizadas (frecuencia de muestreo de 10 000 Hz) por medio de un convertidor analógico-digital CED 1401plus (*Cambridge Scientific Instruments*, Gran Bretaña) y transferidas a una computadora personal donde fueron visualizadas, promediadas y medidas con ayuda del programa *IntraCell for Windows* (no registrado comercialmente; Instituto Leibniz de Neurobiología, Alemania). La estimulación de la vía perforante fue controlada con el mismo programa a través de un estimulador de pulsos con sistema de aislamiento (AM-Systems mod. 2100, USA).

Vale la pena resaltar que los estudios electrofisiológicos se hicieron en animales despiertos, con libre movimiento, de modo que se elimina el efecto de los anestésicos y se trabaja en condiciones fisiológicas.

#### *Análisis estadístico*

Se comprobó que los datos seguían una distribución normal mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de varianza mediante la prueba de Bartlett. Los datos electrofisiológicos (%PSA) fueron procesados mediante un análisis de varianza de clasificación doble con mediciones repetidas. Los factores tenidos en cuenta fueron: grupo y tiempo. El factor tiempo comprendió un nivel de 6 mediciones correspondiente a cada registro después de inducida la E-LTP. Las diferencias entre grupos y la interacción grupo/tiempo se esclarecieron con la prueba *post hoc* de rangos múltiples de Duncan. La duración de la LTP en cada grupo, o la estabilidad de los registros en condiciones basales se conoció con el auxilio de la prueba de comparaciones de muestras pareadas *t* de Student, comparando el promedio de los valores iniciales con los valores después del EAFR o sus similares cuando no se aplicó. En cuanto al estudio de las mediciones de transmisores se utilizó la prueba de comparación de medias *t* de Student para comparar el efecto de las diferentes manipulaciones respecto al registro basal. En este estudio, los datos por estimulación de la amígdala basolateral relacionados con la acetilcolina no cumplen con la homogeneidad de varianza, por lo cual se aplicó la prueba U de Mann-Whitney. En todos los casos se consideraron diferencias estadísticamente significativas entre las muestras comparadas –esto es, que provenían de diferentes poblaciones– cuando el valor de P fue menor de 0.05 ( $P < 0.05$ ).

En los gráficos se muestran las medias  $\pm$  el error estándar de la media.

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa STATISTICA versión 4.5 para Windows (1993).

A continuación se dan más detalles de cada experimento.

### **Experimento I**

Participación de la amígdala basolateral en el reforzamiento motivacional de una LTP temprana

#### Cirugía

Además de los animales con cánula en la BLA empleados en este estudio, en un grupo de animales (N= 9) no se implantó cánula alguna en la amígdala, sino que esta fue lesionada mediante el paso de corriente catódica de 2.5 mA durante 10 segundos. La corriente para provocar la lesión electrolítica se pasó a través de un electrodo monopolar que fue retirado

luego de completar la lesión. Esta lesión fue realizada durante el mismo acto quirúrgico en que se implantaron los electrodos.

### Grupos experimentales

A un grupo de animales (N= 13) se le realizó un estudio de la potenciación sináptica duradera en condiciones basales, es decir, sin otra manipulación que la estimulación EAFR de la vía perforante para inducir una E-LTP (LTP control). Otros animales sanos (N= 11) y con lesión de de la amígdala basolateral (N= 8) fueron privados de agua durante las 24 horas previas a la inducción de la LTP por estimulación de la vía perforante. Quince minutos después, se les permitió acceso al agua y se mantuvo *ad libitum* durante el resto de la prueba. Todos los animales bebieron abundantemente en los primeros minutos, como se comprobó por observación directa. A algunas de las ratas (N= 8) se les inyectó 1 $\mu$ L de lidocaína al 2 % [Imefa (La Habana, Cuba)] en la amígdala basolateral 10 minutos después del EAFR y cinco antes de beber agua, con el fin de inactivar temporalmente esta estructura (Fig. 10).

La inactivación permanente se produjo mediante lesión electrolítica de esa estructura realizada 15 días antes del estudio electrofisiológico.

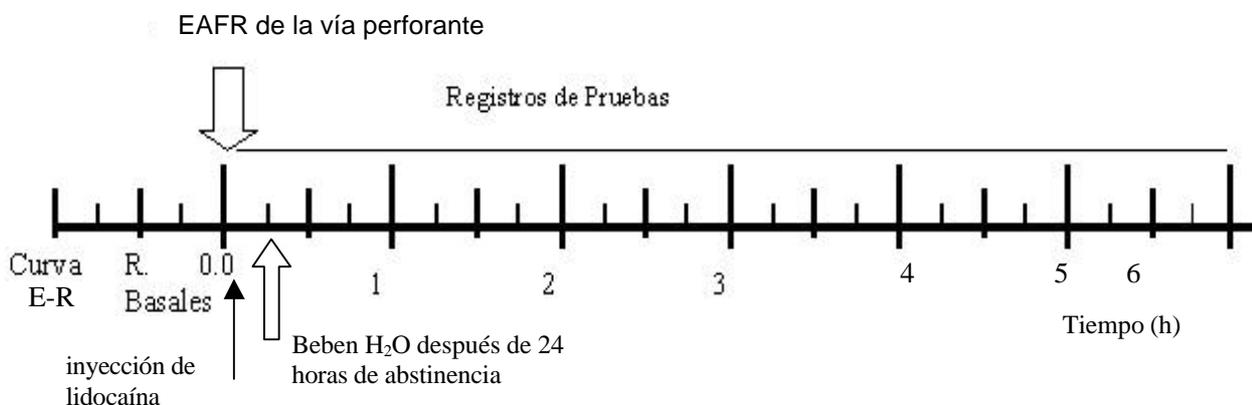


Fig. 10 Secuencia temporal del experimento. Se inyecta lidocaína diez minutos después del EAFR de la vía perforante y beben agua a los quince minutos. E-R, estímulo-/respuesta.

Se crearon grupos controles adicionales para determinar si la inyección de lidocaína tenía algún efecto sobre los potenciales evocados en giro dentado (N= 5), o si esta (N= 8) o la lesión permanente de la amígdala (N= 9) modificaban la amplitud o el curso temporal de la LTP en ausencia de reforzamiento motivacional.

### *Estudio histológico*

Al concluir los estudios electrofisiológicos, las ratas anestesiadas con 420 mg/kg de hidrato de cloral, fueron perfundidas por vía intracardiaca, utilizando como fijador una solución de paraformaldehído 4%, glutaraldehído 0.1% y ácido pícrico 15% en tampón fosfato (PB) 0.1 mol/L, pH = 7.4 (500 ml por animal). Los cerebros fueron extraídos y luego de una hora de post-fijación en la misma solución fijadora fueron lavados con PB. Posteriormente, las muestras fueron incubadas en soluciones de sacarosa y congeladas en nitrógeno líquido. Se hicieron cortes histológicos transversales de 20  $\mu$ m en un criostato, para muestrear la región del hipocampo y de la amígdala basolateral con el propósito de confirmar la correcta colocación de los electrodos, de la cánula guía y la lesión de la amígdala, respectivamente. Todos los reactivos utilizados fueron de calidad analítica. El nitrito de sodio y la sacarosa procedieron de la firma Sigma (St. Louis, USA), el xilol; el cloruro de sodio, el formaldehído, el glutaraldehído, el ácido pícrico, el hidrógeno fosfato de sodio y el de carbono de la compañía BDH (Poole, UK). La violeta de cresilo se le compró a la Compañía Merck (Darmstadt, Germany) y el DPX a la Dako (California, USA). La heparina sódica fue suministrada por la firma Liorad (La Habana, Cuba).

### **Experimento II**

Síntesis de proteínas y reforzamiento motivacional.

Este estudio responde a la pregunta si el reforzamiento motivacional más allá de las cuatro horas depende de la síntesis de proteínas. Si esto es cierto la aplicación de un inhibidor de la síntesis de proteínas debe abolir el reforzamiento motivacional.

#### Grupos experimentales

Se formaron cuatro grupos de animales. A un grupo sólo se le indujo la LTP y se siguió su curso temporal por seis horas (Fig. 11). A otros, quince minutos después del EAFR de la vía perforante, se les permitió beber agua después de veinticuatro horas de abstinencia y se registró por seis horas (N= 11). A los que recibieron anisomicina (N= 12) (Sigma, St. Louis, USA). o solución salina (NaCl 0.9%), como control de la inyección (N= 11), esta se les administró 60 minutos antes del EAFR de la vía perforante. De modo que cuando se les permitió beber agua quince minutos después, la síntesis de proteínas estaba bloqueada. En estos grupos, los registros basales fueron diferentes en cuanto al número. Se hicieron 12 registros basales como en el resto de los grupos y 5 min después del último registro se inyectó la anisomicina. A continuación se realizaron 12 registros más, con el fin de observar su efecto posible sobre la transmisión sináptica basal.

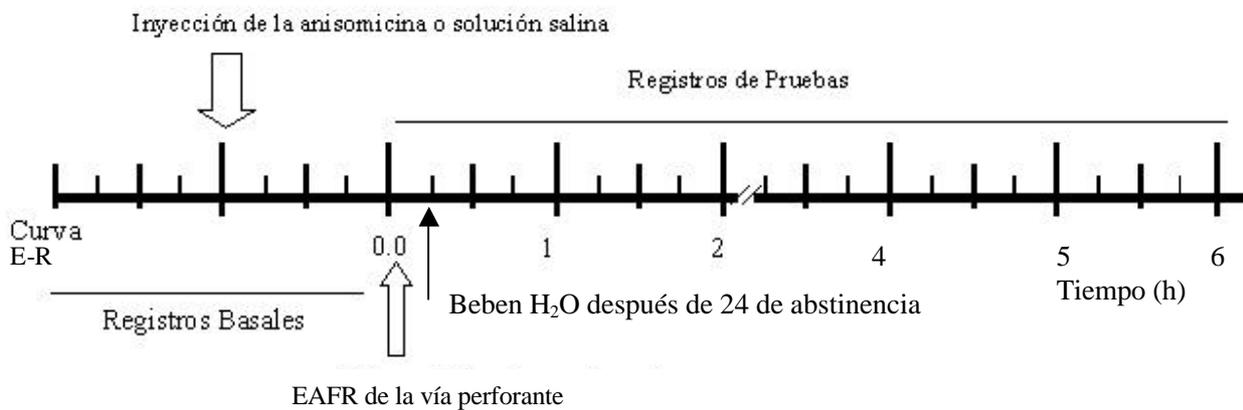


Fig. 11 Secuencia temporal del estudio electrofisiológico. E-R, estímulo/respuesta.

### Experimento III

Efecto de la norepinefrina y de oxotremorina sobre la E-LTP

#### Electrofisiología

El procedimiento fue similar al empleado en el **Experimento II**. Diez minutos después de inducida la LTP, se inyectó norepinefrina (NE) (Sigma, St. Louis, USA), un agonista adrenérgico, oxotremorina (Oxo) (Sigma, Saint Louis, USA), un agonista muscarínico o los medios en que fueron disueltos (Fig. 12).

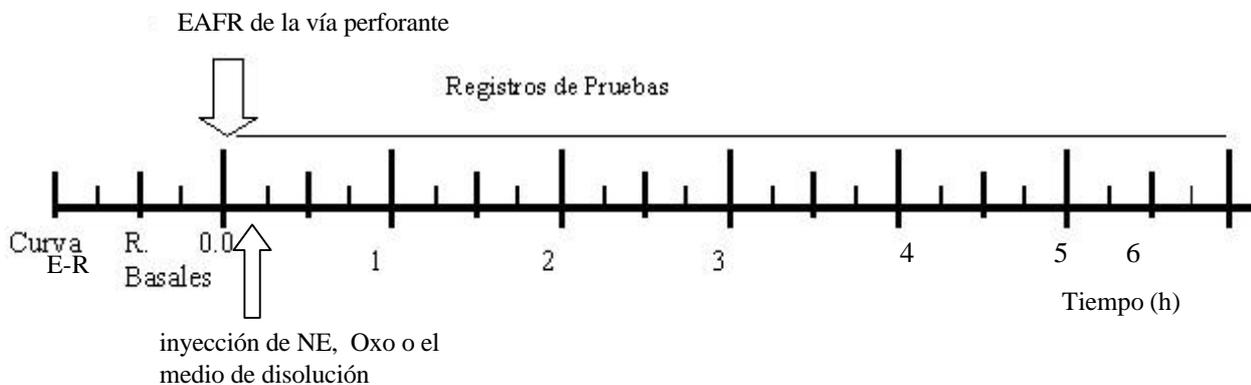


Fig. 12 Secuencia temporal del experimento. Se inyectó la sustancia diez minutos después del EAFR de la vía perforante. E-R, estímulo/respuesta.

#### Grupos Experimentales

A un grupo de animales se les indujo la LTP sin ninguna otra manipulación (LTP control). A otros animales se les inyectó por vía intracerebroventricular ácido ascórbico disuelto en solución

salina, que fue el vehículo en el que se disolvió la norepinefrina, a los 10 minutos después del EAFR (LTP+Veh, N= 8). A un grupo análogo se le inyectó solución salina (LTP+NaCl, N= 8) que fue el medio empleado para disolver la oxotremorina. Se inyectó oxotremorina o norepinefrina a otros animales a diferentes dosis (LTP+Oxo 5 nmol/L, N= 8; LTP+Oxo 25 nmol/L, N= 8; LTP+Oxo 50 nmol/L, N= 9 y LTP+NE 1.5 nmol/L, N= 6; LTP+NE 5 nmol/L, N= 7; LTP+NE 50 nmol/L, N= 7). Antes de realizar estos estudios, investigamos si alguna de las sustancias modificaban la línea base con los grupos: basales+Veh, N= 6; basales+NaCl, N= 10; basales+Oxo, N= 8; basales+NE, N= 9 y basales, N= 10. La inyección se realizó en estos grupos en un período de tiempo similar al utilizado en los grupos de LTP.

Antes de iniciar este experimento probamos ambas sustancias, teniendo como referencia efectos fisiológicos bien conocidos. La aplicación intraperitoneal de la norepinefrina provocó aumentos de la frecuencia cardíaca. La oxotremorina indujo actividad *theta* en el electroencefalograma hipocampal.

Las dosis para la aplicación intraventricular fueron calculadas a partir de reportes (Ott et al., 1983) de efectos por administración periférica siguiendo la regla empírica de Dosis intraventricular= dosis periférica/1000.

#### Estudio histológico

Al finalizar el experimento se realizó un estudio histológico con el fin de comprobar la ubicación de la cánulas en el ventrículo derecho. Se siguió un procedimiento similar al descrito en el

#### **Experimento I.**

#### **Experimento IV**

Efecto del envejecimiento sobre el reforzamiento de la LTP temprana por estimulación de la amígdala basolateral

Como el envejecimiento deteriora a la memoria y a la plasticidad sináptica, los animales viejos fueron entrenados en una prueba de aprendizaje espacial para conocer su estado cognitivo.

#### Estudio Conductual

Los animales jóvenes (N= 10) y viejos (N= 18) fueron entrenados en el laberinto acuático de Morris durante cinco días.

Esta prueba se realizó en una piscina circular de un metro y medio de diámetro y cuarenta centímetros de profundidad, llena de agua a temperatura de 22°C (Fig. 13). La piscina se dividió imaginariamente en cuatro cuadrantes, en uno de los cuales se colocó una plataforma translúcida sumergida a dos centímetros por debajo de la superficie del agua, invisible por tanto desde la superficie. Se realizaron cinco sesiones de entrenamiento en días sucesivos. En cada

sesión se hicieron 8 pruebas con cada animal. En cada una de las pruebas, el animal fue introducido en el agua mirando a la pared del tanque desde una de 4 posiciones marcadas según los puntos cardinales (N, S, E, O). El orden de entrada al agua se varió aleatoriamente para cada prueba y cada día. En cada prueba se midió la latencia de escape del animal, es decir el tiempo que tarda la rata en encontrar la plataforma sumergida, para lo cual tiene hasta un máximo de 60 seg. Si transcurrido este tiempo la rata no encuentra la plataforma se le conduce hasta la misma. Se permitió que el animal permaneciera sobre la plataforma 30 seg.

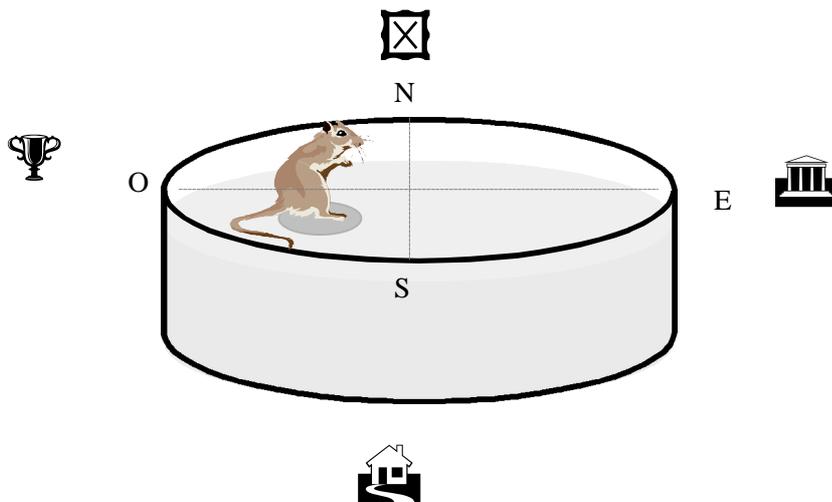


Fig. 13 Se representa la piscina dividida imaginariamente en cuatro cuadrantes marcados con N, norte; S, sur, O, oeste y E, este. Se aprecian también las pistas extralaberínticas y un animal sobre la plataforma sumergida.

entre cada intento (Fig. 13).

Durante este período, los animales exploran la habitación y establecen relaciones espaciales entre el lugar donde están ubicados y diferentes objetos que sirven de referencias. De este modo las ratas controles paulatinamente logran encontrar la plataforma sumergida.

El entrenamiento del quinto día fue diferente. Los animales realizaron los cuatro primeros intentos como los días anteriores; pero al quinto se retiró la plataforma y se contó el número de veces que cruzaron por el lugar donde antes estuvo la plataforma. Este ensayo se denomina cruces análogos y es la prueba definitiva de la adquisición, es decir nos dice si los animales aprendieron o no y cuanto aprendieron. En este último ensayo los animales contaron también con 60 s.

Las variables que se midieron fueron: latencia de escape y el número de cruces en la última prueba.

*Procesamiento estadístico*

Los datos de las latencias de escape de cada día se dividieron en dos bloques, y se calcularon las latencias de escape promedio de los primeros cuatro intentos (ej. bloque 1.1) y los últimos cuatro (ej. bloque 1.2). El primer número expresa el día y el segundo el bloque.

Atendiendo a los resultados en esta prueba, las ratas viejas fueron divididas en dos grandes grupos. Para esto se calculó la latencia media total y la desviación estándar (SD) en el grupo de ratas jóvenes. Los animales viejos que tuvieron una latencia media durante toda la prueba superior a la media más dos SD de las ratas jóvenes se consideraron ratas con déficit cognitivo (Viej con Def, N= 13); las restantes se consideraron sin déficit cognitivo (Viej sin Def, N= 5). Con el fin de tener una idea más clara y confirmatoria de cuan diferentes eran los grupos se realizó un análisis de varianza de clasificación doble (dos vías) con mediciones repetidas. Se consideraron el factor grupo (animales jóvenes, Viej sin Def y Viej con Def) y el factor intentos (8 intentos).

Diseño Experimental

Cada grupo obtenido a partir de los resultados en el laberinto acuático se subdividió en dos grupos para el estudio electrofisiológico. De modo que se formaron seis grupos experimentales. A una parte de los animales se le estimuló la amígdala basolateral 15 min después del EAFR de la vía perforante y a otros, sólo se les indujo la LTP.

Estudio Electrofisiológico

Luego de la construcción de la curva estímulo-respuesta, se tomaron 6 registros basales y 5 min después se indujo la LTP. A partir de este momento se realizaron registros de prueba a los 5 min y a continuación cada 15 min, a partir del momento del EAFR, durante 6 horas (Fig. 14).



Fig. 14 Secuencia temporal del estudio electrofisiológico. E-R, estímulo/respuesta.

### Grupos Experimentales

Se formaron dos grupo de animales viejos con déficit (Viej Def, N= 9) y sin cognitivo (Viej No Def, N= 4) para estudiar la E-LTP o LTP control, y dos grupos más (Viej No Def+BLA, N= 4; Viej Def+BLA, N= 6) para estudiar el efecto del envejecimiento sobre el reforzamiento de la E-LTP en el giro dentado por estimulación eléctrica de la amígdala basolateral.

### **Experimento V**

Efecto del envejecimiento sobre el reforzamiento motivacional de la LTP temprana en el hipocampo

#### Grupos experimentales

Se formaron cuatro grupos de animales. Un grupo de ratas jóvenes (LTP control, N= 13) y ratas viejas controles (Viej Def LTP, N= 9), a los que sólo se le realizaron registros de prueba después de inducida la LTP, y grupos de animales jóvenes (LTP+Ref. N= 11) y viejos con reforzamiento motivacional (Viej Def Ref, N= 6), a los cuales 15 min después de la inducción de la LTP se les dio de beber, luego de haber sido privados de agua las últimas 24 horas.

#### Estudio Electrofisiológico

Este experimento tuvo una secuencia temporal similar al **Experimento II**.

La diferencia está en que en vez de estimular eléctricamente la amígdala basolateral a los quince minutos después del EAFR, se les suministró agua a los grupos de ratas jóvenes y viejas, y se verificó que efectivamente bebieran. Los animales no bebían desde hacia 24 h (Fig. 14).

### **Experimento VI**

Efecto de la estimulación eléctrica de la amígdala basolateral o del reforzamiento motivacional sobre la liberación de neurotransmisores en el giro dentado del hipocampo.

#### Estudio Conductual. Laberinto acuático de Morris.

Esta prueba se realizó con el fin de clasificar a los animales viejos, en animales con déficit cognitivo y sin déficit cognitivo. El entrenamiento fue similar al descrito en el **Experimento IV**. Todos los animales viejos utilizados para este estudio tenían déficit cognitivo.

#### Cirugía

Después de entrenadas en el laberinto acuático de Morris se procedió a realizar la implantación de los electrodos mediante cirugía estereotáxica como se describe en los Procedimientos Generales.

Bajo narcosis, se implantó un electrodo de estimulación en la vía perforante y uno en la amígdala basolateral, en las coordenadas mencionadas con anterioridad. En el giro dentado se colocó una cánula de microdiálisis (CMA Microdiálisis, Suecia).

Después de la operación los animales se colocaron en el set de trabajo, donde permanecieron hasta el otro día. Al día siguiente, las cánulas implantadas a los animales se conectaron al sistema de bombeo y recogida. El líquido cefaloraquídeo artificial se infundió a razón de 2  $\mu\text{L}/\text{min}$  y se recolectaron muestras de 90  $\mu\text{L}$ . Después de un período de estabilización de una hora, se realizaron tres recogidas de muestras basales. Posteriormente, se estimuló la vía perforante y se recolectaron dos muestras más. A continuación, se estimuló la amígdala basolateral (BLA) y se recolectaron otras dos muestras (Fig. 15). En ambos casos, se aplicaron estímulos eléctricos simples a una frecuencia de 0.1 Hz con una duración cada pulso de 0.1 ms y una intensidad de 400  $\mu\text{A}$ , durante 45 minutos.

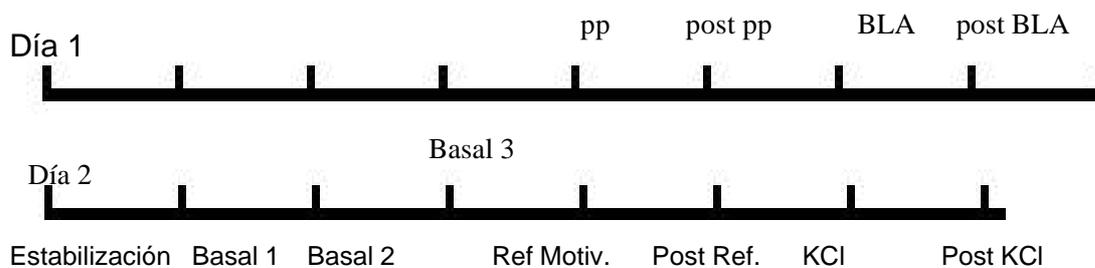


Fig. 15 Representa la secuencia de manipulaciones realizadas en los dos días y las respectivas recolecciones de muestras. Se tomaron muestras en cada manipulación. pp: EAFR de la vía perforante; post. pp: muestra tomada después de la estimulación pp; BLA: estimulación de la amígdala basolateral; post BLA, muestra tomada después de la estimulación BLA; Ref Motiv.: muestra tomada después del acceso al agua; KCL: muestra tomada bajo perfusión potasio en alta concentración; post. KCl, muestra tomada después de la de KCl.

En el segundo día se tomaron dos muestras de los mismos animales en condiciones basales, después de una hora de estabilización. A continuación se les permitió beber agua después de una abstinencia de 24 h y se recogió una muestra (Ref. Motiv). Posteriormente, se tomó otra muestra. Finalmente se perfundió líquido cefalorraquídeo artificial con una concentración elevada de cloruro de potasio y se recogieron dos muestras una en condiciones de alto potasio (KCl) y otra en condiciones basales (Post KCl). El tiempo de recogida de cada una de las muestras del experimento fue de 45 minutos.

Se utilizaron entre 11 y 12 animales jóvenes, y 7 animales viejos.

## RESULTADOS

### Experimento I. Participación de la amígdala basolateral en el reforzamiento motivacional de la E-LTP

#### *La transmisión sináptica fue estable en condiciones basales*

La amplitud de la espiga poblacional expresada en valores porcentuales, respecto a los valores basales –los doce primeros registros (% PSA), fue estable y no se modificó durante este período. Esto significa que la transmisión sináptica basal no tuvo modificaciones circadianas (Fig. 16). La comparación mediante la prueba *t* de Student para muestras pareadas mostró (Tabla I) que no hay diferencias significativas entre el promedio de los registros basales y cada uno de los registros realizados a lo largo de las seis horas ( $P > 0.05$ ).

#### *El EAFR indujo una E-LTP que se mantuvo hasta las cuatro horas*

Nuestros objetivos estaban encaminados a estudiar la modulación de las fases tempranas de la LTP, por lo que debíamos obtener un incremento en la eficacia que tuviera una duración inferior a las 4 horas. El EAFR escogido por nosotros (3 trenes de 15 pulsos a 200 Hz) satisfizo esta condición (Fig. 16). El EAFR, cuyo inicio está marcado en el gráfico con una saeta,

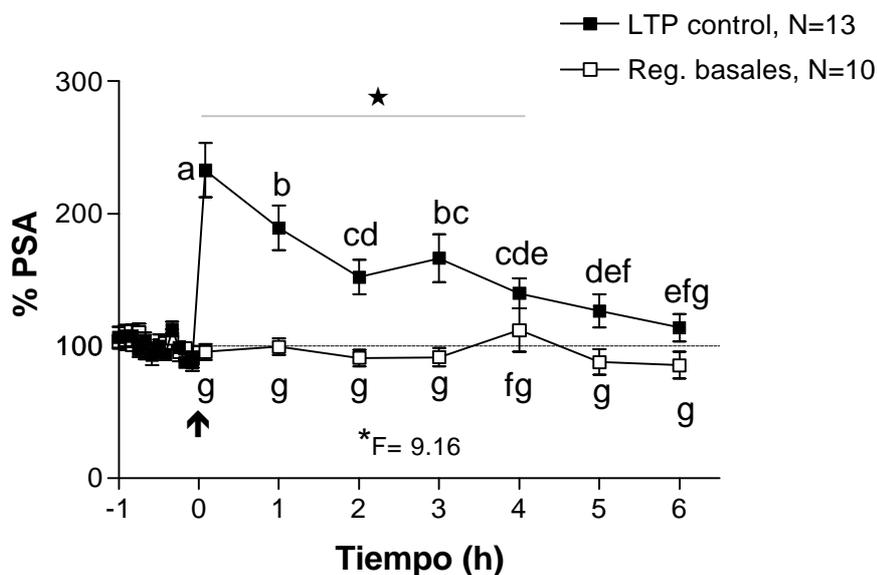


Fig. 16 Cambios en la transmisión sináptica, después de aplicar un EAFR débil capaz de inducir una E-LTP (LTP control) y en condiciones basales (Reg. basales). Los valores de la amplitud de la espiga poblacional están expresados en porcentaje respecto a los valores basales antes del EAFR (% PSA). La saeta indica el momento del EAFR, tiempo 0. La línea superior indica la duración de la E-LTP (*t*, de Student). Se muestra además el valor del estadístico F para la interacción grupo/tiempo (ANOVA de dos factores y mediciones repetidas) y las letras corresponden a los resultados de la prueba de Duncan.

incrementa el valor de la amplitud de la espiga poblacional. Los valores entre el grupo estimulado con el EAFR y el que sólo recibió estímulos simples difieren significativamente [ANOVA de dos vías: grupo ( $P < 0.05$ ;  $*F = 18.14$ ) tiempo ( $P < 0.05$ ;  $*F = 10.67$ ) como factores] con mediciones repetidas]. La interacción de los dos factores también mostró diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ,  $*F = 9.16$ ) La prueba de rangos múltiples de Duncan muestra que el EAFR modifica sustancialmente la transmisión sináptica y que esta lentamente regresa a los valores basales. También confirma que cuando no se aplica el EAFR la transmisión sináptica se mantiene estable todo el tiempo.

Para conocer la duración de la E-LTP aplicamos la prueba  $t$  de Student para muestras pareadas, que comparó la media de los registros antes del EAFR con los realizados después. La prueba mostró que la LTP control se extendió por un período de 4 horas, lo cual indica que se trata de una E-LTP (Tabla. I).

Tabla. I Resultados de la prueba  $t$  de Student al comparar los valores de PSA en condiciones basales y después del EAFR (LTP control). Se muestran los valores del estadígrafo  $t$ . Los números en negritas indican diferencia estadísticamente significativa ( $*P < 0.05$ ).

Grupos	5min	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h
Basales	1.32	.386	1.25	.865	-.086	.975	1.25
LTP control	<b>-3.90</b>	<b>-3.68</b>	<b>-2.62</b>	<b>-2.69</b>	<b>-2.54</b>	-2.13	-1.33

El estudio para conocer la posible participación de la amígdala basolateral en el reforzamiento motivacional de la E-LTP, siguió dos alternativas, la desconexión temporal mediante un anestésico local (lidocaína) y la desconexión permanente a través de una lesión.

#### *La lidocaína no afectó la transmisión sináptica basal*

La lidocaína inyectada en la amígdala basolateral no modifica por sí sola la transmisión sináptica basal de la población de neuronas del giro dentado estudiada (Fig. 17) ( $t$  de Student). Puede observarse que la transmisión sináptica en condiciones basales se mantuvo estable hasta las 6 h de registros, con valores de PSA similares a los obtenidos antes de inyectar la lidocaína en la amígdala basolateral. Es, decir no se produjeron ni aumentos ni disminuciones en la magnitud de la transmisión. Por lo que se puede concluir que la desactivación temporal de la amígdala no modifica ni a corto ni a largo plazo –en el periodo estudiado– la transmisión sináptica basal en el giro dentado del hipocampo.

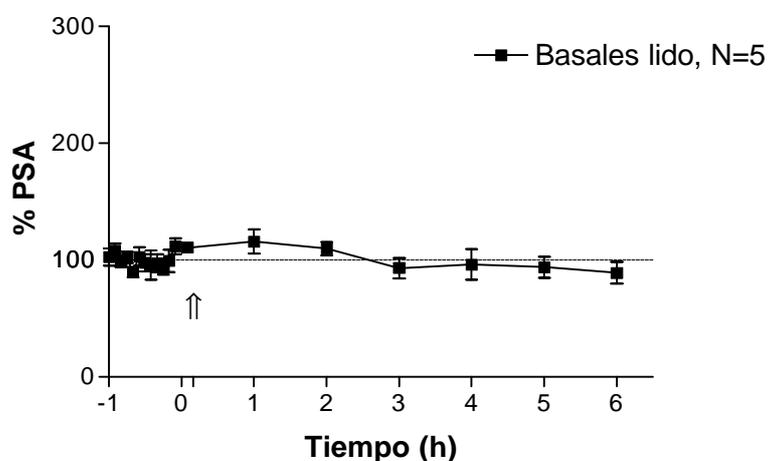


Fig. 17 Efecto de la lidocaína sobre la transmisión sináptica en condiciones basales ( $t$  de Student,  $P > 0.05$ ). Los valores de la amplitud de la espiga poblacional están expresados en porcentaje respecto a los valores basales antes de la administración de lidocaína (% PSA). La saeta indica el momento en que se aplicó la inyección de lidocaína.

#### *El estímulo motivacional prolongó la E-LTP más allá de las 4 horas*

El estímulo motivacional empleado por nosotros –beber después de 24 h privados de agua– fue capaz de reforzar la E-LTP, convirtiéndola en una L-LTP (Fig. 18). La comparación entre los grupos de animales que recibieron el estímulo emocional/motivacional y los de la LTP control confirma que tal maniobra es capaz de desencadenar eventos que extienden el cambio plástico más allá de las 4 horas (ANOVA de dos vías con mediciones repetidas,  $*P < 0.05$ ,  $F = 5.93$  para el factor grupo). El factor tiempo y la interacción del factor grupo y el factor tiempo, mostraron diferencias estadísticas ( $*P < 0.05$ ,  $F = 15.66$  de la interacción). La prueba de rangos múltiples de Duncan realizada a la interacción mostró que los grupos son estadísticamente diferentes a partir de las 2 horas. Además, se aprecia que los valores de potenciación en el grupo reforzado se mantuvieron estables, al mismo nivel, a partir de las dos horas; y que incluso a las tres horas se produce un incremento en la potenciación que es similar a la máxima a los 5 min. En cambio, en el grupo control la potenciación se va reduciendo paulatinamente.

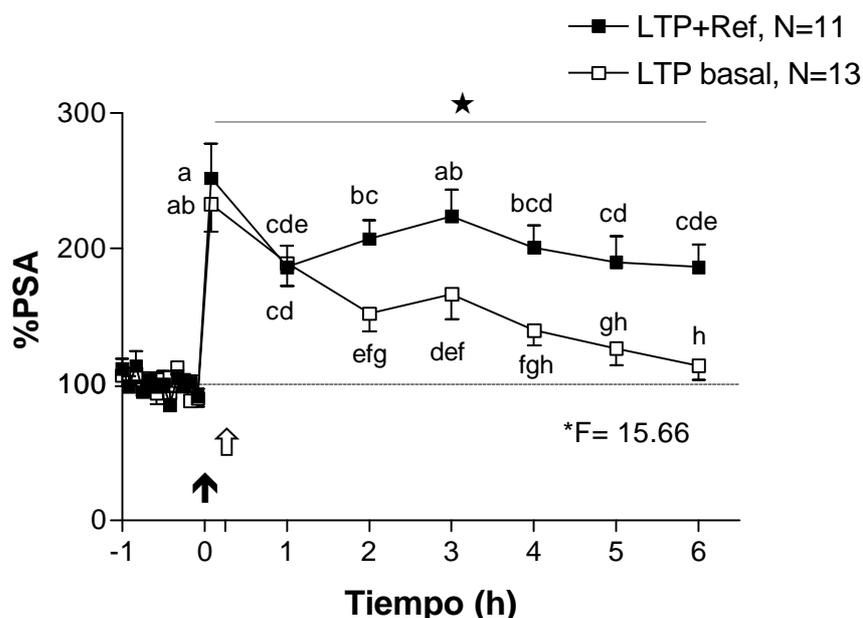


Fig. 2 Cambios en la transmisión sináptica expresado como porcentaje de la amplitud de la espiga poblacional respecto a los valores basales antes del EAFR (% PSA) en los grupos de LTP control (LTP basal) y LTP con reforzamiento motivacional (LTP+Ref). La línea superior con la estrella encima, indica la duración de la LTP en un grupo de animales estimulados motivacionalmente ( $P < 0.05$ ,  $t$  de Student). Se muestra el estadígrafo  $*F$  de la comparación grupos/tiempo y las letras corresponden a los resultados de la prueba de Duncan para la interacción (ANOVA de dos vías con mediciones repetidas,  $*P < 0.05$ ). La saeta negra indica el momento del EAFR, la blanca el instante en que se le suministro agua, 15 minutos después del EAFR.

La comparación de los registros basales con los registros después del EAFR evidenció diferencias estadísticamente significativas hasta las seis horas ( $t$  de Student,  $P < 0.05$ ) en los animales con reforzamiento (Tabla. II).

Tabla. II Resultados de la prueba  $t$  de Student ( $P < 0.05$ ) al comparar los valores de PSA antes y después del EAFR en los animales jóvenes a los que se les permitió beber agua después de 24 horas de abstinencia (valores de  $t$ ). Los números en negritas indican diferencia estadísticamente significativa ( $*P < 0.05$ ).

	5 min	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6
$t$	<b>-5.69</b>	<b>-4.97</b>	<b>-5.52</b>	<b>-5.15</b>	<b>-5.16</b>	<b>-4.23</b>	<b>4.40</b>

El estudio histológico confirmó que tanto las cánulas de inyección, como el electrodo de lesión se hallaban dirigidos hacia la amígdala basolateral.

*La lesión electrolítica de la amígdala fue efectiva para dañar esta estructura*

La aplicación de la corriente catódica produjo lesión del área amigdalar incluyendo la región basolateral de la amígdala. En la figura 19 se puede apreciar el área afectada por la lesión.



Fig. 19 Fotografía representativa de un corte coronal (bregma  $-2.80$ ) del hemisferio derecho del cerebro de una rata, donde se puede apreciar que la región basolateral de la amígdala fue dañada por la lesión electrolítica. Tinción de violeta de cresilo (5x).

*La inactivación de la amígdala basolateral no afectó la E-LTP*

Las desconexiones, tanto temporal (inyección de lidocaína) como permanente (lesión electrolítica) de la amígdala basolateral no modificaron sustancialmente la E-LTP. La comparación entre grupos demuestra que no hay diferencias estadísticas entre ellos. Los valores de la amplitud de la espiga poblacional se mantuvieron de modo similar en los tres grupos, como demostró el ANOVA de dos vías con mediciones repetidas (Fig. 20). No hay diferencias estadísticas entre los grupos ( $P > 0.05$ ,  $F = 0.53$ ), ni en la interacción de los factores grupo y tiempo; pero sí para el factor tiempo ( $*F = 30.95$ ). Debe notarse que estas diferencias se deben al curso temporal de la potenciación sináptica inducida; inicialmente es relativamente alta pero paulatinamente regresa a los valores basales.

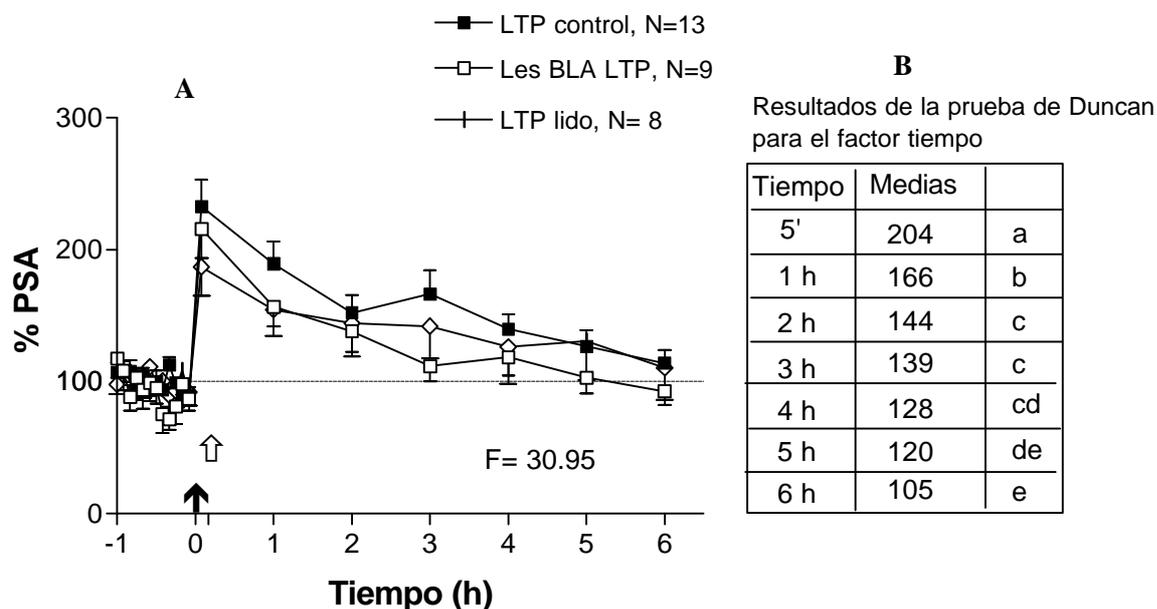


Fig. 20 A, Efecto de la lidocaína (LTP lido), la lesión de la amígdala basolateral sobre la LTP control (Les BLA LTP) y la LTP control (LTP basal). Los valores de la amplitud de la espiga poblacional están expresados en porcentaje respecto a los valores basales antes del EAFR (% PSA). Aparecen el valor del estadígrafo F de las comparaciones entre tiempo, mediante un ANOVA de dos vías con mediciones repetidas ( $P < 0.05$ ) y el resultado (medias de cada tiempo) de la prueba de Duncan para el factor tiempo (B). La saeta en negro indica el momento del EAFR, la saeta blanca el tiempo en que se inyectó la lidocaína en la amígdala basolateral, a los 10 minutos después del EAFR.

#### *La inactivación temporal de la amígdala abolió el reforzamiento motivacional de la E-LTP*

El estímulo con significado emocional/motivacional en animales a los que se les desconectó temporalmente la amígdala basolateral no produjo el reforzamiento de la E-LTP mientras que en los animales a los que se les inyectó NaCl 0.9%, la E-LTP se convirtió en una L-LTP (Fig. 21). El análisis de varianza de clasificación doble probó que hay diferencias debidas al factor grupo, al tiempo y a la interacción entre ambos ( $*P < 0.05$ ,  $F = 3.09$  de la interacción). La prueba *post hoc* de rangos múltiples de Duncan para la interacción grupo-tiempo mostró que hay diferencias estadísticamente significativas en todos los registros entre grupos, excepto a los 5 min después del EAFR y que el nivel de potenciación se mantuvo estable durante las 6 h.

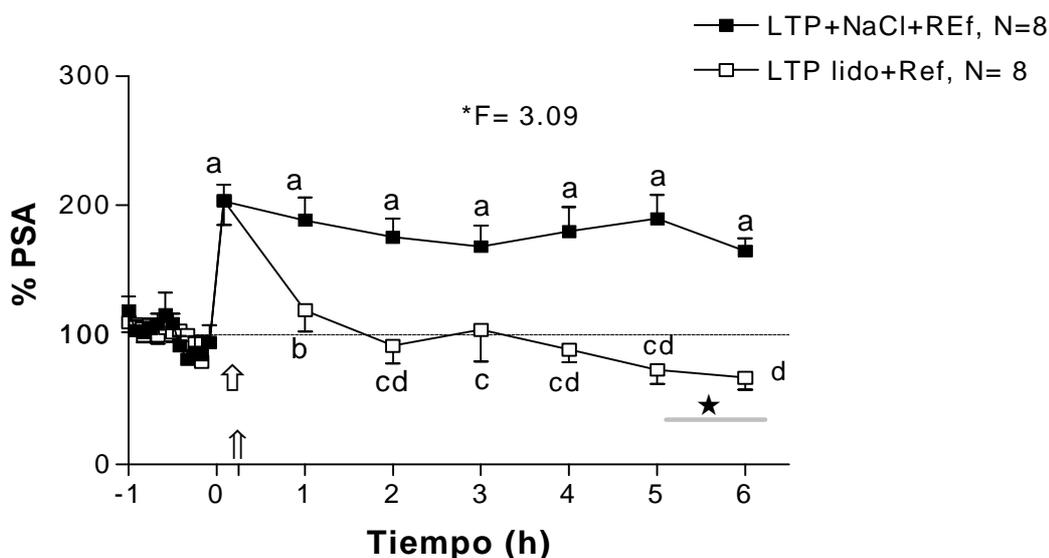


Fig. 21 Efecto de la lidocaína sobre el reforzamiento motivacional de la LTP. Los valores de la amplitud de la espiga poblacional están expresados en porcentaje respecto a los valores basales antes del EAFR (% PSA). Se presentan el valor del estadígrafo F de las comparaciones entre la interacción grupo/tiempo, mediante un ANOVA de dos vías con mediciones repetidas ( $P < 0.05$ ) y las letras corresponden a los resultados de la prueba de Duncan para la interacción. La línea gris con la estrella encima destaca diferencias estadísticamente significativas entre los valores basales y los posteriores al EAFR ( $t$  de Student). La saeta abierta indica el momento en el cual accedieron al agua los animales privados, la saeta blanca el de la inyección de lidocaína (o NaCl) en la amígdala basolateral, a los 10 min después del EAFR.

En cambio, la lidocaína inyectada en la amígdala basolateral no solo impidió el reforzamiento de la E-LTP, sino que afectó su duración. La transmisión retornó a la línea base rápidamente. La comparación de los registros basales con los realizados después del EAFR lo confirma. Una hora después del EAFR la transmisión regresó a los niveles basales ( $t$  de Student,  $*P < 0.05$ ), y luego decayó rápidamente y a partir de las 4 horas se produce una depresión en la transmisión sináptica. La depresión se mantiene hasta las 6 horas (Tabla. III).

Tabla. III Resultados de la prueba  $t$  de Student ( $P < 0.05$ ) al comparar los valores PSA antes y después del EAFR en los grupos con reforzamiento motivacional (valores de  $t$ ). Los números en negritas indican diferencia estadísticamente significativas ( $*P < 0.05$ ).

Grupos	5 min	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h
LTP+NaCl+Ref	-8.19	-5.01	-5.30	-4.23	-4.28	-4.90	-6.59
LTP lido+Ref	-4.69	-1.17	.625	-.165	1.19	2.39	3.48

El hecho de que la inyección de NaCl al 0.9 % no haya afectado el reforzamiento motivacional de la E-LTP, demuestra que el efecto observado en el grupo que recibió lidocaína se debe a

esta sustancia y no a un efecto del vehículo, mecánico o de otra naturaleza. Este resultado prueba que la amígdala participa en el reforzamiento motivacional.

*La lesión de la amígdala basolateral también abolió el reforzamiento motivacional de la E-LTP*

Los resultados con la desconexión permanente de la amígdala muestran un patrón similar a los obtenidos por la desconexión temporal (Fig. 22). La transmisión sináptica, medida como función

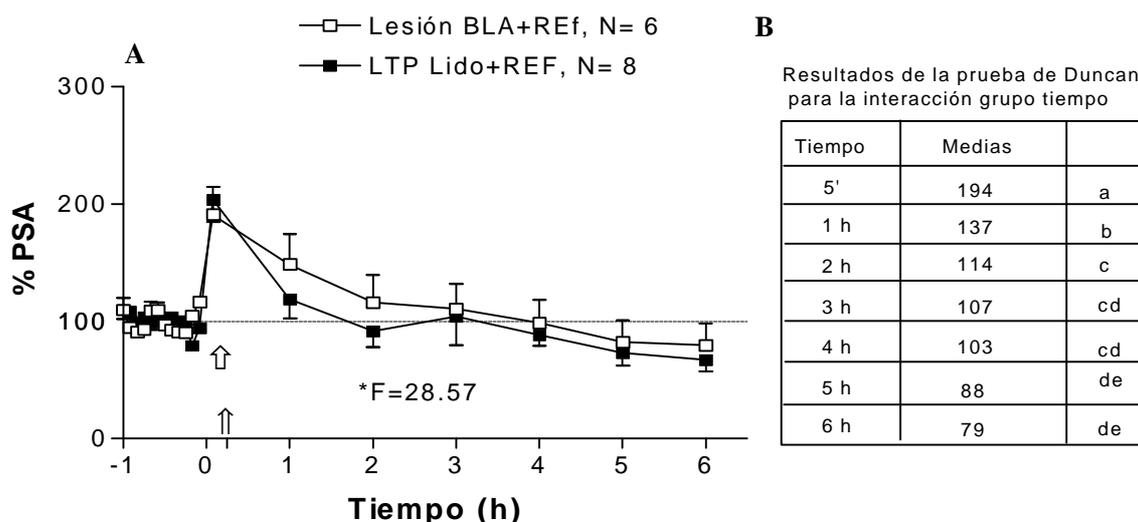


Fig. 22 A, Efecto de la lidocaína (LTP Lido+REF) y la lesión previa de la amígdala basolateral sobre el reforzamiento motivacional de la LTP control (Lesión BLA+REf). Los valores de la amplitud de la espiga poblacional están expresados en porcentaje respecto a los valores basales antes del EAFR (% PSA). Se presentan el valor del estadígrafo F del factor tiempo, mediante un ANOVA de dos vías con mediciones repetidas ( $P < 0.05$ ) y los resultados (medias de cada tiempo) del Duncan para este factor (B). La saeta abierta indica el momento en el cual accedieron al agua los animales privados, la saeta blanca el de la inyección de lidocaína en la amígdala basolateral, a los 10 minutos después del EAFR.

de la espiga poblacional, es similar en los grupos durante todo el tiempo que se estudió el fenómeno (ANOVA de dos vías con mediciones repetidas,  $P > 0.05$ ,  $F = 0.11$ ). El factor tiempo muestra diferencias ( $P < 0.05$ ,  $F = 28.57$ ) pero no hay interacción entre ambos factores.

temporal de la LTP y no a diferencias entre grupos en el tiempo. No hay interacción entre los factores analizados ( $P > 0.05$ ,  $F = 1.32$ ). Esto significa que tampoco se produjo la prolongación de la E-LTP, es decir la lesión de la amígdala basolateral abolió el reforzamiento de la E-LTP que se produce por efecto de estímulos motivacionales con significación emocional/motivacional del mismo modo que la lidocaína. Estos hallazgos, tanto con la desconexión temporal como la permanente de la amígdala basolateral, demuestran que tal estructura forma parte del sistema que subyace en el reforzamiento motivacional que se manifiesta en los animales jóvenes sanos.

## Experimento II. Participación de la síntesis de nuevas proteínas en el reforzamiento motivacional de la E-LTP

La síntesis de nuevas proteínas es un requisito para que una LTP se extienda más allá de las cuatro horas. Nosotros estudiamos si la inyección de anisomicina, un inhibidor de la síntesis de proteínas, en el ventrículo lateral derecho, afectó el reforzamiento motivacional. El estudio histológico confirmó la posición correcta de las cánulas en dirección al ventrículo lateral derecho (Fig. 23).

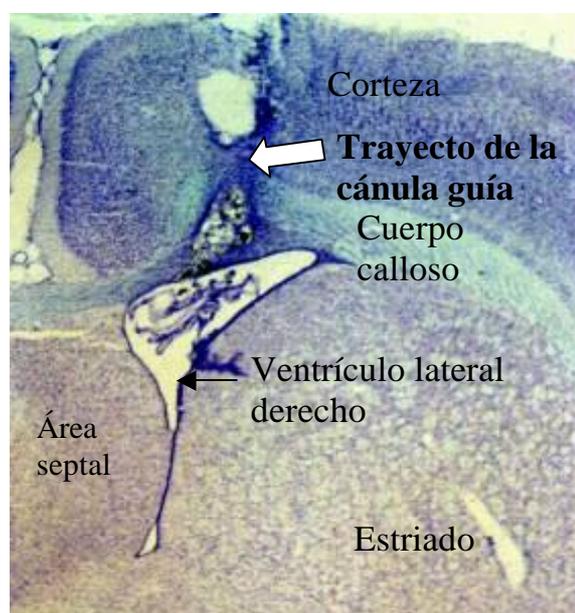


Fig. 23 Fotografía representativa de un corte coronal (bregma  $-0.30$ ) del hemisferio derecho del cerebro de una ratona a la que se colocó una cánula de inyección en el ventrículo lateral derecho. Tinción con violeta de cresilo (5x).

### *La anisomicina no afecta la transmisión basal*

La inyección de anisomicina en el ventrículo lateral derecho no modificó sustancialmente la transmisión sináptica basal (Fig. 24). La comparación con el grupo al que se inyectó NaCl al 9% probó que ambos grupos son semejantes estadísticamente (ANOVA de dos vías con mediciones repetida,  $P > 0.05$ ,  $F = .125$ ). El factor tiempo ( $P > 0.05$ ,  $F = 0.73$ ), ni la interacción determinaron variaciones ( $P > 0.05$ ,  $F = 0.75$ ). De modo que cualquier alteración que observemos en el grupo al que se le suministró agua después de 24 horas sin beber y se le inyectó anisomicina debe ser atribuido a su efecto sobre las síntesis de proteínas y no a efectos inespecíficos de cualquier otra naturaleza.

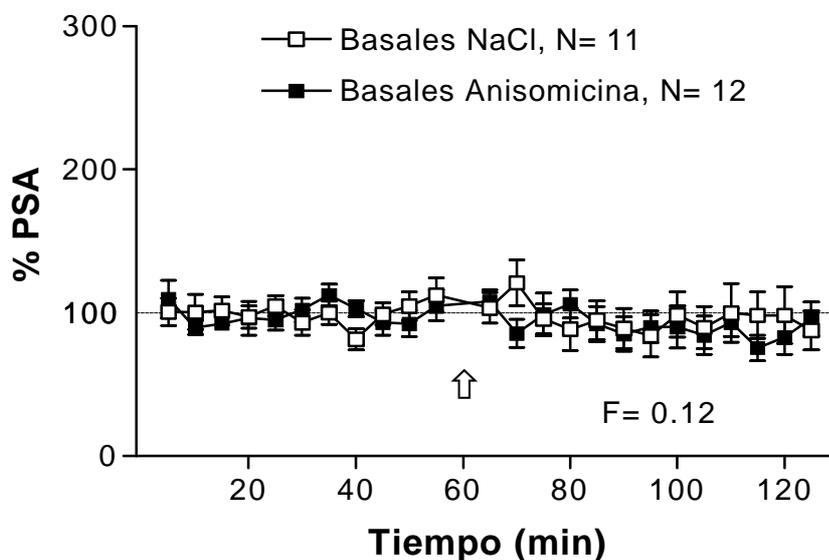


Fig. 24 Efecto de la inyección de NaCl 0.9 % (Basales NaCl) anisomicina en el ventrículo lateral derecho sobre la transmisión basal en la población sináptica de giro dentado estudiada (Basales Anisomicina). Los valores de la amplitud de la espiga poblacional están expresados en porcentaje respecto a los valores basales antes de la inyección (% PSA). Aparece el valor del estadígrafo F resultado de la comparación entre ambos grupos (ANOVA de dos vías de mediciones repetidas,  $P > 0.05$ ). La saeta indica en momento de la inyección.

#### *La anisomicina bloqueó el efecto reforzador motivacional de la E-LTP*

La anisomicina inyectada en el ventrículo derecho impidió que la E-LTP se convirtiera en una L-LTP por reforzamiento motivacional (Fig. 25). Los niveles de potenciación del grupo de animales a los que se les inyectó anisomicina fueron similares a los de aquellos a quienes se les puso NaCl al 0.9 % hasta las 3 horas después del EAFR (ANOVA de dos vías con mediciones repetidas,  $P > 0.05$ ,  $F = 0.20$ ). Esto corresponde al período de la LTP temprana. Sin embargo, ya a las 4 horas y en adelante los grupos tuvieron un comportamiento distinto. Al comparar los registros a partir de las 3 horas, se aprecian diferencias estadísticamente significativas en el factor grupo (ANOVA de dos vías con mediciones repetidas,  $*P < 0.05$ ,  $F = 6.03$ ), pero no debidas al factor tiempo ( $F = 0.77$ ), ni a la interacción de ambos factores ( $F = 0.53$ ). Estos registros corresponden a la LTP tardía.

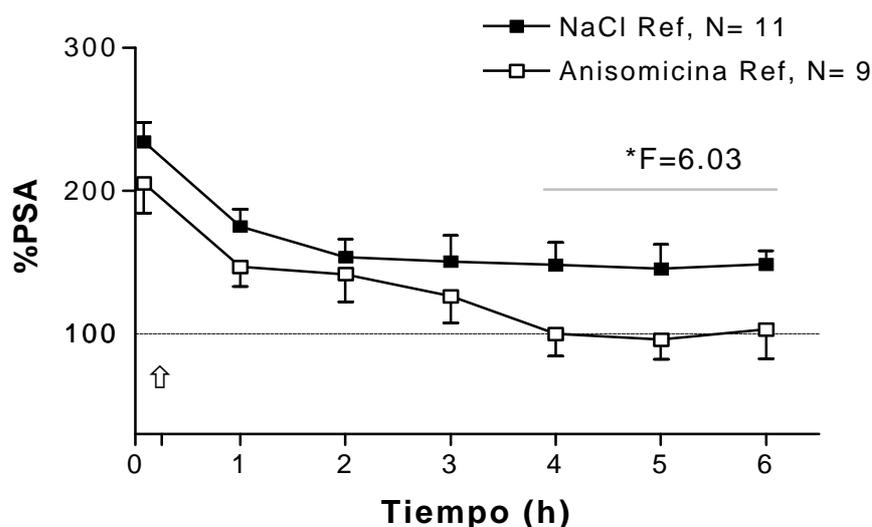


Fig. 25 Efecto de la anisomicina sobre el reforzamiento motivacional (Anisomicina Ref). NaCl Ref, grupo control al que se le inyectó NaCl 0.9 %. Los valores de la amplitud de la espiga poblacional están expresados en porcentaje respecto a los valores basales antes del EAFR (% PSA). Se presentan el valor del estadígrafo F de las comparaciones entre grupo, mediante un ANOVA de dos vías con mediciones repetidas desde las 4-6 horas (\* $P < 0.05$ ). La saeta marca el tiempo en que bebieron agua.

En el grupo control, al que se le inyectó NaCl 0.9 %, el nivel de potenciación se mantuvo hasta las 6 horas (Tabla IV).

Tabla. IV Resultados de la prueba *t* de Student ( $P < 0.05$ ) al comparar los valores de PSA de los controles tratados solo con Na Cl antes y después del EAFR y el reforzamiento motivacional (valores de  $\bar{t}$ ). Los números en negritas indican diferencia estadísticamente significativas (\* $P < 0.05$ ).

Grupo	5 min	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h
NaCl+LTP+Ref		<b>-10.10</b>	<b>-6.36</b>	<b>-4.39</b>	<b>-2.81</b>	<b>-3.14</b>	<b>-2.72</b>

Estos datos responden afirmativamente nuestra predicción de que el reforzamiento motivacional induce, de alguna manera, la síntesis de nuevas proteínas, que es una condición necesaria para la prolongación de una E-LTP en una L-LTP, es decir para que la potenciación sináptica se extienda más allá de las cuatro horas.

### Experimento III. Efecto de norepinefrina y oxotremorina (agonista colinérgicos muscarínicos) sobre la E-LTP

El siguiente paso en nuestra investigación fue indagar sobre los posibles mecanismos involucrados en el reforzamiento motivacional de la E-LTP, el cual es dependiente de la síntesis de nuevas proteínas. Investigamos el efecto de la norepinefrina y la oxotremorina sobre E-LTP.

### La oxotremorina no afectó la transmisión sináptica basal

La dosis de oxotremorina utilizada para observar los posibles efectos de la inyección de esta sustancia sobre la transmisión sináptica basal fue 25 nmol/L (Fig. 26A). También se estudió el efecto del NaCl al 0.9 %, medio en el que se disolvió la oxotremorina y que se utilizó como control de la inyección (Fig. 26A). Ninguno de estos procedimientos modificó la transmisión sináptica (ANOVA de dos vías con mediciones repetidas, factor grupo  $P > 0.05$ ,  $F = 0.26$ ; factor tiempo  $P > 0.05$ ,  $F = 1.12$ ; interacción,  $F = 0.91$ ).

### La norepinefrina afectó tardíamente la transmisión basal

En cuanto a la norepinefrina, cuya dosis fue de 5 nmol/L para este estudio, el resultado fue diferente (Fig. 26B). Si bien, el ANOVA no encontró diferencias significativas entre los grupos control (sin inyectar sustancia) y los tratados con vehículo (ANOVA de dos vías con mediciones repetidas,  $P > 0.05$ ,  $F = 0.58$ ), en los animales tratados con norepinefrina se observa una reducción ligera pero significativa del valor de la PSA lo que indica una depresión sináptica tardía. En este caso el factor tiempo evidenció diferencias ( $*P < 0.05$ ,  $F = 3.84$ ). Para conocer en qué tiempos y qué grupos diferían se aplicó la prueba de Duncan, la cual mostró fluctuaciones

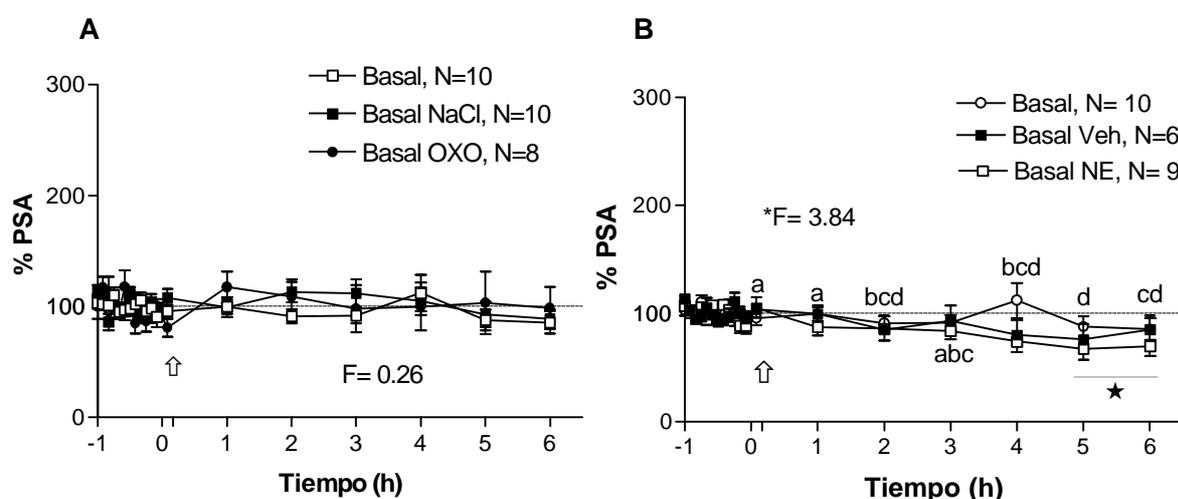


Fig. 26 Efecto de la oxotremorina y la norepinefrina, así como de los medios en las que se disolvieron, sobre la transmisión sináptica basal. Los valores de la amplitud de la espiga poblacional están expresados en porcentaje respecto a los valores basales antes de la administración de las sustancias (% PSA). A, oxotremorina (25 nmol/L); B, norepinefrina (5 nmol/L). Aparecen los valores del estadígrafo F correspondientes a las comparaciones realizadas entre grupos y tiempo respectivamente (ANOVA de dos vías con mediciones repetidas,  $P > 0.05$ ). El asterisco indica diferencias significativas entre los valores antes y después de la administración de norepinefrina ( $P < 0.05$ ,  $t$  de Student). Las letras corresponden al resultado de la prueba de Duncan para el factor tiempo. Las saetas indican el instante en el que se aplicaron las sustancias.

en el factor tiempo. La comparación entre los valores de % PSA antes y después de aplicar la

norepinefrina mostró que hay una reducción ligera pero significativa en la transmisión basal, esto es, una depresión en la transmisión sináptica ( $P < 0.05$ ,  $t$  de Student). Este es un fenómeno opuesto a la potenciación sináptica.

#### Los medios de disolución no afectaron la E-LTP

Ninguno de los dos medios de disolución empleados modificaron sustancialmente la E-LTP (Fig. 27). El ANOVA de dos vías con mediciones repetidas mostró que el factor grupo no introdujo

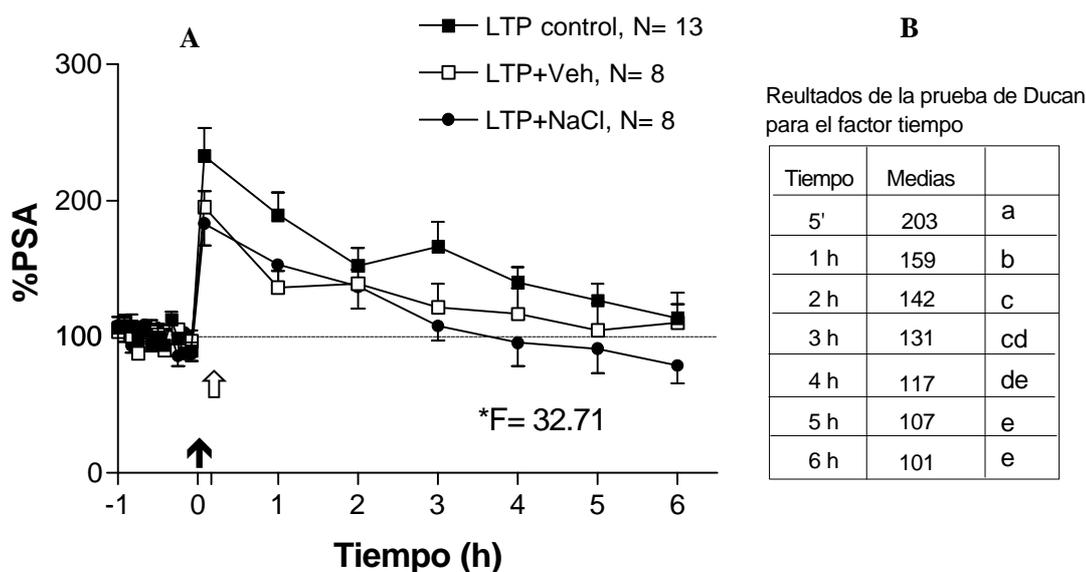


Fig. 27 **A**, Efecto de los medios de disolución sobre la E-LTP. Los valores de la amplitud de la espiga poblacional están expresados en porcentaje respecto a los valores basales antes del EAFR. Se muestra también el valor del estadígrafo F resultado de un ANOVA de dos vías con mediciones repetidas ( $P > 0.05$ ), al comparar los tiempos. **B**, Aparecen, a la derecha, los resultados de la prueba de Duncan para el factor tiempo (medias de cada tiempo en orden sucesivo). La saeta negra indica el momento del EAFR de la vía perforante y la saeta blanca el instante en que se aplicaron las sustancias.

diferencias ( $P > 0.05$ ,  $F = 2.39$ ), ni hay interacción entre el factor grupo y el factor tiempo. Como era de esperar el factor tiempo fue estadísticamente significativo ( $*F = 32.71$ ).

#### La oxotremorina no prolongó la E-LTP más allá de las 4 horas

Las diferentes dosis de oxotremorina aplicadas en el ventrículo derecho 10 minutos después de inducida la LTP no tuvieron efectos reforzadores (Fig. 28). Ninguno de los grupos a los que se inyectó oxotremorina difieren estadísticamente del grupo control al que se le administró NaCl (ANOVA de clasificación doble con mediciones repetidas,  $P > 0.05$ ,  $F = 2.02$ ). El análisis estadístico mostró diferencias en cuanto al factor tiempo ( $P < 0.05$ ,  $*F = 73.96$ ) e interacción entre ambos factores. ( $P < 0.05$ ,  $*F = 1.92$ ).

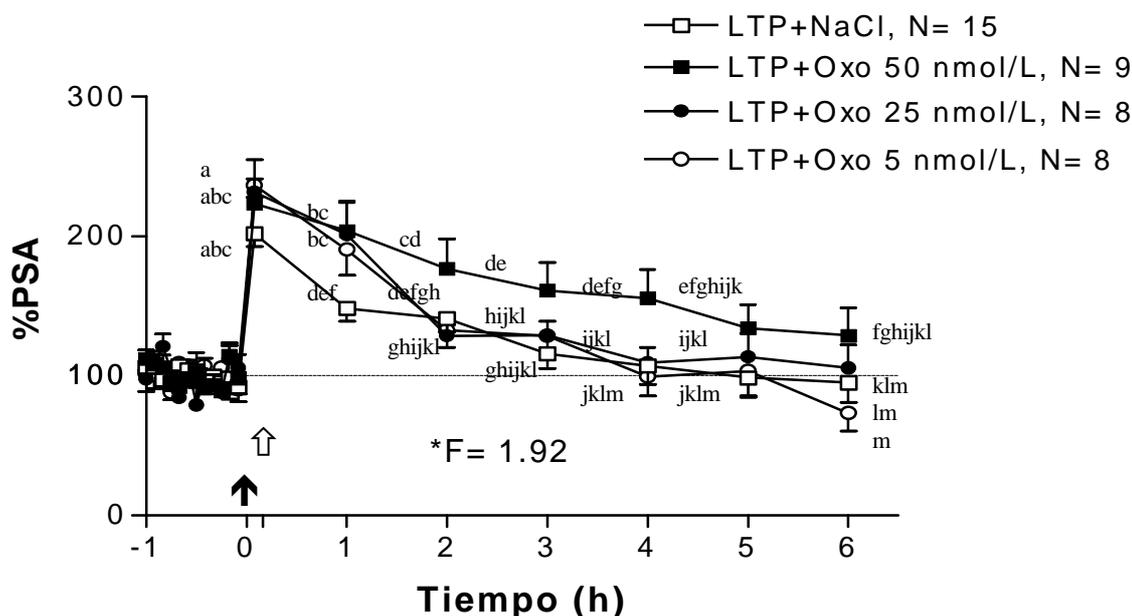


Fig. 28 Efecto de las diferentes dosis de oxotremorina (5, 25, 50 nanomoles) sobre la LTP. Los valores de la amplitud de la espiga poblacional están expresados en porcentaje respecto a los valores basales antes del EAFR. Se muestra también el valor del estadígrafo F resultado de un ANOVA de dos vías con mediciones repetidas,  $P > 0.05$  de la interacción grupo/tiempo, así como los resultados de la prueba de Duncan (letras). La saeta negra indica el momento del EAFR de la vía perforante y la saeta blanca el instante en que aplicaron las sustancias.

Los resultados de la prueba de Duncan para la interacción grupo/tiempo mostró que la dosis más elevada de oxotremorina difiere del resto a las 3 y 4 h; y que los niveles de potenciación en este grupo se mantienen muy similares hasta las 4 h. Además, el nivel de potenciación en los grupos de 25 y 5 nmol/L son muy similar entre sí a partir de las tres horas.

Por otra parte, debe notarse que con esta sustancia se insinúan posibles efectos dependientes de la dosis (Tabla.V). La comparación de los valores antes del EAFR con los realizados después, muestra que la dosis más baja, 5 nmol/L mantiene la LTP por 2 horas ( $t$  de Student,  $*P > 0.05$ ), lo cual incluso sugiere que acorta la duración de la E-LTP. Por otra parte, la dosis más alta, la de 50 nanomoles, sin llegar a convertir la LTP temprana en tardía, tiene un efecto diferente, el fenómeno permaneció hasta las 4 horas ( $t$  de Student,  $*P > 0.05$ ).

Tabla V. Resultados de la prueba  $t$  de Student ( $P < 0.05$ ) al comparar los valores de PSA antes y después del EAFR en los tres grupos tratados con diferentes dosis de oxotremorina (valores de  $t$ ). Los números en negritas indican diferencia estadísticamente significativas ( $*P < 0.05$ ).

Grupos	5 min	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h
Oxotremorina 5 nmol/L	-15.81	-4.86	-2.67	-2.17	.043	-.201	2.04
Oxotremorina 25 nmol/L	-7.83	-5.95	-2.05	-2.34	-.429	-.420	.269
Oxotremorina 50 nmol/L	-6.52	-5.79	-4.20	-3.75	-3.06	-2.01	-1.41

### La norepinefrina prolongó la E-LTP más allá de la 4 horas

La norepinefrina sí produjo efectos notables sobre la E-LTP; la prolongó y convirtió en una L-LTP (Fig. 29). La comparación estadística entre los grupos a los que se les suministró alguna dosis de norepinefrina y el grupo control, es decir animales tratados con vehículo, evidenció diferencias en el factor grupo (\* $P < 0.05$ ,  $F = 3.10$ ), el factor tiempo (\* $P < 0.05$ ,  $F = 9.36$ ), pero no hay interacción entre ambos factores (\* $P < 0.05$ ,  $F = 1.18$ ; ANOVA de dos vías con mediciones repetidas).

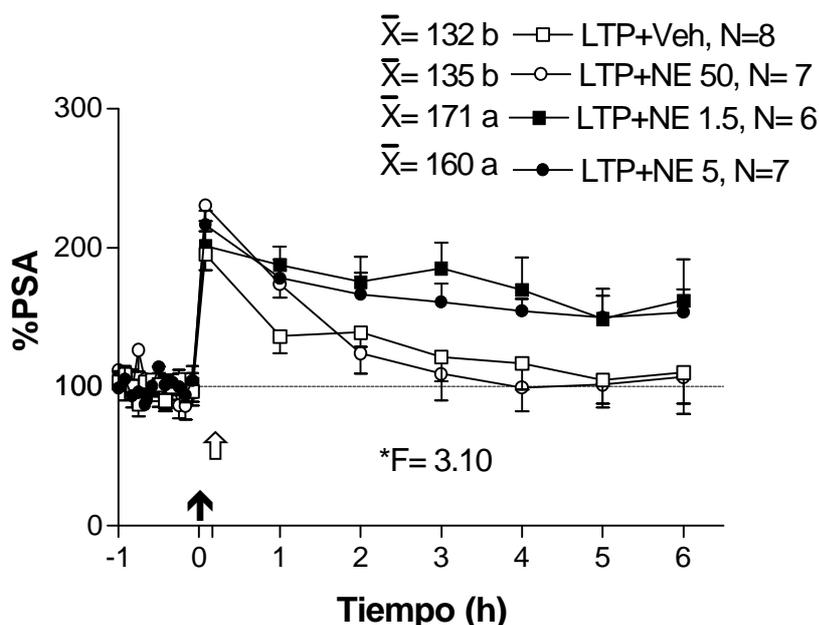


Fig. 29 Efecto de las diferentes dosis de norepinefrina (1.5, 5, 50 nmol/L) sobre la LTP. Los valores de la amplitud de la espiga poblacional están expresados en porcentaje respecto a los valores basales antes del EAFR (% PSA). Se muestra también el valor del estadígrafo F resultado de un ANOVA de dos vías con mediciones repetidas,  $P < 0.05$  al comparar los grupos. Las letras y las medias que aparecen en la leyenda indican el resultado de la prueba de Duncan para el factor grupo. La saeta negra indica el momento del EAFR de la vía perforante y la saeta blanca el instante en que aplicaron las sustancias.

La prueba *a posteriori* de rangos múltiples de Duncan para el factor tiempo mostró que los niveles de potenciación sináptica son inicialmente elevados y que se reducen en el tiempo ( $X_{5\text{min}} = 210.8$  a;  $X_{1\text{h}} = 169.0$  b;  $X_{2\text{h}} = 151.3$  c;  $X_{3\text{h}} = 144.3$  c;  $X_{4\text{h}} = 135.1$  cd;  $X_{5\text{h}} = 132.9$  d;  $X_{6\text{h}} = 126.4$  d). La acción de la norepinefrina es dependiente de la dosis. Las dosis bajas tuvieron efectos reforzadores sobre la E-LTP, en tanto que la dosis alta no. Más interesante aún, el grupo que fue tratado con la dosis de 5 nmol/L difiere del de 50 nmol/L en todos los registros a partir de las 2 h (Fig. 29).

Con el fin de conocer la duración del efecto reforzador de la norepinefrina sobre la LTP temprana, se comparó la media de los valores antes de inducir el fenómeno plástico con los obtenidos después, mediante la prueba *t* de Student (\**P* < 0.05). La dosis de 1.5 nmol/L, la más baja si bien no logra extender la E-LTP más allá de las cuatro horas, tampoco la afectó, pues su duración fue de 4 h (Tabla VI). En el caso de la dosis de 5 nmol/L la prolongó hasta las 6 h.

Tabla VI Resultados de la prueba *t* de Student (*P* < 0.05) al comparar los valores de PSA antes y después del EAFR en los tres grupos en los que se aplicaron las diferentes dosis de norepinefrina (valores de *t*). Los números en negritas indican diferencia estadísticamente significativas (\**P* < 0.05).

Grupos	5 min	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h
NE 1.5 nmol/L	<b>-9.48</b>	<b>6.64</b>	<b>-4.21</b>	<b>-4.67</b>	<b>-2.97</b>	-2.25	-2.10
NE 5 nmol/L	<b>-11.40</b>	<b>-5.73</b>	<b>-4.29</b>	<b>-4.71</b>	<b>-6.36</b>	<b>-3.22</b>	<b>-3.15</b>
NE 50 nmol/L	<b>-11.86</b>	<b>-7.52</b>	-1.65	-.494	.031	-.120	-.270

En cambio la dosis de 50 nmol/L, la más alta tuvo un efecto contrario, es decir, no solo no reforzó la LTP, sino que provocó que la transmisión regresara más rápidamente a la línea base. En este caso la LTP sólo se mantuvo hasta la hora.

Por último, comparamos los resultados del efecto de la dosis de 5 nmol/L, que fue la de mejor efecto, con el grupo que recibió el estímulo motivacional en el **Experimento I** (ver Fig. 18). Los grupos no difieren estadísticamente entre sí (ANOVA de dos vías con mediciones repetidas, *P* > 0.05, *F* = 1.36).

Todos estos datos confirman que la norepinefrina es capaz de reforzar una E-LTP, convirtiéndola en una L-LTP y que su efecto depende de la dosis.

#### Experimento IV.

Efecto del envejecimiento sobre el reforzamiento de la E-LTP por estimulación de la amígdala basolateral y por el estímulo emocional

El envejecimiento deteriora la plasticidad sináptica y la memoria. Un modo de acercarnos a estas consecuencias del envejecimiento es investigar los efectos de este factor sobre el reforzamiento motivacional y por su remedio, el reforzamiento de la E-LTP por estimulación de la amígdala basolateral. Precisamente, como el envejecimiento daña la memoria y la plasticidad sináptica, primeramente entrenamos a los animales viejos y jóvenes en la prueba de aprendizaje espacial conocida como laberinto acuático de Morris.

La Fig. 30 muestra el desempeño de los dos grupos de ratas viejas conformados justamente a partir de esta prueba y el de las ratas jóvenes, durante el entrenamiento. Puede apreciarse que

con el entrenamiento las ratas jóvenes y la viejas, que se consideraron sin déficit cognitivo encontraron la plataforma sumergida en menos tiempo, en tanto la latencia de escape de las ratas viejas con déficit en el aprendizaje se mantuvo alta durante todo el entrenamiento.

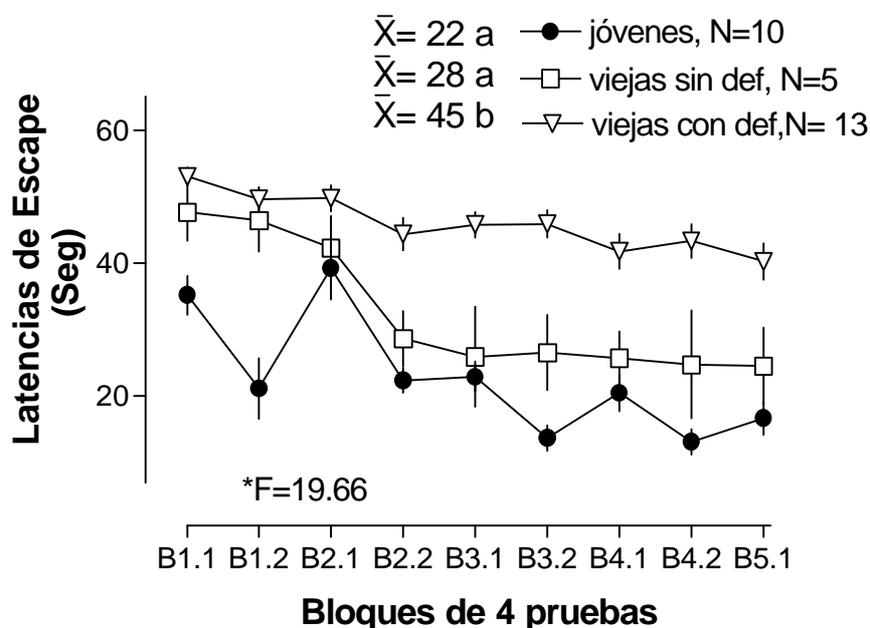


Fig. 30 Aprendizaje espacial en el laberinto acuático con la plataforma sumergida. Se muestra el estadígrafo F, resultado de un ANOVA de dos vías con mediciones repetidas,  $P < 0.05$  al comparar los grupos. Las letras que aparecen a la izquierda de la leyenda representan el resultado de la prueba de rangos múltiples de Duncan para el factor grupo.

El ANOVA de dos vías con mediciones repetidas realizado mostró que las muestras diferían estadísticamente en el factor grupo ( $*P < 0.05$ ,  $F = 59.29$ ). La prueba *post hoc* de rangos múltiples de Duncan evidenció que las ratas jóvenes y las viejas sin déficit cognitivo no diferían estadísticamente entre sí y ambas eran diferentes a los animales viejos con déficit cognitivo. Debe notarse que el análisis estadístico importante es el que se realiza para conformar los grupos a partir de los resultados en el entrenamiento y no los *post hoc*. Estos últimos se han realizado sólo para confirmar las notables diferencias entre los grupos como consecuencia de la selección.

### La E-LTP se afecta con el envejecimiento

La duración de la E-LTP en los animales viejos con déficit cognitivo está severamente reducida, en tanto en los animales viejos sin déficit es muy similar a los animales jóvenes. El análisis estadístico del estudio electrofisiológico para el factor grupo no mostró diferencias estadísticamente significativas (Fig. 31; ANOVA de dos vías, con mediciones repetidas,  $F=2.41$ ,  $P>0.05$ ). En tanto, el factor tiempo ( $F=28.05$ ) evidenció diferencias. La duración de la LTP se afectó con la edad, tanto en los animales con déficit como sin déficit cognitivo. En los animales sin déficit cognitivo la LTP se mantuvo por dos horas después de inducida ( $t$  de Student,  $*P<0.05$ ). En los animales con deterioro en el aprendizaje espacial la potenciación sináptica se mantuvo hasta por menos de 1 h ( $t$  de Student,  $*P<0.05$ ). En cuanto a los animales sin déficit, la LTP duró 2 h ( $t$  de Student,  $*P<0.05$ ).

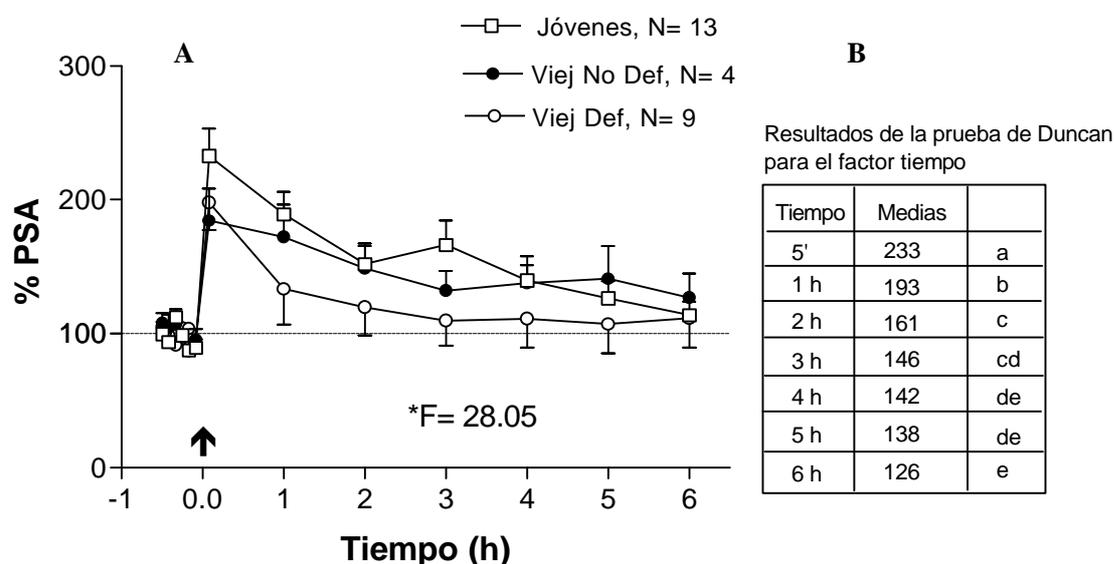


Fig. 31 A, Cambios en la transmisión sináptica después de inducir la LTP de los animales jóvenes (control), viejos sin y con déficit cognitivo. Los valores de la amplitud de la espiga poblacional están expresados en porcentaje respecto a los valores basales antes del EAFR (% PSA). Se muestra también el valor del estadígrafo F resultado de un ANOVA de dos vías con mediciones repetidas los tiempos,  $P<0.05$  y los resultados de la prueba de Duncan para este factor (B). La saeta negra indica el momento del EAFR de la vía perforante.

Tabla VII Resultados de la prueba *t* de Student ( $P < 0.05$ ) al comparar los valores de PSA antes y después del EAFR en los grupos de animales viejos (valores de *t*). Los números en negritas indican diferencia estadísticamente significativas ( $*P < 0.05$ ).

Grupos	5 min	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h
Viejas sin déficit	<b>-3.53</b>	<b>-3.68</b>	<b>-3.20</b>	-2.22	-1.87	-1.70	-1.50
Viejas con déficit	<b>-4.78</b>	-1.26	-.937	-.524	-.528	-.335	-.528

*La estimulación eléctrica de la amígdala basolateral convirtió una E-LTP en una L-LTP en los animales jóvenes*

La E-LTP en giro dentado puede ser prolongada en animales jóvenes si se estimula eléctricamente la amígdala basolateral quince minutos después de estimular la vía perforante (Fig. 32). El análisis de varianza de clasificación doble con mediciones repetidas, demuestra al comparar los grupos LTP control y LTP + BLA diferencias estadísticamente significativa para el factor grupo ( $*P < 0.05$ ,  $F = 4.40$ ). El factor tiempo ( $*P < 0.05$ ,  $F = 3.94$ ) y la interacción también

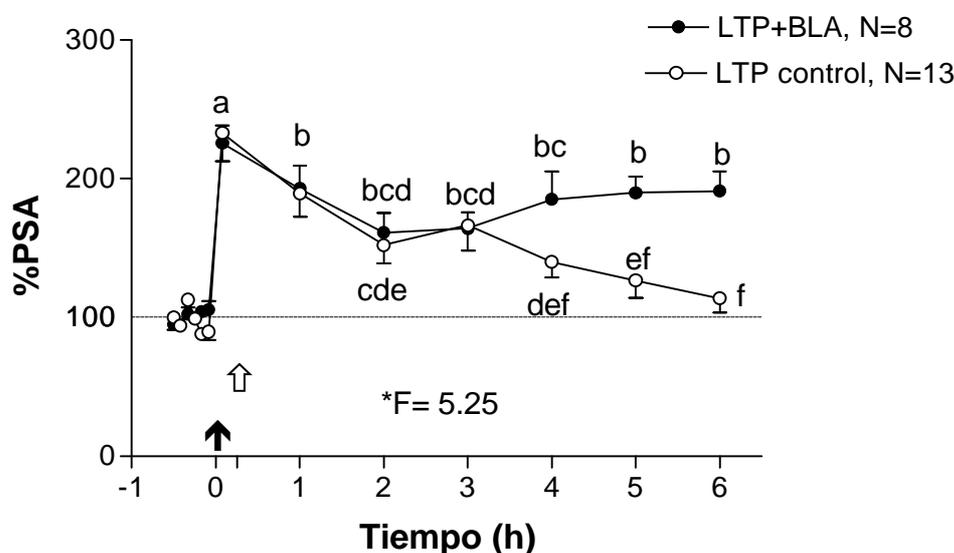


Fig. 32 Efecto de la estimulación eléctrica de alta frecuencia de la amígdala basolateral sobre el curso temporal de la LTP temprana. Los valores de la amplitud de la espiga poblacional están expresados en porcentaje respecto a los valores basales antes del EAFR (% PSA). Se muestra también el valor del estadígrafo *F* resultado de un ANOVA de dos vías con mediciones repetidas al comparar los tiempos,  $P < 0.05$  y los resultados de la prueba de Duncan para el factor tiempo (letras). La saeta negra indica el momento del EAFR la vía perforante, la blanca indica el de la estimulación de la amígdala basolateral.

mostraron diferencias ( $*P < 0.05$ ,  $F = 5.25$ ). Para conocer qué puntos diferían entre grupos se utilizó la prueba de rangos múltiples de Duncan para la interacción, la cual mostró que las

diferencias aparecen a partir del registro de las 4 horas y que el nivel de potenciación se mantuvo estable a partir de la hora de inducido el fenómeno. La potenciación sináptica duradera fue prolongada hasta las 6 horas por la estimulación de la amígdala basolateral (*t* de Student, \**P* < 0.05, Tabla VIII).

*En los animales envejecidos la estimulación de la amígdala no refuerza la E-LTP*

La estimulación eléctrica de la amígdala basolateral en las ratas viejas no produjo el efecto reforzador hallado en los animales jóvenes, es decir, no logró reforzar la LTP inducida por estimulación eléctrica de la vía perforante, más allá de las cuatro horas (Fig. 33A, Tabla VIII). La comparación de los resultados del grupo de ratas viejas sin déficit cognitivo cuando se estimuló la amígdala basolateral con la LTP control del mismo grupo, mostró que no existen diferencias entre ellos (ANOVA de clasificación doble con mediciones repetidas *P* > 0.05, *F* = 0.28). El factor tiempo y la interacción grupo/tiempo si mostraron diferencias estadísticamente significativas (\**F* = 3.82). La prueba de rangos múltiples de Duncan muestra que los niveles iniciales de la potenciación son similares en ambos grupos y que en el grupo que se estimulo la amígdala la transmisión fue estable a partir de la hora hasta las 6 h.

En los animales con déficit cognitivo tampoco hubo reforzamiento de la LTP por estimulación de la amígdala (Fig. 33B). El ANOVA de clasificación doble con mediciones repetidas, no mostró diferencias para el factor grupo (*P* > 0.05, *F* = 0.16), ni para la interacción grupo tiempo; pero sí para el factor tiempo (\**F* = 9.55).

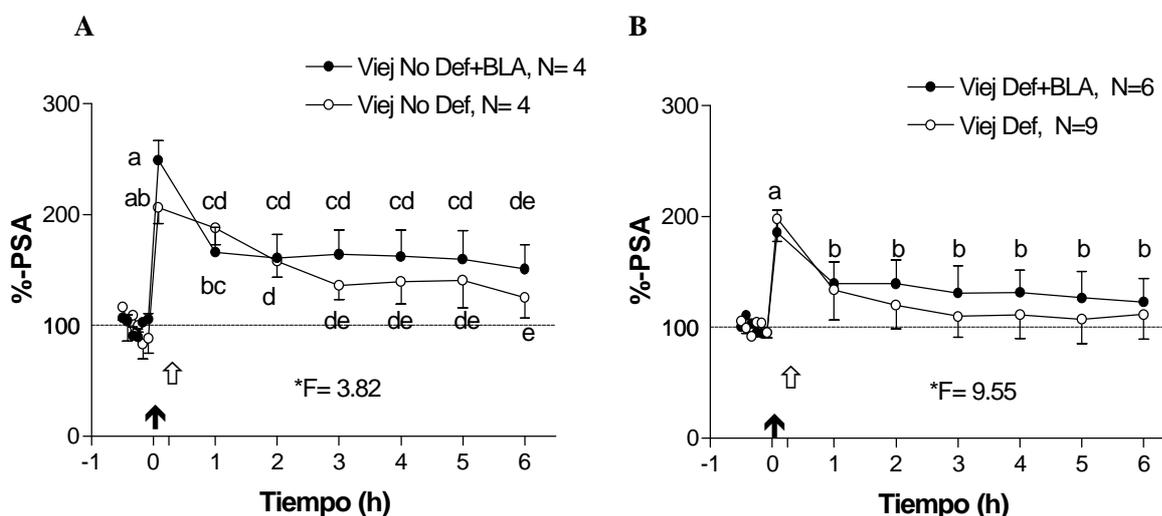


Fig. 33 Efecto de la estimulación de la amígdala basolateral sobre la LTP temprana inducida en el giro dentado del hipocampo. Los valores de la amplitud de la espiga poblacional están expresados en porcentaje respecto a los valores basales antes del EAFR (% PSA). A, animales sin déficit cognitivo. B, animales con deterioro cognitivo. Se muestran también los valores del estadígrafo *F* resultado de los ANOVAs de dos vías con mediciones repetidas para la interacción grupo/tiempo y grupo respectivamente, *P* < 0.05. Las saetas negras indican el momento del EAFR de la vía perforante, las blancas indican el de la estimulación de la amígdala basolateral. Las letras expresan el resultado de la prueba de Duncan.

Hay que destacar que si bien la estimulación de la amígdala basolateral no prolongó la LTP por encima de las 4 horas, en las ratas sin déficit sí la mantuvo hasta las cuatro horas (Tabla VIII). Recuérdate que la LTP control en las ratas de este grupo permaneció por solo 2 horas (Tabla VII).

Tabla VIII Resultados de la prueba *t* de Student ( $P < 0.05$ ) al comparar los valores de PSA antes y después del EAFR y la estimulación de la amígdala en los grupos de animales viejos y en los jóvenes (valores de *t*). Los números en negritas indican diferencia estadísticamente significativas ( $*P < 0.05$ ).

Grupos	5 min	1 h	2h	3 h	4 h	5 h	6 h
LTPJóvenes+BLA	<b>-3,84</b>	<b>-2,88</b>	<b>-2,58</b>	<b>-3,25</b>	<b>-2,59</b>	<b>-3,70</b>	<b>-3,50</b>
LTPViej sin déficit+BLA	<b>-10,27</b>	<b>-3,75</b>	<b>-3,56</b>	<b>-3,64</b>	<b>-3,23</b>	-2,75	-2,80
LTPViej con déficit+BLA	<b>-4,24</b>	-2,01	-1,80	-1,25	-1,56	-1,13	-1,09

### Experimento V. Efecto del envejecimiento sobre el reforzamiento motivacional

#### *El envejecimiento afectó el reforzamiento motivacional de la E-LTP*

En los animales viejos está abolido el reforzamiento de la E-LTP por estimulación eléctrica de la amígdala basolateral, ¿lo estará también el reforzamiento motivacional?

En los animales viejos con déficit cognitivo el estímulo motivacional no tuvo el efecto encontrado en los animales jóvenes (Fig. 34). La comparación estadística entre estos dos grupos

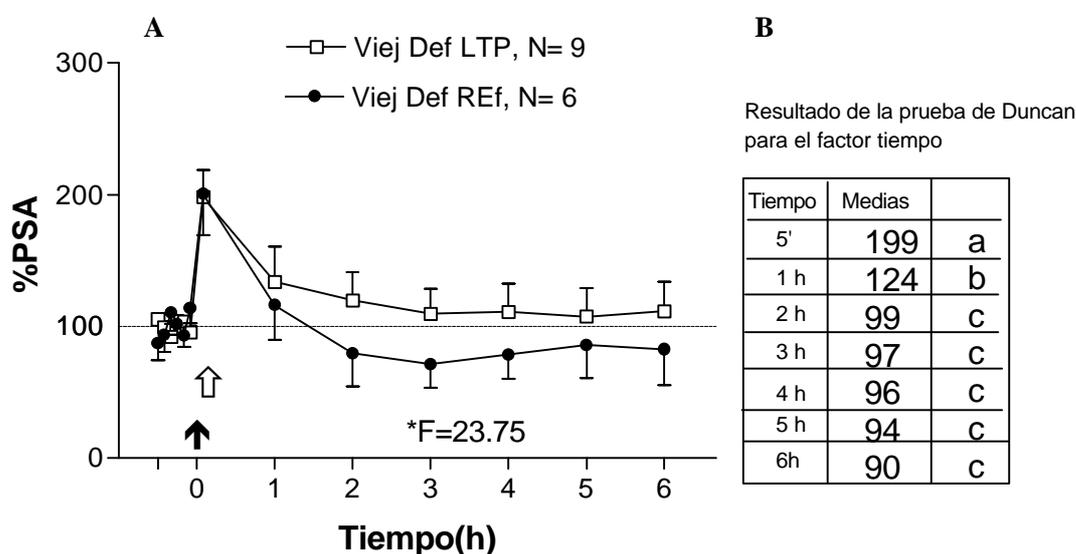


Fig. 34 A, Efecto del estímulo conductual con significado motivacional sobre el curso temporal de la LTP temprana en ratas viejas con déficit cognitivo. Los valores de la amplitud de la espiga poblacional están expresados en porcentaje respecto a los valores basales antes del EAFR (% PSA). Se muestra también el valor del estadígrafo *F* resultado de un ANOVA de dos vías con mediciones repetidas para el factor tiempo,  $P < 0.05$  y los resultados de la prueba de Duncan (B). La saeta negra indica el momento del EAFR de la vía perforante, la blanca indica el de la toma de agua.

(LTPcontrol y estimuladas motivacionalmente) verificó que no difieren entre ellos. El ANOVA no distinguió diferencias en el factor grupo ( $P > 0.05$  y  $F = 0.28$ ), pero sí para el factor tiempo ( $P > 0.05$ ,  $F = 23.75$ ). Esto significa que el curso temporal en el grupo sometido al protocolo de reforzamiento motivacional es similar al grupo control de ratas viejas, no hay reforzamiento. Mas bien, el estímulo que resulta reforzador en las ratas jóvenes (véase y compárese con la Fig. 18), en las viejas parece acelerar el regreso a la línea base, con una ligera tendencia a la depresión de la transmisión sináptica.

La comparación, mediante la prueba  $t$  de Student para muestras pareadas ( $P < 0.05$ ), entre la media de los registros basales y los realizados después del EAFR confirmó que el estímulo motivacional con significado motivacional no tuvo efecto reforzador (Tabla IX).

Tabla IX. Resultados de la prueba  $t$  de Student al comparar los valores antes de PSA y después del EAFR en los animales viejos con déficit cognitivo a los que se le dió de beber agua después de 24 horas de abstinencia (valores de  $t$ ).

	5 min	1 h	2 h	3 h	4 h	6 h	6 h
$t$	<b>-3.23</b>	-.612	.836	1.59	1.15	.553	.648

En su conjunto los resultados de este experimento muestran que el envejecimiento deteriora tanto la duración de LTP temprana, como los efectos reforzadores de la estimulación eléctrica de la amígdala basolateral y de estímulos con significados emocionales/motivacionales.

## Experimento VI.

Correlatos bioquímicos del reforzamiento motivacional. Efecto del envejecimiento

El último experimento de nuestro trabajo se encaminó a profundizar en los posibles mecanismos implicados en el reforzamiento de la LTP por estimulación eléctrica de la amígdala basolateral y por estímulos motivacionales, así como conocer causas probables que hacen fracasar el reforzamiento de formas transientes de plasticidad sináptica en el envejecimiento. El método utilizado para obtener las muestras de fluido fue el de la microdiálisis cerebral y sólo mostramos los resultados de las manipulaciones que provocaron modificaciones en las concentraciones de algún neurotransmisor en los animales jóvenes.

*La estimulación de la amígdala basolateral provoca una reducción en los niveles de norepinefrina y serotonina, en tanto aumento en la liberación de acetilcolina en el giro dentado de las ratas jóvenes*

En los animales jóvenes, la estimulación de la amígdala basolateral produjo una reducción notable de la liberación de norepinefrina y serotonina, y un incremento de acetilcolina en el giro

dentado del hipocampo (Fig. 35 A, B). La comparación mediante la prueba de la  $t$  de Student de los niveles basales y los recogidos durante la estimulación de la amígdala basolateral, hizo evidente que las diferencias eran estadísticamente significativas para los tres transmisores ( $P < 0.05$ ).

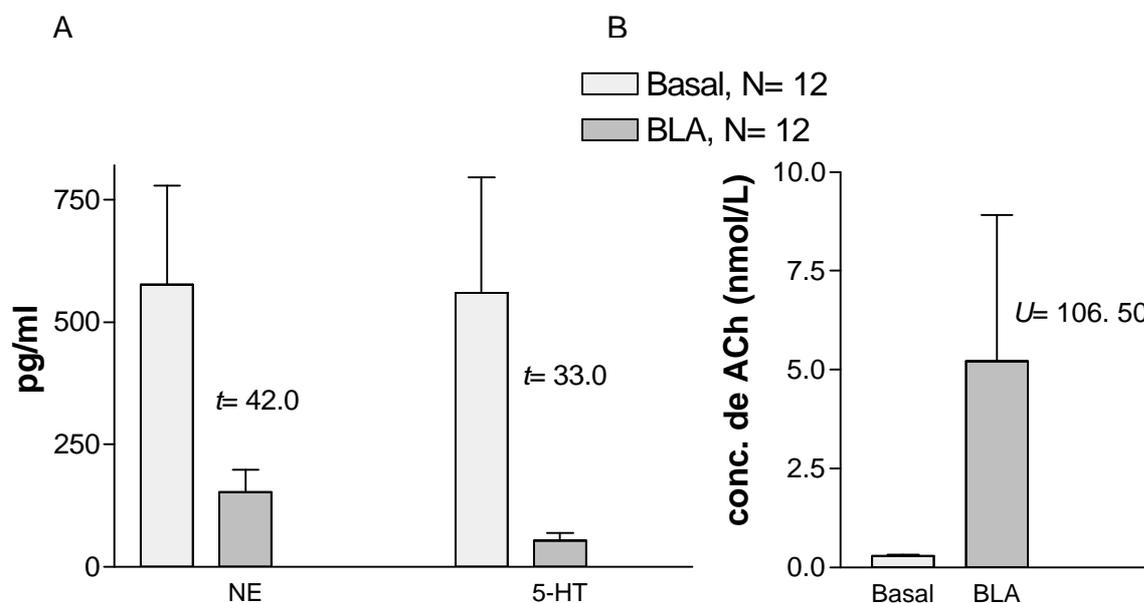


Fig. 35 Efecto de la estimulación eléctrica de la amígdala basolateral (BLA) sobre la liberación de norepinefrina (NE), serotonina (5-HT), acetilcolina (ACh). Se muestran los valores del estadígrafo  $t$ , resultado de la prueba de comparación de medias  $t$  de Student y la  $U$  de Mann Whitney ( $P < 0.05$ ) al comparar las muestras tomadas en condiciones basales (Basal) y las recogidas durante la estimulación de la amígdala (BLA).

#### *El reforzamiento motivacional redujo los niveles de glutamato y glicina en los animales jóvenes*

En los animales sometidos al protocolo de reforzamiento motivacional, también se produjo una significativa disminución de algunos transmisores (Fig. 36). Tal reducción se mantuvo por al menos 45 minutos más, pues en la muestra siguiente que se recogió se observaron resultados similares (datos no mostrados). La comparación de los valores basales con los obtenidos después del acceso al agua, mediante la  $t$  de Student, mostró reducciones significativas en la liberación de los neurotransmisores glutamato y la glicina ( $P < 0.05$ ).

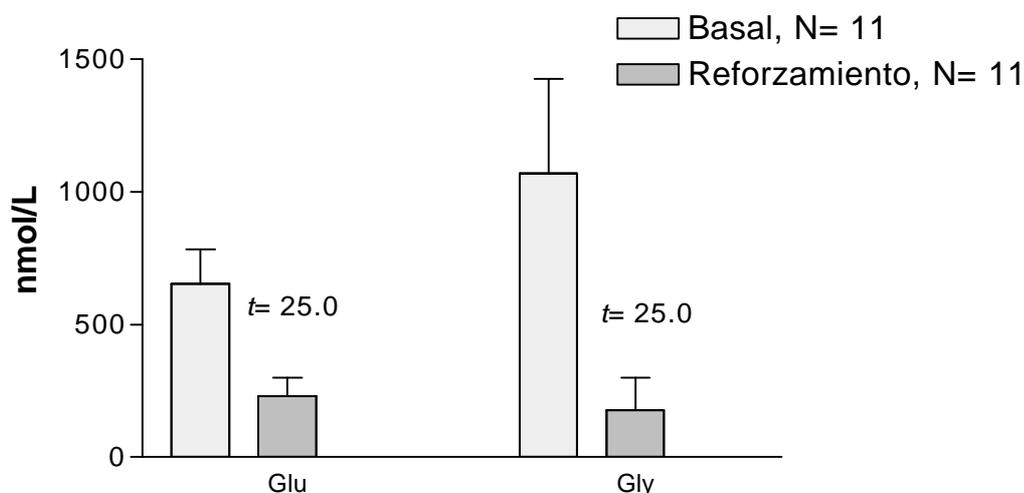


Fig. 36 Efecto del estímulo motivacional sobre la liberación de glutamato (Glu) glicina (Gly). Se muestran los valores del estadígrafo  $t$ , resultado de la prueba de comparación de medias  $t$  de Student ( $P < 0.05$ ) al comparar las muestras tomadas en condiciones basales (Basal) y las recogidas después de dar acceso al agua (Reforzamiento).

#### Los niveles basales de algunos neurotransmisores se reducen en la vejez

Sin embargo, en las ratas viejas ninguna de estas manipulaciones modificó la liberación de transmisores en el giro dentado del hipocampo (datos no mostrados). Además, el envejecimiento produjo una reducción en los niveles de algunos neurotransmisores en condiciones basales (Fig. 37).

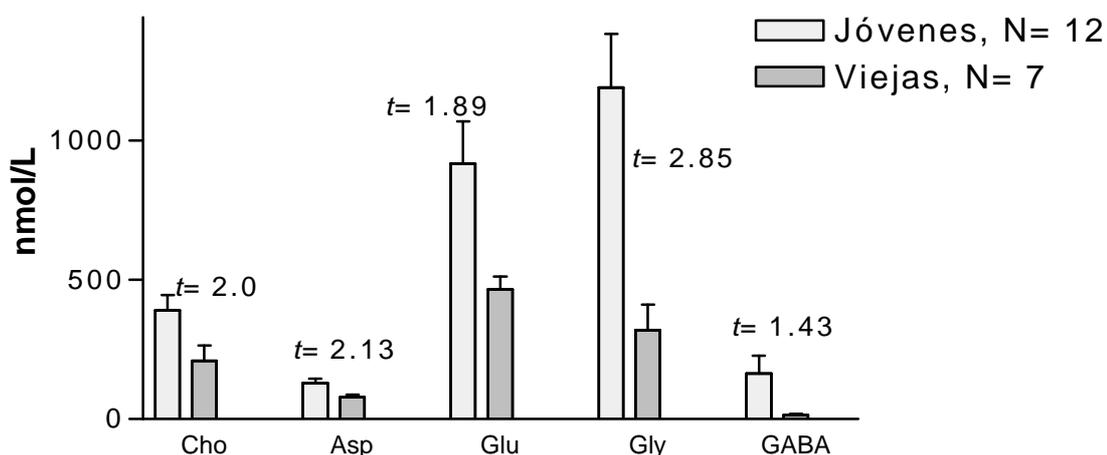


Fig. 37 Efecto del envejecimiento sobre los niveles de transmisores y del metabolito de la acetilcolina en giro dentado del hipocampo. Colina (Cho), aspartato (Asp), glutamato (Glu), glicina (Gly) ácido gamma-aminobutírico (GABA). Se muestran los valores del estadígrafo  $t$ , resultado de la prueba de comparación de medias  $t$  de Student ( $P < 0.05$ ) al comparar las muestras tomadas en condiciones basales entre jóvenes y viejas.

La estimulación con concentraciones elevadas de potasio, indujo en los animales jóvenes un incremento en la liberación de glutamato estadísticamente significativa con respecto al liberado en condiciones basales ( $t$  de Student,  $*P < 0.05$ ,  $t = -7.88$ ) (Fig. 38). En el caso de los animales viejos, la respuesta no fue sustancial ( $t$  de Student,  $*P < 0.05$ ,  $t = -2.00$ ). La comparación entre grupos del incremento en los niveles de glutamato también fue significativo ( $t$  de Student,  $*P < 0.05$ ,  $t = 2.26$ ).

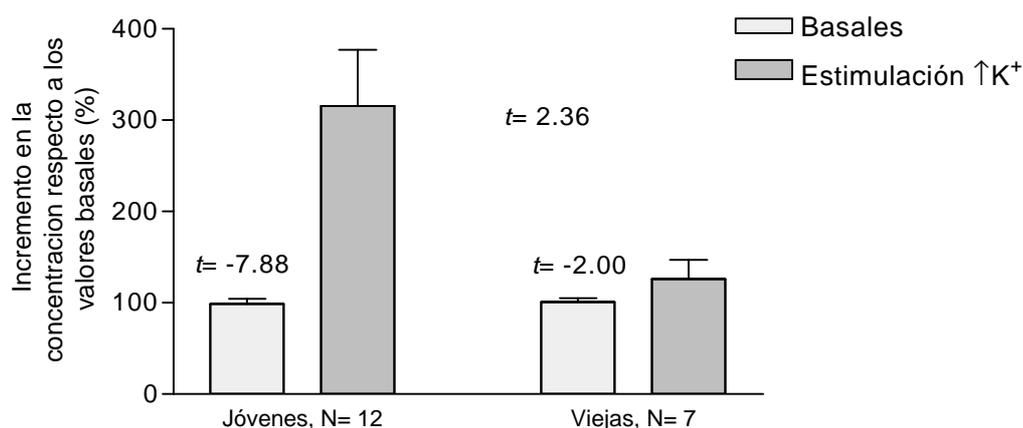


Fig. 38 Efecto de las altas concentraciones de potasio sobre la liberación de glutamato en animales viejos y jóvenes. Se muestran los valores del estadígrafo  $t$  de Student, resultado de la prueba de comparación de medias  $t$  de Student ( $P < 0.05$ ) al comparar las muestras tomadas en condiciones basales y en condiciones de altas concentraciones de potasio y la comparación entre grupos.

---

## DISCUSIÓN

*(...) Las ciencias aumentan la capacidad de juzgar que posee el hombre, y le nutre de datos seguros; pero a la postre el problema nunca estara resuelto; sucederá sólo que estará mejor planteado (...)*

*José Martí*

*(La Opinión Nacional, 15 de junio de 1882; O. C. T XXII. P 317)*

En el trabajo hemos presentado evidencias que muestran que la amígdala basolateral forma parte del circuito neuronal subyacente en el reforzamiento motivacional de una E-LTP. Probamos también que el reforzamiento motivacional es dependiente de la síntesis de nuevas proteínas y que la norepinefrina en dosis relativamente bajas es suficiente para reforzar una E-LTP. En cambio la oxotremorina no produjo la prolongación de la E-LTP inducida en el giro dentado. Un hallazgo no esperado es la depresión tardía inducida por la norepinefrina sobre la transmisión sináptica basal.

Por otra parte, hemos mostrado que el envejecimiento no reduce la magnitud inicial de la potenciación sináptica; pero sí reduce la duración de la E-LTP. Además, en los animales envejecidos la E-LTP no fue prolongada ni por la estimulación eléctrica de la amígdala, ni por el estímulo motivacional.

Finalmente, pudimos demostrar que el reforzamiento motivacional o el inducido por estimulación eléctrica de la amígdala basolateral, modifica la liberación de algunos neurotransmisores en el giro dentado de los animales jóvenes, en tanto en los animales viejos los niveles basales de muchos neurotransmisores están reducidos y ninguna de las manipulaciones reforzadoras provocó modificaciones en su liberación.

### *La amígdala basolateral es parte de las estructuras implicadas en el reforzamiento motivacional de la E-LTP*

Nuestro trabajo confirma las observaciones de Seidenbecher *et al.*, quienes mostraron que los estímulos motivacionales pueden prolongar una E-LTP en el giro dentado de la rata con libre movimiento (Seidenbecher *et al.*, 1995). Esta es la primera y única vez que se ha replicado este importante hallazgo fuera del laboratorio donde fue observado originalmente. Si tenemos en cuenta además, que nuestros resultados se obtuvieron en una línea de rata diferente a la empleada por ellos (Wistar), estamos confirmando que no se trata de un artefacto o un efecto propio de la línea, sino de una propiedad de la LTP y de las sinapsis: los cambios transitorios en la eficacia de la transmisión sináptica pueden ser modulados por factores emocionales y motivacionales.

El principal hallazgo de este experimento es que la amígdala forma parte de los circuitos subyacentes en el reforzamiento motivacional de una E-LTP.

En un estudio anterior realizado con ratas con libre movimiento, se demostró que la estimulación de la región basolateral de la amígdala mimetiza el efecto del estímulo motivacional sobre la E-LTP (Seidenbecher et al., 1995; Frey et al., 2001). Es decir, la estimulación de esta región prolonga la E-LTP convirtiéndola en una L-LTP. Desde hace mucho tiempo se conoce que la amígdala es una estructura clave en las emociones y las motivaciones (Klüver and Bucy, 1939). En los años noventa se realizó un grupo de experimentos que demostraron que la estimulación eléctrica de la amígdala facilita la inducción de la LTP en el giro dentado (Ikegaya et al., 1995c; Ikegaya et al., 1996b) y que la desconexión temporal de esta estructura deteriora la inducción de la LTP (Ikegaya et al., 1995d). Este último hallazgo coincide con nuestro resultado de que la desconexión permanente o temporal de la amígdala basolateral disminuye la duración de E-LTP.

Una serie de estudios conductuales han mostrado que la amígdala es importante para la consolidación de nuevos trazos de memoria en otras regiones del encéfalo (Roosendaal and McGaugh, 1997; Salinas et al., 1997; McGaugh et al., 1996; Dickinson-Anson and McGaugh, 1997; Martinez et al., 1983; Ammassari-Teule et al., 1991; McGaugh and Cahill, 1997; Quirarte et al., 1997; Roosendaal et al., 1998; Hatfield and McGaugh, 1999; Ferry and McGaugh, 1999; Da Cunha et al., 1999; Spanis et al., 1999; Ferry et al., 1999a; Roosendaal et al., 1999a; Bianchin et al., 2000; McGaugh, 2000; Roesler et al., 2002; McGaugh, 2002; McGaugh et al., 2002; Roosendaal et al., 2002a; Roosendaal et al., 2002b). También se ha evidenciado que la amígdala puede ser substrato ella misma de la memoria emocional (Quirk et al., 1997).

Tomadas en conjunto estas evidencias y nuestros resultados sugieren que el mecanismo del reforzamiento de la memoria por la amígdala se basa en su capacidad de reforzar y prolongar procesos transitorios de plasticidad sináptica en estructuras que forman parte del engrama de memoria cuando estos contenidos se asocian a estados motivacionales importantes.

#### *El reforzamiento motivacional depende de la síntesis de nuevas proteínas*

Comoquiera que el reforzamiento motivacional prolonga la E-LTP y la convierte en una L-LTP y que la síntesis de nuevas proteínas es un requisito para que la LTP se extienda después de las 4 horas (Krug et al., 1984), fue de interés estudiar si este reforzamiento de la LTP por factores afectivos también dependía de la síntesis de nuevas proteínas. Nuestros resultados muestran que la consolidación de la E-LTP por estímulos afectivos depende de la síntesis de nuevas proteínas. Resultados similares se han encontrado en otras formas de reforzamiento de la E-LTP en el giro dentado de la rata, como las provocadas por estimulación eléctrica de la amígdala basolateral (Frey et al., 2001) o la estimulación eléctrica del *septum* medial (Frey et

al., 2003). Estos hallazgos y el nuestro prueban de un modo robusto que el reforzamiento de los cambios de conectividad transitorios por elementos afectivos son sustentados por la síntesis de nuevas proteínas.

La LTP tiene fases en las cuales subyacen diferentes mecanismos celulares y moleculares. Es bien conocido que las fases iniciales de la LTP son sustentadas por cambios covalentes en proteínas preexistentes que pueden ser enzimas (Hayashi et al., 1997; Lledo et al., 1995; Barria et al., 1997; Chetkovich and Sweatt, 1993; Reymann, 1993; Herms et al., 1993; Huang and Kandel, 1994; Hayashi et al., 2000; Soderling, 2000; Miller et al., 2002); pueden ser receptores de membrana (Lee et al., 2003), que modifican su afinidad por el neurotransmisor (Fedorov et al., 1997; Barria et al., 1997; Tan et al., 1994; O'Connor et al., 1995; Derkach et al., 1999; Lee et al., 2000; Lee et al., 2003) o su densidad (Luscher and Frerking, 2001; Malinow and Malenka, 2002; Borgdorff and Choquet, 2002) y pueden ser también proteínas estructurales con otras funciones (Fields and Itoh, 1996; Landmesser, 1997; Fazeli et al., 1994; Lüthi et al., 1994; Doherty et al., 1995; Ronn et al., 1995; Cremer et al., 1998; Cremer et al., 2000; Ronn et al., 2000; Schuster et al., 2001; Wright et al., 2002). En cambio, las fases tardías dependen de la síntesis de nuevas proteínas (Krug et al., 1984; Frey et al., 1988; Frey et al., 1991a; Mochida et al., 2001).

La inducción de los procesos de síntesis de proteínas parece implicar la activación de cascadas moleculares que conducen a la activación de moléculas moduladoras de la transcripción y traducción. Se sabe que es necesaria la cooperación de aferencias metabotrópicas no glutamatérgicas, lo cuál ha sido bien estudiado en la región CA1 de hipocampo. Los agonistas dopaminérgicos de los receptores D1 y D5 inducen una potenciación lenta similar a la LTP (> 6 h) que también depende de la síntesis de nuevas proteínas (Huang and Kandel, 1995). Se conoce que estos receptores están directamente acoplados con la adenilato ciclasa. Esta potenciación es bloqueada por un antagonista de este tipo de receptores y es ocluida por la potenciación inducida con análogos del AMP<sub>c</sub>. (Nguyen and Kandel, 1996; Huang and Kandel, 1995).

Otros estudios en la región CA1 del hipocampo, demuestran que con la adición de inhibidores del AMP<sub>c</sub> se bloquea la L-LTP, y la adición de sus análogos ocluyen la L-LTP en CA1 obtenida por estimulación tetánica de las colaterales de Schaffer. Estos resultados demuestran que el AMP<sub>c</sub> está involucrado en la cascada de eventos necesaria para el desarrollo de la L-LTP (Nguyen and Kandel, 1996; Frey et al., 1993a).

La inducción, en la región CA1 del hipocampo, de una E-LTP en presencia de agonistas de los receptores dopaminérgicos de tipo D1/D5, induce la síntesis de AMP<sub>c</sub>, que activa la proteína cinasa A. Esta molécula juega un papel fundamental en el mantenimiento de la LTP, como lo

---

demuestran estudios con ratas transgénicas que no presentan una subunidad reguladora de esta proteína para su expresión en el hipocampo, estos animales muestran un decrecimiento de la L-LTP en la región CA1 del hipocampo (Abel et al., 1997;Frey et al., 1993a;Frey, 1997).

La memoria, al igual que la LTP, es inicialmente frágil y transitoria, pero eventualmente es consolidada y se hace más estable y duradera (Müller and Pilzecker, 1900). La síntesis de nuevas proteínas es decisiva en el mantenimiento de la memoria (Matthies, 1976;Grecksch et al., 1980;Grecksch and Matthies, 1980;Wetzel et al., 1980;Lössner et al., 1982;Stäubli et al., 1985;Lössner et al., 1987;Sandi and Rose, 1997;Meiri and Rosenblum, 1998;Scharf et al., 2002). También se ha podido demostrar que la PKA y el factor de transcripción que ella activa: el CREB, están implicados en algunas formas de aprendizaje (Abel et al., 1997;Abel and Lattal, 2001;Barco et al., 2003).

Resulta significativo que el reforzamiento motivacional de procesos de plasticidad sináptica en el giro dentado sea dependiente de la síntesis de nuevas proteínas, pues esta forma de reforzamiento es mediada por receptores beta-adrenérgicos (Seidenbecher et al., 1997). Lo anterior sugiere que el reforzamiento motivacional de la E-LTP comparte estos mecanismos moleculares y, muy probablemente, involucra la cooperación de aferencias no glutamatérgicas capaces de activar las cascadas implicadas en los procesos de regulación génica. Para conocer más sobre los mecanismos implicados en el reforzamiento de la E-LTP estudiamos si la norepinefrina y la oxotremorina eran suficientes para reforzarla.

#### *La norepinefrina pero no los agonistas muscarínicos prolongan la E-LTP*

En el giro dentado este papel modulador de la síntesis de proteínas pudiera ser realizado por aferencias noradrenérgicas o colinérgicas, teniendo en cuenta la escasez de aferencias dopaminérgicas en esta región.

Nuestros resultados muestran que la norepinefrina fue capaz de reforzar una E-LTP y prolongarla más allá de las 4 horas. Sin embargo, al realizar estudios de control sobre la acción basal de esta sustancia encontramos un resultado inesperado y aparentemente contradictorio: la norepinefrina indujo una depresión tardía de la transmisión sináptica basal. Esta se manifiesta a partir de las 5 horas y se extendió hasta las 6 horas de registro.

A diferencia de nuestro hallazgo, observaciones de otros autores han mostrado que la norepinefrina por sí sola es capaz de inducir una potenciación sináptica de la espiga poblacional en el giro dentado similar a una LTP (llamada LTP-noradrenérgica) cuando es administrada en preparaciones *in vitro* (Lacaille and Harley, 1985;Stanton and Sarvey, 1987). La potenciación inducida por norepinefrina es mediada por receptores beta-1 y la activación de la adenilato

---

ciclasa, y tiene una fase tardía que depende de la síntesis de nuevas proteínas (Stanton and Sarvey, 1985a). La inducción de la LTP en la región de CA1, en rebanadas obtenidas de animales sin inervación adrenérgica está reducida; pero no la LTD. La adición a estas preparaciones de norepinefrina o agonistas de los receptores beta de tipo 1 puede recuperar la LTP. Los activadores del AMPc y la PKA pueden restituir la LTP. Esto no sucede si se añaden a la preparación agonistas de los receptores beta de tipo 2. Al añadir la norepinefrina también se bloquea la LTD (Yang et al., 2002). Esta evidencia sugiere entonces, la participación del AMPc y la PKA en la posible cascada de reacciones intracelulares provocadas por la norepinefrina. En este sentido resulta revelador que la norepinefrina puede producir la activación de varios genes (c-fos, nur77, tis-7, zif-268, tis-21) de activación temprana (Bing et al., 1991), así como la síntesis de proteínas (Bing et al., 1992) en la corteza.

El efecto de la norepinefrina administrada sobre rebanadas de hipocampo depende de la dosis. En dosis bajas incrementa la excitación y en dosis elevadas induce inhibición (Segal et al., 1981). Por otra parte, la norepinefrina administrada *in vitro* causa un incremento en los niveles de AMPc a los 20 segundos en el giro dentado, CA1 y CA3, que alcanza su máximo de 5-10 minutos de incubación. Además, tanto la activación de receptores alfa como beta-adrenérgicos incrementan los niveles de AMPc (Segal et al., 1981). Análogos del AMPc producen un incremento de la amplitud de la espiga poblacional similar a la norepinefrina (Mueller et al., 1981).

En la región CA1 del hipocampo (rebanadas), la adición de agonistas de los receptores *beta* como el isoproterenol, también provocan un incremento en la amplitud de la espiga poblacional, pero no del potencial postsináptico excitatorio (Robinson and Racine, 1985; Heginbotham and Dunwiddie, 1991).

La clonidina, un agonista de los receptores alfa, aplicada a rebanadas de hipocampo de ratas produce inhibición de la amplitud de la espiga poblacional que es dependiente de la dosis. Esta inhibición puede ser bloqueada por antagonistas alfa y agonistas beta-adrenérgicos. Análogos del AMPc producen un incremento de la amplitud de la espiga poblacional similar a la norepinefrina (Mueller et al., 1981).

Estudios realizados en animales anestesiados, en los cuales se administró norepinefrina en el ventrículo lateral y se estudiaron los niveles de esta sustancia en el giro dentado mediante cánulas de microdiálisis, confirma que la norepinefrina induce una potenciación sináptica mediada por receptores beta-adrenérgicos (Harley et al., 1996). Para que se produzca la potenciación sináptica inducida por norepinefrina, tienen que incrementarse los niveles de

---

norepinefrina hasta 30 veces respecto a la concentración basal. Estos datos sugieren que la potenciación sináptica farmacológica inducida por norepinefrina tiene un umbral.

La potenciación sináptica inducida por agonistas beta-adrenérgicos en CA1 produce una despolarización duradera, que persiste al menos por 30 minutos después de retirar el agonista y un decremento prolongado en la conductancia de potasio activada por  $Ca^{++}$  responsable de la hiperpolarización tardía (*afterhyperpolarization*, AHP). Esta forma de potenciación no depende de un incremento en los niveles de  $Ca^{++}$ . Los análogos del AMPc remedian la potenciación sináptica y la reducción en la AHP, lo cual sugiere que la potenciación sináptica inducida por agonistas beta-adrenérgicos es mediada por AMPc (Dunwiddie et al., 1992). También se conoce que la norepinefrina induce un incremento en la actividad de los canales de  $Ca^{++}$  dependientes de voltaje de las células granulares del giro dentado, la cual pudiera estar mediada por receptores beta-adrenérgicos (Gray and Johnston, 1987).

La norepinefrina también incrementa la potenciación sináptica duradera en las fibras musgosas del hipocampo (Hopkins and Johnston, 1988).

Resulta interesante que la administración de norepinefrina a rebanadas de hipocampo incrementa los niveles extracelulares de potasio y reduce los de  $Ca^{++}$  en el giro dentado. Tal resultado no se observa si se añade un antagonista beta-adrenérgico como el propranolol (Stanton and Heinemann, 1986). Por otra parte, los antagonistas de los receptores al glutamato NMDA bloquean la potenciación sináptica inducida por la norepinefrina.

La norepinefrina reduce las corrientes de eflujo de potasio (una corriente de potasio A y una corriente lenta de potasio dependiente de  $Ca^{++}$ ) obtenidas por pulsos despolarizantes en presencia de tetrodotoxina, sin modificar las de  $Ca^{++}$ . Este efecto puede ser bloqueado por el propranolol, un antagonista beta-adrenérgico, y es remedado por agonistas de estos receptores. Estos hallazgos sugieren que la norepinefrina deprime las corrientes de potasio mediante la activación de receptores beta-adrenérgicos (Sah et al., 1985).

También ha sido demostrado que la norepinefrina o el isoproterenol son capaces de producir un aumento en la fosforilación de la sinápsina I y II, las cuales están involucradas en la liberación del neurotransmisor. Este hallazgo insinúa que esta sustancia puede incrementar la liberación del transmisor y que parte de su efecto modulador pudiera deberse al incremento de la liberación del transmisor (Parfitt et al., 1991).

Nosotros no hallamos evidencias de que la norepinefrina induzca por sí sola una potenciación sináptica, sino lo contrario, una depresión sináptica tardía, lo que pudiera deberse a que la dosis aplicada no alcanzó el umbral que parece tener esta potenciación. Debe notarse que nuestros experimentos se hicieron en animales con libre movimiento, que no estaban

---

anestesiados, lo cual puede ser un factor importante también para explicar esta discrepancia con resultados obtenidos *in vitro*. Es decir, se trata de organismos íntegros, despiertos que reciben estimulación exterior, la procesan y generan respuestas. En el caso de los animales anestesiados, la actividad del Sistema Nervioso está reducida y en cuanto a las rebanadas, se trata de partes aisladas donde faltan importantes aferencias. Las diferencias entre animales anestesiados y despiertos con libre movimiento se hacen evidentes en la gran variabilidad de las respuestas evocadas en comparación con la estabilidad de las obtenidas en animales anestesiados (López Planes et al., 1999; Almaguer-Melian et al., 2000).

Por otra parte, existen evidencias de que la norepinefrina puede tener un efecto depresor sobre la transmisión sináptica. La administración de norepinefrina a preparaciones *in vitro* en rebanadas de hipocampo, reduce la espiga poblacional y el potencial postsináptico excitatorio en CA1, evocados por estimulación del *stratum radiatum* (Mody et al., 2003). La estimulación eléctrica del *locus coeruleus* resulta en una supresión primero, y en una activación después, de la actividad de las células piramidales de CA3 (Curet and De Montigny, 2003b). Tales efectos dependen de la activación de los receptores alfa1 y beta-2, respectivamente. La activación de receptores alfa-2 sólo provoca supresión en CA1 y CA3 (Curet and De Montigny, 2003a). La reducción de los potenciales postsinápticos excitatorios producidos por la norepinefrina en CA3, no se revierte por adición iontóforética de AMPA, lo cual sugiere que el efecto de la norepinefrina es mediado por adrenoceptores presentes en las terminales presinápticas de las fibras glutamatérgicas (Scanziani et al., 1993). Estudios más recientes muestran que el efecto supresor de la norepinefrina puede ser mediado por interneuronas GABAérgicas (Bergles et al., 1996). Estos hechos pudieran explicar en alguna medida la depresión observada por nosotros. Una explicación alternativa a esta depresión sináptica tardía proviene de hallazgos anteriores de nuestro grupo, en los cuales, se ha probado que la estimulación tetánica de la amígdala basolateral, cuando no se tetaniza la vía perforante, produce también una depresión tardía de la transmisión sináptica basal (Frey et al., 2001). Pudiera ser que la norepinefrina alcance y active la amígdala y esta a su vez por mediación del *septum* (Jas et al., 2000), induzca esta depresión al liberar acetilcolina sobre el hipocampo. La acetilcolina puede reducir la liberación de glutamato a través de receptores M<sub>2</sub> presinápticos (Vizi and Kiss, 1998) y con ello reducir la amplitud de la espiga poblacional observada por nosotros. Evidentemente, la activación de las neuronas GABAérgicas septales también puede ser responsable de esta depresión. De cualquier modo, este efecto parece implicar cambios neuroplásticos y no sólo interacciones inmediatas entre neurotransmisores, teniendo en cuenta su aparición tardía, más de cuatro horas de administrada la norepinefrina.

---

### La norepinefrina promueve la consolidación (o el reforzamiento) de la LTP

Los resultados del estudio en el cuál se aplicó norepinefrina después de inducir una LTP transitoria (E-LTP) mostraron que esta sustancia es capaz de provocar el reforzamiento y prolongación del fenómeno plástico, mimetizando los efectos del reforzamiento motivacional.

La L-LTP inducida en el giro dentado en animales con libre movimiento, con estímulos repetitivos relativamente fuertes, es bloqueada por antagonistas de los receptores beta-adrenérgicos y es dependiente de la síntesis de nuevas proteínas (Straube and Frey, 2003).

El reforzamiento de la E-LTP por estímulos motivacionales es mediado por receptores beta-adrenérgicos (Seidenbecher et al., 1997). También el reforzamiento inducido por estimulación de la amígdala basolateral es mediado por receptores beta-adrenérgicos (Frey et al., 2001). El efecto reforzador de la amígdala basolateral es mediado por el *septum*, pues la lesión de fimbria-fórnix bloquea el reforzamiento (Jas et al., 2000). Además, la estimulación eléctrica del *septum* también puede reforzar una E-LTP, lo que asimismo depende de la activación de receptores beta-adrenérgicos (Frey et al., 2003).

Resultados anteriores muestran que la reducción de los niveles endógenos de norepinefrina reduce la amplitud y la ocurrencia de la potenciación sináptica duradera en el giro dentado (Stanton and Sarvey, 1985b). Además el propranolol, un antagonista beta-adrenérgico bloquea la inducción de la LTP en el giro dentado del hipocampo (Bramham et al., 1997). Incluso, la norepinefrina puede producir un cambio en el umbral de inducción de la LTP. Se sabe que patrones de estimulación que inducen LTP, no lo hacen cuando se agrega norepinefrina (Katsuki et al., 1997).

Por otra parte, se ha mostrado que la infusión de norepinefrina en la región basolateral de la amígdala mejora el aprendizaje espacial, en tanto que el propranolol lo daña (Hatfield and McGaugh, 1999). Durante el aprendizaje de evitación activa se produce un incremento en la liberación de norepinefrina en la amígdala (McGaugh et al., 2002). El clenbuterol, un agonista beta-adrenérgico, inyectado en la amígdala basolateral mejora la retención del aprendizaje de evitación pasiva, lo que sugiere que el efecto del sistema adrenérgico sobre la modulación de la memoria puede ser mediado, al menos en parte, por receptores beta-adrenérgicos (Ferry and McGaugh, 1999).

La activación de receptores alfa1-adrenérgicos puede mejorar la retención de la memoria, por activación de los receptores beta-adrenérgicos (Ferry et al., 1999b). Los antagonistas de los receptores alfa1-adrenérgicos atenúan el efecto del clenbuterol sobre la memoria, pero no modifican el efecto positivo que tienen los análogos del AMPc sobre la memoria. Este resultado

---

insinúa que los receptores alfa1-adrenérgicos pudieran actuar indirectamente a través de los beta-adrenérgicos, los cuales a su vez incrementarían los niveles de AMPc (Ferry et al., 1999a). R ratones que no expresan el receptor alfa 1b-adrenérgico (*knock out* alfa1B) muestran una reducción en la actividad exploratoria y en el número de visitas a los cuadros centrales en el campo abierto. En tanto, en la prueba de evitación pasiva mostraron un deterioro en el aprendizaje de esta tarea (Knauber and Muller, 2000).

Asimismo, el reconocimiento de estímulos novedosos durante la exploración produce un incremento en la actividad de las neuronas del *locus coeruleus* que se extiende de 1-2 s (Vankov et al., 1995). Este incremento de la actividad produce una potenciación sináptica de la espiga poblacional en el giro dentado, que es mediada por receptores beta-adrenérgicos y dura unos 20 s (Kitchigina et al., 1997). También los aciertos en el condicionamiento operante son precedidos de una respuesta fásica del *locus coeruleus*. Cuando los animales equivocan la conducta, esta respuesta fásica está ausente (Aston-Jones et al., 1997; Aston-Jones et al., 1998).

Estas evidencias y los resultados aquí presentados permiten suponer que el efecto de la norepinefrina, como mediador del reforzamiento motivacional es similar al propuesto para la dopamina, es decir activando la cascada: proteína G/adenilato ciclasa/AMPc/PKA/CREB. Por esta vía, el estímulo motivacional induce la síntesis de nuevas proteínas, que luego se insertan en las sinapsis activadas por el EAFR y de este modo se prolonga la LTP más allá de las 4 horas. Esto significa que las catecolaminas en general pudieran consolidar modificaciones sinápticas transitorias en el Sistema Nervioso.

#### La oxotremorina no consolidó la E-LTP

Los resultados de estudios anteriores permitían suponer que los agonistas colinérgicos de tipo muscarínicos tendrían también un efecto reforzador sobre la LTP. Sin embargo, las tres dosis de oxotremorina probadas por nosotros no lograron consolidar la E-LTP en una L-LTP. Aunque es sugerente el hecho de que las dosis bajas hayan reducido la duración de la E-LTP, en tanto la dosis alta no modificó el curso temporal de la E-LTP.

Este resultado es también controversial debido a que estudios anteriores, en rebanadas de hipocampo de rata, han mostrado que la administración de agonistas colinérgicos muscarínicos induce un incremento en la eficacia de la transmisión sináptica, que se desarrolla lentamente (Segal and Auerbach, 1997; Auerbach and Segal, 1996a; Auerbach and Segal, 1996b) y que depende de la dosis. Las dosis relativamente bajas inducen lo que se denomina potenciación sináptica duradera muscarínica (LTPm), mientras las dosis altas provocan una reducción en la eficacia de la transmisión.

---

La lesión de la fimbria-fornix, que es la principal aferencia colinérgica al hipocampo, reduce la duración de la LTP (Bergado et al., 1996) y bloquea el efecto reforzador de la estimulación eléctrica de la amígdala basolateral sobre la E-LTP en el giro dentado (Jas et al., 2000). El trasplante de células septales fetales en animales con lesión de fimbria/fornix restaura la LTP (Bergado et al., 1997b). También la lesión de esta vía reduce la capacidad de aprendizaje espacial (Cassel et al., 1997;Almaguer Melian et al., 1999) y el trasplante septal mejora este tipo de aprendizaje (Cassel et al., 1992;Dunnett et al., 1993). La lesión del *septum* medial y el núcleo basal de Meynert deteriora el aprendizaje y reduce la plasticidad cortical relacionada con la adquisición de habilidades motoras (Conner et al., 2003).

Los estudios en animales envejecidos, en los cuales ocurre de forma espontánea una desaferenciación colinérgica por muerte de neuronas colinérgicas en el *septum* (van der Zee EA and Luiten, 1999), reproducen las afectaciones en el aprendizaje espacial y de la LTP antes citadas (Barnes and McNaughton, 1985;de Toledo-Morrell et al., 1988)

Las fibras colinérgicas provenientes del *septum* inervan las tres capas del hipocampo y del giro dentado de modo topográfico (Frotscher et al., 1992). Esta inervación, junto a la de fibras GABAérgicas provenientes también del *septum*, inducen una actividad eléctrica rítmica, conocida como ritmo *theta* (Wang, 2001a;Wang, 2001b) (Bland and Bland, 1986;Lawson and Bland, 1993), la cual se origina a partir de la combinación de la despolarización rítmica de las dendritas y de la inhibición del soma de las células principales del hipocampo (Buzsáki, 2002). Los agonistas colinérgicos de tipo muscarínicos a bajas dosis no afectan la transmisión basal, pero facilitan la inducción de la LTP. Las dosis altas deprimen la transmisión basal, pero no afectan la inducción de la LTP. El efecto facilitador parece mediado por receptores colinérgicos muscarínicos de tipo M1 (Burgard and Sarvey, 1990).

Durante la exploración, orientación, el olfateo y el sueño REM (Orr et al., 2001) se produce ritmo *theta*. Por otra parte, el pico de excitabilidad de las neuronas principales del hipocampo se halla estrechamente relacionado con el ritmo *theta* (Buzsáki, 2002) y las fases de descarga de las células de lugar (*place cell*) relacionada a la onda *theta*, cambia con la localización espacial (O'Keefe and Nadel, 1978;O'Keefe, 1993). La estimulación con patrones de frecuencia *theta* es óptima para inducir la LTP hipocampal (Larson et al., 1986), debido a una disminución en la inhibición y un incremento en la sumación de excitación en las fases tardías de los ciclos *theta* de la estimulación (Arai and Lynch, 1992). Estas observaciones, en su conjunto, han sugerido que el ritmo *theta* pudiera ser decisivo para el procesamiento de información requerido en el aprendizaje y la memoria.

---

Por otra parte, hay correlación entre la pérdida de aferencias colinérgicas al hipocampo y la corteza, y el deterioro cognitivo (Ikegami, 1994) y de la función sináptica (Bergado et al., 1996; Jas et al., 2000). Los agonistas colinérgicos de tipo muscarínico mejoran el aprendizaje y la memoria (Jerusalinsky et al., 1997). También se ha podido demostrar que durante la adquisición de trazos de memoria (Yamamuro et al., 1995; Orsetti et al., 1996) se produce un incremento en la liberación de acetilcolina en el hipocampo y en la corteza.

Todo lo anterior sugiere un papel clave del sistema colinérgico en la plasticidad sináptica en el hipocampo y el aprendizaje.

Sin embargo, nosotros no encontramos efectos reforzadores sobre la E-LTP. Tal vez se requieran dosis más elevadas para lograrlo, como sugiere el patrón de dosis/respuesta observado en nuestro estudio.

#### Posibles vías de acción de la norepinefrina y la oxotremorina

La norepinefrina pudiera actuar directamente sobre las células granulares del giro dentado e inducir la síntesis de nuevas proteínas (receptores beta-adrenérgicos/proteína G/adenilato ciclasa/AMPC/PKA/CREB), pero también pudiera hacerlo de manera indirecta. Hay dos buenos candidatos para ser mediadores o contribuyentes del efecto de la norepinefrina: la amígdala y el *septum*. La norepinefrina pudiera alcanzar la amígdala, activarla y a través del *septum* prolongar la E-LTP, como parece hacer la estimulación eléctrica de la amígdala.

Más oportunidad tiene el *septum* de ser alcanzado por la norepinefrina administrada al estar muy cerca del ventrículo. La norepinefrina pudiera llegar hasta el *septum*, activarlo y este a su vez a través de la fimbria/fornix inducir la síntesis de nuevas proteínas. Se sabe que la activación del *locus coeruleus*, en animales anestesiados, induce un incremento en la actividad electroencefalográfica de la corteza y el hipocampo que parece estar mediado por el *septum* medial (Berridge et al., 1996; Berridge and Espana, 2000).

La activación del *septum* por la norepinefrina pudiera inducir la liberación de acetilcolina en el hipocampo. La acetilcolina puede bloquear varios tipos de corriente de potasio que pueden provocar la despolarización de las neuronas hipocámpales. En estas condiciones, la despolarización producida por la activación de los receptores AMPA, que de otro modo no era suficiente para abrir los canales NMDA, pudiera entonces abrirlos. La apertura de estos canales provoca la entrada masiva de  $Ca^{++}$ , el cual puede activar subtipos de adenilato ciclasa sensibles a este ión y con ello la cascada de AMPC/PKA/CREB. Otra posibilidad es a través de la activación de receptores colinérgicos de tipo muscarínicos, los cuales desencadenan cascadas de activación que eventualmente pueden activar a la PKC. Algunos subtipos de esta enzima pueden activar la síntesis de nuevas proteínas (Hinoi et al., 2002). Por ejemplo, la calcio-

---

calmodulina cinasa II, activada por el  $Ca^{++}$ , puede inducir la síntesis de nuevas proteínas (Hinoi et al., 2002).

La oxotremorina también pudiera actuar en estas mismas tres estructuras. En el hipocampo lo haría directamente sobre receptores colinérgicos de tipo muscarínico. En este sentido nuestros resultados no apoyan esta posible vía, pero como ya hemos sugerido a partir de nuestros resultados, las dosis empleadas parecen haber sido insuficientes para prolongar la E-LTP. También pudiera actuar sobre la amígdala. Se ha demostrado que la inyección de oxotremorina en la amígdala puede mejorar el aprendizaje (Shibata et al., 1993). La otra posibilidad es que la oxotremorina inyectada en el ventrículo alcance el *septum* y activar sus canales sensibles a ella. La aplicación iontoforética de acetilcolina o carbacol, un agonista muscarínico, activa esta región (Segal, 1986). La oxotremorina pudiera activar tanto a las células colinérgicas como a las GABAérgicas. De hecho se sabe que en las células GABAérgicas son más abundantes los receptores muscarínicos  $M_2$ , que son los más comunes en esta zona del cerebro. En las células colinérgicas sólo se halla el 8 % de los receptores  $M_2$  del *septum*, el resto se encuentra presumiblemente sobre las células GABAérgicas (Levey et al., 1995). Esto pudiera significar un predominio de la inhibición, que incluso pudiera contrarrestar cualquier efecto estimulador por las otras dos vías o por la activación de las células colinérgicas septales.

Nuestros datos muestran también que el efecto reforzador de la norepinefrina es dependiente de la dosis. Las dosis bajas produjeron reforzamiento, en cambio, las altas no reforzaron, e incluso redujeron la duración de la E-LTP.

#### Consideraciones sobre el factor dosis

Otros investigadores han encontrado resultados similares. La administración de distintas dosis de norepinefrina en cortes de la región CA1 del hipocampo demuestran que altas concentraciones de esta sustancia generan un decremento en la actividad sináptica mediada por receptores alfa y dosis bajas provocan un aumento en la eficacia del fenómeno plástico por activación de receptores beta y la subsiguiente activación de AMPc (Mueller et al., 1981).

En general existen al menos dos posibles causas de este comportamiento diferencial. La primera pudiera estar relacionada con una diferencia en la densidad o distribución de receptores alfa y beta en el hipocampo. Existen evidencias de que en todo el hipocampo hay una alta densidad de receptores del tipo beta, mientras los receptores alfa se concentran en los sitios de las terminales noradrenérgicas (Crutcher and Davis, 2003). De modo que las concentraciones bajas pudieran activar sobre todo a los receptores beta, por ser los de más amplia distribución en el giro dentado. La distribución restringida de los receptores alfa hace menos probable que interactúen con la norepinefrina inyectada en concentraciones bajas. En cambio, cuando se

aplican concentraciones más elevadas se incrementan las probabilidades de que se activen también los receptores alfa. En el hipocampo los receptores alfa-2 se encuentran en su mayoría en las terminales presinápticas (Milner et al., 2003). Estos receptores pueden reducir la liberación de glutamato (Scanziani et al., 1993). La segunda posibilidad es que la norepinefrina en concentraciones elevadas active a interneuronas inhibitorias. Se sabe que las neuronas GABAérgicas pueden ser excitadas mediante la activación de receptores alfa-1, y que estas reducen la actividad de las neuronas principales del giro dentado (Bergles et al., 1996).

Queda todavía otra alternativa, al menos teóricamente. En condiciones de altas concentraciones de norepinefrina pudieran activarse otras estructuras o regiones, que a su vez, por vías indirectas reduzcan la actividad de las neuronas del giro dentado. Por supuesto, estas alternativas no son excluyentes, de manera que pueden ocurrir ambos fenómenos.

La posibilidad de que los receptores beta-adrenérgicos sean más sensibles a la norepinefrina que los receptores alfa-adrenérgicos queda descartada, pues al menos en la periferia, sucede justamente lo contrario. Los receptores alfa tienen una mayor afinidad por la norepinefrina que los receptores beta (Guyton and Hall, 1997).

*El envejecimiento afectó el reforzamiento de la E-LTP por estimulación de la amígdala basolateral y el reforzamiento motivacional*

Como el envejecimiento parece dañar sobre todo el mantenimiento de la LTP, nosotros estudiamos también los procesos de reforzamiento en animales viejos con y sin déficit cognitivo. Es bien conocido que con el envejecimiento se deteriora la LTP (Barnes and McNaughton, 1985; Foster and Norris, 1997). Entre las causas probables de esta afección se ha propuesto la pérdida de espinas dendríticas, del árbol dendrítico e incluso la pérdida de neuronas hipocampales, así como, una afectación en la homeostasis del  $Ca^{++}$  (Foster and Norris, 1997; Foster, 1999) y desequilibrio oxidativo (Lynch, 1998). Se ha encontrado que con el envejecimiento se produce una reducción en el número de canales del tipo NMDA (Katsuki et al., 1990; Tamaru et al., 1991; Wenk et al., 1991). Otra posible causa postulada es la intensa desaferentación colinérgica al hipocampo (Bartus et al., 1982; Fischer et al., 1994).

Nuestros resultados muestran que el envejecimiento deteriora el reforzamiento de la E-LTP hipocampal por la estimulación eléctrica de la amígdala. Resulta interesante, que aunque tanto en los animales viejos con déficit como sin déficit cognitivo no hay reforzamiento de la LTP, los animales sin déficit cognitivo tienen una LTP basal similar a los animales jóvenes. Esto sugiere que el daño en el efecto reforzador es anterior a los daños en la plasticidad sináptica intrínseca del hipocampo.

Una posible explicación a la pérdida del reforzamiento de la LTP en el giro dentado por estimulación de la amígdala en los animales viejos es la llamada 'hipótesis colinérgica' (Bartus et al., 1982; Bartus, 2000). En las ratas viejas, se produce una pérdida severa de neuronas colinérgicas en el *septum* (van der Zee EA and Luiten, 1999), cuyas terminaciones en el hipocampo parecen mediar el reforzamiento, pues tanto antagonistas colinérgicos (Frey et al., 2001) como la lesión de fimbria-fornix impiden el reforzamiento de la LTP temprana por estimulación de la amígdala (Jas et al., 2000).

Durante el envejecimiento, también pudieran haber disfunciones en la propia amígdala basolateral, debido a que ella recibe una importante aferencia colinérgica del núcleo basal magnocelular, y en este núcleo también hay pérdida de células con el envejecimiento (van der Zee EA and Luiten, 1999). Se conoce que los animales viejos con déficit cognitivo presentan una reducción del volumen de la amígdala (Soininen et al., 1994). En formas patológicas más severas, como en las fases iniciales de la enfermedad de Alzheimer, se aprecia una pérdida de neuronas en la amígdala, así como una reducción en las reacciones emocionales (Aggleton, 1993). De manera que la afectación pudiera ser doble: una directa, por pérdida de neuronas colinérgicas septales, y otra indirecta, por pérdida de la aferencia colinérgica de la amígdala, así como pérdida de neuronas en la propia amígdala, lo cual trae consigo probablemente, el deterioro de la plasticidad sináptica y el déficit cognitivo.

*La estimulación tetánica de la amígdala basolateral reduce la liberación de norepinefrina y serotonina, en tanto aumenta la de acetilcolina en las ratas jóvenes*

En general, en el Sistema Nervioso Central el glutamato es el transmisor excitatorio más abundante, y el GABA es el inhibitorio. Los demás neurotransmisores, aunque pueden excitar o inhibir directamente, parecen tener una función más importante modulando la transmisión de información, es decir pueden modificar la eficacia con que se transmite una señal de una neurona a otra (Dingledine and McBain, 1999; Taylor and Brown, 1999; Kuhar et al., 1999; Frazer and Hensler, 1999). El hecho de que se hayan encontrado modificaciones en la liberación de algunos transmisores neuromoduladores (acetilcolina, norepinefrina y serotonina), resulta significativo y sugiere de modo robusto que ellos pudieran estar implicados en el reforzamiento de la E-LTP por estimulación de la amígdala basolateral. Resultados anteriores han mostrado, que esta forma de reforzamiento es mediado por receptores muscarínicos y beta-adrenérgicos (Frey et al., 2001).

Resulta contradictorio que la estimulación de la amígdala haya provocado una reducción de la norepinefrina y un incremento en los niveles de acetilcolina cuando, justamente sucedió lo contrario en el estudio de la administración de norepinefrina y oxotremorina. Esto sugiere con

fuerza que los efectos reforzadores observados tras la administración de norepinefrina son producidos por acción de esta sustancia fuera del giro dentado. Apoya también nuestra suposición de que la ausencia de efecto reforzador para la oxotremorina fue consecuencia de una dosis insuficiente, más teniendo en cuenta, el enorme incremento en la liberación de ACh que acompaña la estimulación de la amígdala.

En el caso del reforzamiento motivacional, no se detectaron cambios en los niveles de los neuromoduladores, y por el contrario hubo una reducción en la liberación espontánea de glutamato y glicina. Estos hallazgos aparentemente contradictorios son de difícil interpretación a la luz de los conocimientos actuales, pero indican con claridad que en los mecanismos de reforzamiento motivacional intervienen otras estructuras además de la amígdala, incluso pudieran implicar mecanismos periféricos, como en el caso de la consolidación de la memoria.

Se sabe que el aprendizaje de tareas que utilizan estímulos apetitivos o aversivos son mejorados por adición de glucocorticoides o sus agonistas, en tanto los antagonistas dañan estas formas de aprendizaje (Roosendaal, 2000;Roosendaal et al., 2003). El efecto reforzador de los glucocorticoides es mediado por la amígdala (Roosendaal and McGaugh, 1997). Pudiera ser que el reforzamiento motivacional utilizado por nosotros, que es un estímulo apetitivo, induzca la liberación de glucocorticoides y que estos contribuyan también al reforzamiento motivacional de la E-LTP.

*El envejecimiento reduce los niveles basales de liberación de algunos neurotransmisores*

En las ratas viejas, nosotros encontramos una reducción en la liberación de algunos neurotransmisores en condiciones basales y lo que es quizás más importante, ninguna manipulación modificó de manera significativa la liberación de transmisores. Incluso la estimulación con potasio no logró incrementar la liberación de los transmisores estudiados. Otros autores han encontrado resultados similares.

Los animales viejos con una mala ejecución en el laberinto acuático tienen reducidos los niveles basales de liberación de acetilcolina, así como la liberación de acetilcolina inducida por agonistas serotoninérgicos (Lazaris et al., 2003). El incremento en la liberación de acetilcolina en la corteza, que inducen los ambientes novedosos en los animales jóvenes, se reduce a la mitad en los viejos (Giovannini et al., 1998), los cuales además tienen reducida la liberación basal. El incremento en los niveles extracelulares de acetilcolina y corticosterona en el hipocampo, inducido por el estrés se atenúa en los animales envejecidos (Takei et al., 1989; Mizuno and Kimura, 1997).

La estimulación de la corteza prefrontal medial produce un incremento en la liberación de glutamato, aspartato y glicina en la corteza prefrontal en las ratas jóvenes que no se da en los animales viejos (Cobo et al., 1993). De hecho, las concentraciones basales extracelulares se reducen notablemente (Zhang et al., 1991).

Los niveles de norepinefrina en el hipotálamo anterior se incrementan frente al estrés psicológico en los animales jóvenes. Sin embargo, en los animales envejecidos el incremento es sustancialmente menor (Wu et al., 1997). El incremento en la liberación de norepinefrina y los metabolitos de la dopamina inducido por altas concentraciones de potasio en el núcleo paraventricular del hipotálamo se atenúa con la edad (Hastings et al., 1996).

Por otro lado, el envejecimiento reduce los niveles basales de dopamina y DOPAC (Santiago et al., 1993; Gerhardt and Maloney, Jr., 1999), así como la liberación de dopamina y sus metabolitos inducida por el estrés en la corteza prefrontal (Del Arco et al., 2001), aunque la disminución en la recaptación pudiera compensar la reducción en la liberación (Hebert and Gerhardt, 1999). Incluso, variaciones más sutiles en los niveles de dopamina y sus metabolitos, como las circadianas, se reducen con el envejecimiento (Sano et al., 1992). También decrecen las cantidades liberadas de GABA (Corsi et al., 1999a), glutamato y aspartato (Corsi et al., 1999b) en el estriado, en respuesta a agonistas de adenosina A2A. Pudiera ser que en los animales viejos se produzca una modulación diferente por estos receptores o que varíe su densidad (Corsi et al., 1997). La apomorfina provoca un incremento en la liberación de glutamato y GABA en el núcleo estriado, el cual no se alcanza en los animales viejos (Porrás and Mora, 1995).

Una probable causa de la disminución en la liberación del neurotransmisor puede deberse al aumento de la rigidez de las membranas. La liberación del neurotransmisor en sinaptosomas de hipocampo de ratas viejas puede ser revertida por una dieta suplementaria con ácidos grasos omega-3 (McGahon et al., 1999). Este tipo de dieta parece reponer la pérdida de ácido docosahexanoico y ácido araquidónico, los cuales están relacionados con la fluidez de la membrana.

Algunos reportes muestran que el envejecimiento no modifica la recaptación de alta afinidad, ni la liberación de glutamato en respuesta a altas concentraciones de potasio, (Palmer et al., 1994). Tampoco modifica la de dopamina y sus metabolitos (Santiago et al., 1993; Stanford et al., 2000), aunque sí puede modificar sus concentraciones basales (Stanford et al., 2000). La estimulación eléctrica del núcleo basal de Meynert aumenta la liberación de acetilcolina e incrementa el flujo sanguíneo en la corteza del lóbulo parietal, tanto en ratas viejas como en las jóvenes (Kurosawa et al., 1989). La estimulación con altas concentraciones de potasio produce

un incremento en la liberación de acetilcolina tanto en ratas jóvenes como animales viejos con o sin déficit cognitivo (Fischer et al., 1991). Los niveles basales de acetilcolina no parecen afectarse con el envejecimiento, aunque sí su respuesta a altas concentraciones de potasio (Moore et al., 1996). Tampoco los niveles basales de glutamato y aspartato se modifican en los animales viejos (Cobo et al., 1992).

La capacidad del glutamato de incrementar la liberación de dopamina y GABA se mantiene intacta durante el envejecimiento en el estriado, pero no en el núcleo acumbens (Segovia et al., 1999).

Las contradicciones aparentes en la disminución o no de las concentraciones de neurotransmisores y sus metabolitos, pudieran depender de la edad de los animales, de las grandes diferencias individuales en el deterioro del funcionamiento cerebral durante envejecimiento, y de los métodos empleados para medir las concentraciones de los diferentes neurotransmisores.

La reducción en la liberación de algunos neurotransmisores y sobre todo el fallo en incrementar la liberación en respuesta a las manipulaciones empleadas, puede en parte explicar los resultados observados en los animales viejos. Los animales viejos con déficit cognitivo tienen reducida la duración de la E-LTP, así como los mecanismos de reforzamiento motivacional y por estimulación de la amígdala. Los animales viejos sin déficit cognitivo, en cambio, no manifiestan afectaciones en la E-LTP pero sí tienen dañado el reforzamiento. Pudiera ser que en los animales viejos con déficit cognitivo la mayor rapidez de decaimiento de la E-LTP guarde relación con los niveles reducidos de glutamato.

En el caso del reforzamiento, pudiera explicarse de modo similar. Según nuestros resultados y los de otros autores (Jas et al., 2000; Frey et al., 2001) la norepinefrina y la acetilcolina podrían ser clave en estas dos formas de reforzamiento. La estimulación de la amígdala induce cambios en la liberación de acetilcolina y norepinefrina en los animales jóvenes. Como hemos mostrado, en los animales viejos con déficit cognitivo los niveles de estos transmisores no se modificaron con las manipulaciones realizadas, lo cual pudiera ser la causa del fallo en el reforzamiento. Resulta significativo que los niveles basales de colina, uno de los dos precursores de la síntesis de acetilcolina, estén reducido en los animales viejos. Esto pudiera implicar una reducción en la síntesis de esta sustancia y por tanto explicar, en parte, la ausencia de cambios en los niveles de acetilcolina como consecuencia de la estimulación de la amígdala encontrada en los animales jóvenes. Esta demostrado que las dietas suplementarias de colina o fosfatidilcolina mejoran el aprendizaje y esta última incrementa además el contenido de Ach en ratones con

bajo contenido de este neurotransmisor (Tees, 1999; Gibson and Blass, 2000). Aunque otros factores, como los mencionados anteriormente también pudieran influir.

De cualquier modo, nosotros no podemos concluir que sea la acetilcolina o la norepinefrina el neuromodulador involucrado en el reforzamiento de la E-LTP, debido a que nuestros resultados son contradictorios. Los estudios con los agonistas sugieren a la norepinefrina pero descartan a la acetilcolina. En cambio, los resultados de la microdiálisis cerebral muestran incrementos en los niveles de acetilcolina y reducción de norepinefrina como consecuencia de la estimulación de la amígdala. Por supuesto, pudiera ser que lo importante sea la interacción entre los dos o la participación de ellos y de otros en una secuencia temporal, tal vez cronológica, de eventos. Queda, por tanto para el futuro, la determinación precisa de qué transmisores actuando sobre qué estructuras son los actores principales del reforzamiento afectivo.

#### INTERPRETACIÓN GENERAL

##### *La LTP, una aproximación experimental para comprender los mecanismos de la memoria*

Durante mucho tiempo se ha supuesto que en el procesamiento de información durante el aprendizaje tienen lugar modificaciones en la eficacia sináptica en los circuitos activados (Cajal, 1894; Cajal, 1911; Hebb, 1949). Justamente la LTP es un cambio duradero en la eficacia de la transmisión sináptica que depende de la actividad, de modo que satisface esta condición atribuida al proceso de aprendizaje y memoria. Por otra parte, existen múltiples evidencias que indican similitudes en los mecanismos moleculares de la LTP y la memoria (Martin and Morris, 2002). Por último, la LTP como la memoria puede ser consolidada por estímulos afectivos (Seidenbecher et al., 1995).

Nuestros resultados en su conjunto pueden ser explicados a través de la hipótesis de la marca sináptica (*synaptic tagging*) (Frey and Morris, 1997a). Según esta hipótesis, la inducción de una E-LTP en una población sináptica puede ser prolongada y convertida en una L-LTP, si se estimula una población sináptica independiente en la misma población neuronal. En nuestro caso la inducción de una E-LTP en giro dentado por estimulación de la vía perforante (primer estímulo: **I**, Fig. 39) establece una 'marca' transitoria en las sinapsis activadas [**II**]. La estimulación de la amígdala, la activación inducida por el estímulo motivacional o la norepinefrina añadida, pudieran inducir la síntesis de nuevas proteínas relacionadas con la plasticidad [**III**] en esa misma población neuronal. En esta activación está implicada la amígdala, la cual a su vez puede activar al *septum* y este a través de la vía fimbria/fornix (Jas et al., 2000) induce la síntesis de nuevas proteínas (neurotransmisor modulador). Las proteínas recién sintetizadas son 'capturadas' por las sinapsis activadas previamente (marca sináptica) [**IV**], en las cuales se insertan y prolongan la E-LTP más allá de las cuatro horas, esto es, la

convierte en una L-LTP. De este modo, un cambio transitorio en la eficacia de la transmisión sináptica puede convertirse en una modificación más duradera (Frey and Morris, 1997a; Frey and Morris, 1997b).

La participación de estos mecanismos en el aprendizaje y la memoria podría ocurrir del modo siguiente: la información sensorial que viene de la periferia, alcanza al tálamo y de aquí se distribuye a dos destinos. El primero implica a la corteza sensorial donde se originan sensaciones y percepciones complejas de esos estímulos. Esa información es luego transferida a cortezas polimodales como la corteza entorrinal y de ahí al hipocampo a través de la vía perforante. En el hipocampo se produce un cambio de conectividad transitorio que constituye la huella de memoria de esa información. El otro camino que puede recorrer la información sensorial a partir del tálamo es alcanzar la amígdala. Esta, a su vez, evalúa la información desde el punto de vista afectivo según este cause placer, desagrado o ninguna de ellas, en cuyo caso no se envían señales de reforzamiento. Cuando el nivel afectivo es elevado las señales límbicas, vía *septum* alcanzan al hipocampo e inducen la síntesis de nuevas proteínas y de ese modo consolidan el trazo de memoria. Así, la huella débil y efímera se convierte en una memoria más robusta y duradera (Fig. 39).

Con el envejecimiento se producen modificaciones morfológicas y funcionales que tienen como consecuencia, entre otros elementos, el fallo en los mecanismos del sistema límbico para provocar la consolidación de los cambios plásticos transitorios y tal vez, del mismo modo, los relacionados con la memoria. La reducción de la aferencia septal al hipocampo pudiera ser uno de los factores claves en este deterioro.

**Reforzamiento** de la E-LTP, tal vez de la memoria por la inducción de la síntesis de nuevas proteínas [III], las cuales se incorporan a las sinapsis ya activadas [IV].

Inducción de la E-LTP [I], que constituye la marca sináptica [II].

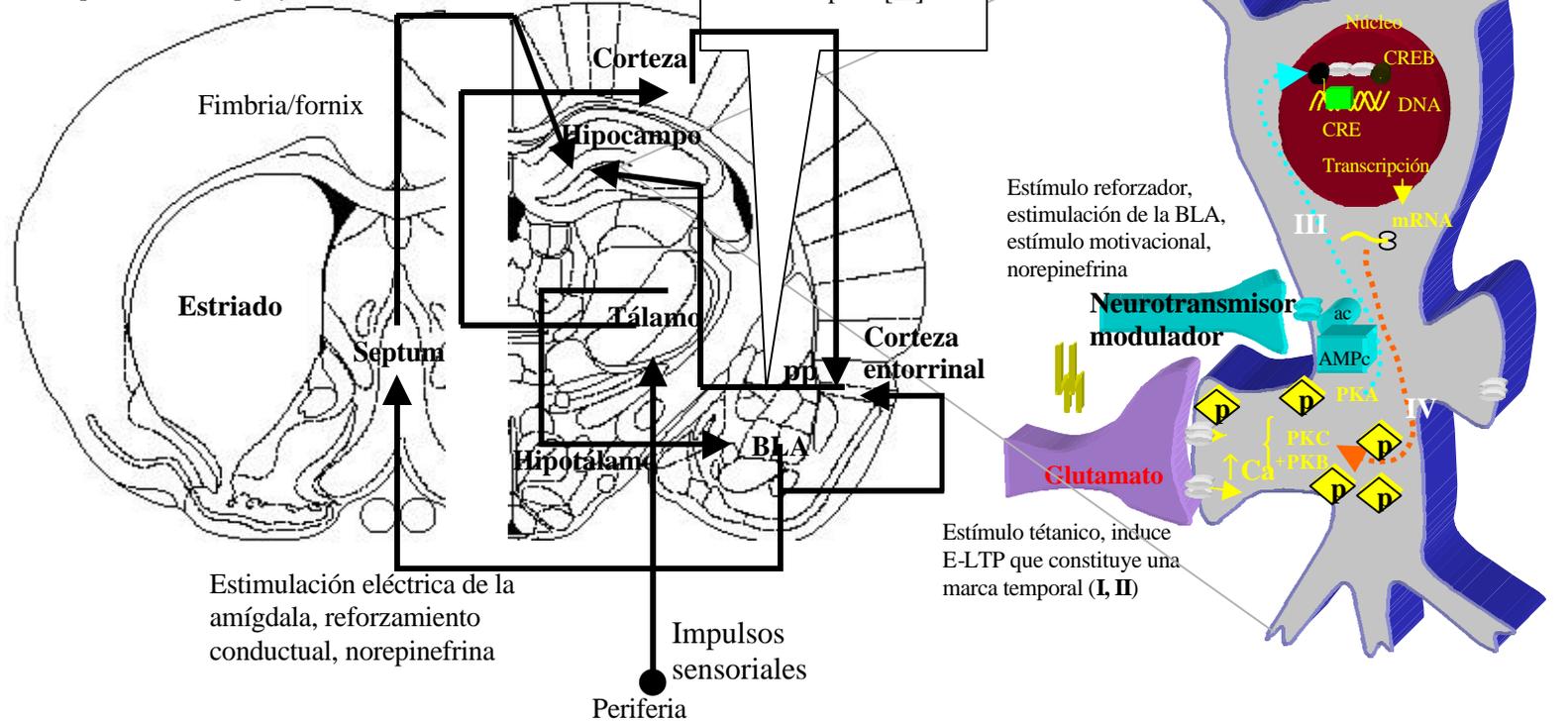


Fig. 39 Esquema que resume y explica nuestros hallazgos. Inducción de la E-LTP en giro dentado por estimulación de la vía perforante (pp), primer estímulo [I] establece una 'marca' transitoria en las sinapsis activadas [II]. La estimulación de la amígdala, la activación inducida por el estímulo emocional o la norepinefrina añadida pudiera inducir la síntesis de nuevas proteínas relacionadas con la plasticidad [III] en esa misma población neuronal. En esta activación esta implicada la amígdala (BLA), la cual a su vez puede activar el septum y este a través de la vía fimbria/fornix induce la síntesis de nuevas proteínas. Las proteínas recién sintetizadas son 'capturadas' por las sinapsis activadas previamente (marca sináptica) [IV], en las cuales se insertan y prolongan la E-LTP más allá de las cuatro horas, esto es la convierten en una L-LTP. De este modo, un cambio transitorio en la eficacia de la transmisión sináptica puede convertirse en una modificación más duradera. Con el aprendizaje y la memoria podría ocurrir de modo similar. La información sensorial, que viene de la periferia, alcanza al tálamo y aquí puede seguir dos destinos. Llegar a corteza sensorial primaria y luego a cortezas polimodales como la corteza entorrinal y de ahí al hipocampo a través de la vía perforante. En el hipocampo se produce un cambio de conectividad transitorio. El otro camino a partir del tálamo implica a la amígdala, esta a su vez puede activar el septum. El septum por su parte pudiera inducir la síntesis de nuevas proteínas y de ese modo consolidar un trazo de memoria frágil y de corta duración. De modo que se convierte en una memoria más robusta y duradera. Las representaciones de los cortes coronales corresponden a una posición respecto a bregma de 0.20 y - 3.30 mm respectivamente. A la derecha se muestra un esquema de una célula granular del giro dentado con los posibles eventos implicados en los reforzamientos de la E-LTP estudiados. Ac, adenilato ciclasa; CREB, cAMP response element binding protein; PKA, proteína cinasa activada por el AMP; PKB, proteína cinasa dependiente de calciocalmodulina; PKC, proteína cinasa C; p: proteínas relacionadas con la plasticidad.

#### CONSIDERACIONES FINALES

Finalmente nos parece importante discutir brevemente nuestros hallazgos y consideraciones en un marco gnoseológico general.

¿Por qué la memoria tiene que ser consolidada? ¿Por qué el proceso es lento? Las respuestas a ambas preguntas están íntimamente relacionadas. El Sistema Nervioso continuamente recibe y analiza información acerca de lo que sucede en el exterior y en el medio interno. Si la mayor parte de esta información fuera almacenada el sistema quedaría congestionado muy rápidamente. Por otra parte, ¿por qué almacenar información irrelevante? Evidentemente el sistema necesita evaluar y decidir qué información será almacenada, porque puede ser crítica y potencialmente útil para el futuro. El sistema límbico es la parte del Sistema Nervioso que realiza esta función. No se trata de que toda la información que se almacena esté determinada por el sistema límbico, si no de que él facilita el proceso de consolidación que de otra forma requeriría, probablemente, de numerosas exposiciones al estímulo. La lentitud del proceso de consolidación permite la modulación afectiva que facilita el proceso de consolidación de la información relevante (McGaugh, 2000), incluso cuando el animal ha sido expuesto sólo una vez a la experiencia (Maren, 1996;Kandel et al., 2000;Iversen et al., 2000).

Nuestros hallazgos confirman y aportan nuevas evidencias experimentales sobre la importancia del estado afectivo y de la función del sistema límbico en el proceso de consolidación de la memoria. Más aún, permiten proponer un mecanismo celular para explicar cómo podrían ser modulada la plasticidad sináptica por factores afectivos.

Además, permiten extender esos principios y conocimientos a otras esferas de interés. Recientemente, partiendo de los resultados aquí presentados, hemos encontrado que la estimulación de la amígdala 15 minutos después del entrenamiento puede mejorar el aprendizaje en animales con lesión de fimbria/fornix (resultados no publicados.). Este último hallazgo nos muestra como la activación de estructuras límbicas puede modular la actividad de otras áreas cerebrales propiciando no sólo la consolidación de memoria y la plasticidad sináptica, si no que también puede contribuir a la recuperación de funciones perdidas.

Los estudios en animales viejos demuestran que estos procesos están severamente afectados y pueden, por tanto ser causa de agravamiento de los trastornos cognitivos que acompañan el envejecimiento. Esto es importante por cuanto constituye la primera evidencia de que puede existir una relación funcional entre dos de las principales alteraciones del anciano: la pérdida de la memoria y la distonía afectiva.

Estudios ulteriores podrán aclarar, lo que ahora no hemos podido: el o los transmisores que median el reforzamiento afectivo de la plasticidad sináptica transitoria. Así irán emergiendo

poco a poco, en un devenir paciente e infinito, todos los factores estructurales y funcionales que subyacen en los procesos de la memoria y aprendizaje. Y ya no será más un fenómeno inasible y sobrenatural fuera absolutamente del conocimiento y de la ciencia. Con las revelaciones venideras aparecerán nuevas preguntas y misterios –porque el conocimiento sólo los aumenta y multiplica– que nos mantendrán siempre atónitos y escrutadores ante la maravilla de la existencia.

## **CONCLUSIONES**

1. La amígdala basolateral es un componente esencial en el sistema neural que interviene en el reforzamiento de procesos de plasticidad sináptica por factores afectivos.
2. El reforzamiento motivacional de la potenciación sináptica duradera se basa en mecanismos celulares que requieren de la síntesis de nuevas proteínas, de la misma forma que los procesos de memoria. Esto confirma la unidad de ambos tipos de procesos.
3. Es posible modular procesos de plasticidad sináptica duradera mediante la administración, en dosis adecuadas, de agonistas de sistemas neurotransmisores metabotrópicos. La norepinefrina, fue eficaz en bajas dosis, pero no la oxotremorina en el rango de dosis estudiadas.
4. Con el envejecimiento se deterioran los mecanismos de reforzamiento afectivo de los procesos de plasticidad sináptica, tanto cuando este se produce por estímulos motivacionales como cuando se estimula la región basolateral de la amígdala. Este deterioro parece estar funcionalmente vinculado a la pérdida de capacidades cognitivas que acompaña al envejecimiento.
5. Estos mecanismos involucran la participación de sistemas de neurotransmisores que se modulan de forma compleja, y diferente en los procesos de reforzamiento de la plasticidad sináptica por factores afectivos. Sistemas metabotrópicos como el norepinérfico y el colinérgico muscarínico parecen ser de los más relevantes. El envejecimiento abole esas variaciones lo cuál parece causalmente relacionado con el deterioro de los mecanismos de reforzamiento a edades avanzadas.

## **RECOMENDACIONES**

1. Confirmar el decremento de la actividad sináptica basal provocado por dosis bajas de norepinefrina y estudiar sus posibles mecanismos.
2. Estudiar si el efecto reforzador de la norepinefrina sobre la E-LTP es dependiente de la síntesis de proteínas, así como las vías y estructuras involucradas.
3. Estudiar el efecto de la oxotremorina en dosis superiores a las empleadas en este trabajo y de otros agonistas muscarínicos.
4. Estudiar el efecto de la administración de norepinefrina sobre el reforzamiento afectivo de la LTP en ratas viejas.

---

**BIBLIOGRAFÍA**

1. Abel T, Lattal KM (2001) Molecular Mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. *Curr Op Neurobiol* 11: 180-187.
2. Abel T, Nguyen PV, Barad M, Deuel TAS, Kandel ER (1997) Genetic demonstration of a role for PKA in the late phase of LTP and in hippocampus-based long-term memory. *Cell* 88: 615-626.
3. Aggleton JP (1993) The contribution of the amygdala to normal and abnormal emotional states. *Trends Neurosci* 16: 328-333.
4. Aggleton JP, Keith AB, Rawlins JNP, Hunt PR, Sahgal A (1992) Removal of the hippocampus and transection of the fornix produce comparable deficits on delayed non-matching to position by rats. *Behav Brain Res* 52: 61-71.
5. Agranoff BW, Cotman CW, Uhler MD (1999) Learning and memory. In: *Basic neurochemistry: Molecular, cellular and medical aspects* (Siegel GJ, Agranoff BW, Wayne Albers R, Fisher SK, Uhler MD, eds), pp 1027-1050. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers.
6. Akirav I, Richter-Levin G (1999) Priming stimulation in the basolateral amygdala modulates synaptic plasticity in the rat dentate gyrus. *Neurosci Lett* 270: 83-86.
7. Akirav I, Richter-Levin G (2002) Mechanisms of amygdala modulation of hippocampal plasticity. *J Neurosci* 9912-9921.
8. Almaguer Melian W, Jas García J, Francis Turner L, Antúnez Potashkina I, Bergado Rosado J (1999) Estudio comparativo de la lesión de fimbria-fornix por aspiración y transección. *Rev Neurol* 29: 704-709.
9. Almaguer-Melian W, Cruz-Aguado R, Bergado J (2000) Synaptic plasticity is impaired in rats with a low glutathione content. *Synapse* 38: 369-374.
10. Ammassari-Teule M, Pavone F, Castellano C, McGaugh JL (1991) Amygdala and dorsal hippocampus lesions block the effects of GABAergic drugs on memory storage. *Brain Res* 551: 104-109.
11. Andersen P, Bliss TV, Lomo T, Olsen LI, Skrede KK (1969) Lamellar organization of hippocampal excitatory pathways. *Acta Physiol Scand* 76: 4A-5A.
12. Andersen P, Bliss TV, Skrede KK (1971) Unit analysis of hippocampal population spikes. *Exp Brain Res* 13: 208-221.
13. Antoniadis EA, McDonald RJ (2000) Amygdala, hippocampus and discriminative fear conditioning to context. *Behav Brain Res* 108: 1-19.
14. Arai A, Lynch G (1992) Factors regulating the magnitude of long-term potentiation induced by theta pattern stimulation. *Brain Res* 598: 173-184.
15. Arbel I, Kadar T, Silbermann M, Levy A (1994) The effects of long-term corticosterone administration on hippocampal morphology and cognitive performance of middle-aged rats. *Brain Res* 657: 227-235.
16. Aston-Jones G, Rajkowski J, Ivanona S, Usher M, Cohen J (1998) Neuromodulation and cognitive performance: recent studies of noradrenergic locus ceruleus neurons in behaving monkeys. *Adv Pharmacol* 42: 755-759.
17. Aston-Jones G, Rajkowski J, Kubiak P (1997) Conditioned responses of monkey locus coeruleus neurons anticipate acquisition of discriminative behavior in vigilance task. *Neuroscience* 80: 715.
18. Auerbach JM, Segal M (1996a) Muscarinic receptors mediating depression and long-term potentiation in rat hippocampus. *J Physiol (Lond)* 492: 479-493.
19. Auerbach JM, Segal M (1996b) Muscarinic receptors mediating depression and long-term potentiation in the hippocampus in rat. *Journal physiology* 492: 479-493.
20. Bach ME, Barad M, Son H, Zhuo M, Lu YF, Shih R, Mansuy I, Hawkins RD, Kandel ER (1999) Age-related defects in spatial memory are correlated with defects in the late phase of hippocampal long-term potentiation in vitro and are attenuated by drugs that enhance the cAMP signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 5280-5285.

21. Bailey CH, Hawkins RD, Chen MC, Kandel ER (1981) Interneurons involved in mediation and modulation of gill- withdrawal reflex in Aplysia. IV. Morphological basis of presynaptic facilitation. *J Neurophysiol* 45: 340-360.
22. Bannerman DM, Yee BK, Good MA, Heupel MJ, Iversen SD, Rawlins JN (1999) Double dissociation of function within the hippocampus: a comparison of dorsal, ventral, and complete hippocampal cytotoxic lesions. *Behav Neurosci* 113: 1170-1188.
23. Barco A, Pittenger C, Kandel ER (2003) CREB, memory enhancement and the treatment of memory disorders: promises, pitfalls and prospects. *Expert Opin Ther Targets* 7: 101-114.
24. Barnes C (1993) Electrophysiological changes in hippocampus of aged rodents: Predictions for functional change in aged primate. *Neurobiol Aging* 14: 645-646.
25. Barnes CA (1979) Memory deficits associated with senescence: A neurophysiological and behavioural study in the rat. *J Comp Physiol Psychol* 93: 74-104.
26. Barnes CA, Jung MW, McNaughton BL, Korol DL, Andreasson K, Worley PF (1994) LTP saturation and spatial learning disruption: Effects of task variables and saturation levels. *J Neurosci* 14: 5793-5806.
27. Barnes CA, McNaughton BL (1985) An age comparison of the rates of acquisition and forgetting. *Behav Neurosci* 99: 1040-1048.
28. Barnes CA, Rao G, Houston FP (2000) LTP induction threshold change in old rats at the perforant path--granule cell synapse. *Neurobiol Aging* 21: 613-620.
29. Barnes CA, Rao G, McNaughton BL (1996) Functional integrity of NMDA-dependent LTP induction mechanisms across the lifespan of F-344 rats. *Learn Mem* 3: 124-137.
30. Barnes CA, Rao G, Shen J (1997) Age-related decrease in the N-methyl-D-aspartate<sub>R</sub>-mediated excitatory postsynaptic potential in hippocampal region CA1. *Neurobiol Aging* 18: 445-452.
31. Baron-Cohen S, Ring HA, Bullmore ET, Wheelwright S, Ashwin C, Williams SCR (2000) The amygdala theory of autism. *Neurosci Biobehav Rev* 24: 355-364.
32. Barria A, Muller D, Derkach V, Griffith LC, Soderling TR (1997) Regulatory phosphorylation of AMPA-type glutamate receptors by CaM-KII during long-term potentiation. *Science* 276: 2042-2045.
33. Bartus RT (2000) On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis. *Exp Neurol* 163: 495-529.
34. Bartus RT, Dean III RL, Beer B, Lippa AS (1982) The cholinergic hypothesis geriatric memory dysfunction. *Science* 217: 408-417.
35. Bergado Rosado JA, Almaguer Melian W (2000) Mecanismos celulares de la neuroplasticidad. *Rev Neurol* 31: 1074-1095.
36. Bergado JA, Fernández CI, Gómez-Soria A, González O (1997a) Chronic intraventricular infusion with NGF improves LTP in old cognitively-impaired rats. *Brain Res* 770: 1-9.
37. Bergado JA, Krug M, R:uthrich H, Matthies H (1988) Orotate improves memory and enhances synaptic long-term potentiation in active avoidance behaviour in rats with perforant path stimulation as the conditioned stimulus. *Eur J Pharmacol* 157: 155-163.
38. Bergado JA, Moreno H, Nuñez N (1996) Fimbria-fornix lesion impairs long-term potentiation in the dentate gyrus of the rat. *Biol Res* 29: 197-202.
39. Bergado JA, Moreno H, Soto J, Castellano O, Castillo L (1997b) Septal fetal tissue transplants restore long-term potentiation in the dentate gyrus of fimbria-fornix-lesioned rats. *J Neural Transplant Plast* 6: 31-40.
40. Bergles DE, Doze VA, Madison DV, Smith SJ (1996) Excitatory actions of norepinephrine on multiple classes of hippocampal CA1 interneurons. *Journal of Neuroscience* 16: 572-585.
41. Bernabeu R, Bevilacqua L, Ardenghi P, Bromberg E, Schmitz P, Bianchin M, Izquierdo I, Medina JH (1997) Involvement of hippocampal cAMP/cAMP-dependent protein kinase signaling pathways in a late memory consolidation phase of aversively motivated learning in rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 7041-7046.
42. Bernabeu R, Schmitz P, Faillace MP, Izquierdo I, Medina JH (1996) Hippocampal cGMP and cAMP are differentially involved in memory processing of inhibitory avoidance learning. *Neuroreport* 7: 585-588.

43. Berridge CW, Bolen SJ, Manley MS, Foote SL (1996) Modulation of forebrain electroencephalographic activity in halothane-anesthetized rat via actions of noradrenergic beta-receptors within the medial septal region. *J Neurosci* 16: 7010-7020.
44. Berridge CW, Espana RA (2000) Synergistic sedative effects of noradrenergic alpha(1)- and beta-receptor blockade on forebrain electroencephalographic and behavioral indices. *Neuroscience* 99: 495-505.
45. Bevilaqua L, Ardenghi P, Schröder N, Bromberg E, Schmitz PK, Schaeffer E, Quevedo J, Bianchin M, Walz R, Medina JH, Izquierdo I (1997) Drugs acting upon the cyclic adenosine monophosphate protein kinase A signalling pathway modulate memory consolidation when given late after training into rat hippocampus but not amygdala. *Behav Pharmacol* 8: 331-338.
46. Bianchin M, Mello, Medina JH, Izquierdo I (1999) The amygdala is involved in the modulation of long-term memory, but not in working or short-term memory. *Neurobiol Learn Mem* 71: 127-131.
47. Bianchin M, Walz R, Ruschel AC, Zanatta MS, Da Silva RC, Bueno e Silva M, Paczko N, Medina JH, Izquierdo I (1993) Memory expression is blocked by the infusion of CNQX into the hippocampus and/or the amygdala up to 20 days after training. *Behav Neural Biol* 59: 83-86.
48. Bianchin MM, Spanis CW, Roesler R, McGaugh JL, Izquierdo I (2000) (+/-)-Alpha-methyl-4-carboxyphenylglycine, a metabotropic glutamate receptor blocker, impairs retention of an inhibitory avoidance task in rats when infused into the basolateral nucleus of the amygdala. *Brain Res* 852: 436-443.
49. Bing GY, Filer D, Miller JC, Stone EA (1991) Noradrenergic activation of immediate early genes in rat cerebral cortex. *Brain Res Mol Brain Res* 11: 43-46.
50. Bing GY, Stone EA, Zhang Y, Filer D (1992) Immunohistochemical studies of noradrenergic-induced expression of c-fos in the rat CNS. *Brain Res* 592: 57-62.
51. Bland SK, Bland BH (1986) Medial septal modulation of hippocampal theta cell discharges. *Brain research* 375: 102-116.
52. Bliss TV, Gardner-Medwin AR (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol (Lond)* 232: 357-374.
53. Bliss TV, Lomo T (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol (Lond)* 232: 331-356.
54. Bliss TVP (1998) The saturation debate. *Science* 281: 1975-1976.
55. Bliss TVP, Collingridge GL (1993) A synaptic model of memory: Long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361: 31-39.
56. Borgdorff AJ, Choquet D (2002) Regulation of AMPA receptor lateral movements. *Nature* 417: 649-653.
57. Bramham CR, Bacher-Svendsen K, Sarvey JM (1997) LTP in the lateral perforant path is  $\beta$ -adrenergic receptor-dependent. *Neuroreport* 8: 719-724.
58. Brinton RE, McEwen BS (1989) Vasopressin neuromodulation in the hippocampus. *J Neurosci* 9: 752-759.
59. Brown TH, Zador AM (1990) Hippocampus. In: *The synaptic organization of the brain*. (Shepherd D, ed), pp 346-388. New York: Oxford University Press.
60. Buhot MC, Said N (1995) Changes in exploratory activity following stimulation of hippocampal 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>1B</sub>. *Hippocampus* 5: 198-208.
61. Burgard EC, Sarvey JM (1990) Muscarinic receptor activation facilitates the induction of long-term potentiation (LTP) in the rat dentate gyrus. *Neurosci Lett* 116: 34-39.
62. Buzsáki G (2002) Theta oscillations in the hippocampus. *Neuron* 33: 325-340.
63. Cajal SR (1894) La fine structure des centres nerveux. *Proc R Soc Lond* 55: 444-468.
64. Cajal SR (1911) *Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés*. Paris: Maloine.
65. Cammarota M, Bevilaqua LR, Viola H, Kerr DS, Reichmann B, Teixeira V, Bulla M, Izquierdo I, Medina JH (2002) Participation of CaMKII in neuronal plasticity and memory formation. *Cell Mol Neurobiol* 259-267.

66. Carew T, Castellucci VF, Kandel ER (1979) Sensitization in *Aplysia*: restoration of transmission in synapses inactivated by long-term habituation. *Science* 205: 417-419.
67. Carew TJ, Kandel ER (1973) Acquisition and retention of long-term habituation in *Aplysia*: correlation of behavioral and cellular processes. *Science* 182: 1158-1160.
68. Carew TJ, Walters ET, Kandel ER (1981) Associative learning in *Aplysia*: cellular correlates supporting a conditioned fear hypothesis. *Science* 211: 501-504.
69. Cassel JC, Neufang B, Kelche C, Aiple F, Will BE, Hertting G, Jackisch R (1992) Effects of septal and/or raphe cell suspension grafts on hippocampal choline acetyltransferase activity, high affinity synaptosomal uptake of choline and serotonin, and behavior in rats with extensive septohippocampal lesions. *Brain Res* 585: 243-254.
70. Cassel J-C, Duconseille E, Jeltsch H, Will B (1997) The fimbria-fornix/ cingular bundle pathways: a review of neurochemical and behavioural approaches using lesions and transplantation techniques. *Prog Neurobiol* 51: 663-716.
71. Castellucci VF, Blumenfeld H, Goelet P, Kandel ER (1989) Inhibitor of protein synthesis blocks long-term behavioral sensitization in the isolated gill-withdrawal reflex of *Aplysia*. *J Neurobiol* 20: 1-9.
72. Chetkovich DM, Sweatt JD (1993) NMDA receptor activation increases cyclic AMP in area CA1 of the hippocampus via calcium/calmodulin stimulation of adenylyl cyclase. *J Neurochem* 61: 1933-1942.
73. Cobo M, Exposito I, Mora F (1993) Aging, prefrontal cortex, and amino acid neurotransmitters: differential effects produced by electrical stimulation. *Neurobiol Aging* 14: 187-190.
74. Cobo M, Exposito I, Porras A, Mora F (1992) Release of amino acid neurotransmitters in different cortical areas of conscious adult and aged rats. *Neurobiol Aging* 13: 705-709.
75. Collingridge GL (1992) The mechanism of induction of NMDA receptor-dependent long-term potentiation in the hippocampus. *Exp Physiol* 77: 771-797.
76. Conner JM, Culbertson A, Packowski C, Chiba A, Tuszynsky MH (2003) Lesions of the basal forebrain cholinergic system impair task acquisition and abolish cortical plasticity associated with motor skill learning. *Neuron* 38: 819-829.
77. Conrad CD, LeDoux JE, Magarinos AM, McEwen BS (1999) Repeated restraint stress facilitates fear conditioning independently of causing hippocampal CA3 dendritic atrophy. *Behav Neurosci* 113: 902-913.
78. Corsi C, Melani A, Bianchi L, Pepeu G, Pedata F (1999a) Effect of adenosine A2A receptor stimulation on GABA release from the striatum of young and aged rats in vivo. *Neuroreport* 10: 3933-3937.
79. Corsi C, Melani A, Bianchi L, Pepeu G, Pedata F (1999b) Striatal A2A adenosine receptors differentially regulate spontaneous and K<sup>+</sup>-evoked glutamate release in vivo in young and aged rats. *Neuroreport* 10: 687-691.
80. Corsi C, Pazzagli M, Bianchi L, Della CL, Pepeu G, Pedata F (1997) In vivo amino acid release from the striatum of aging rats: adenosine modulation. *Neurobiol Aging* 18: 243-250.
81. Cremer H, Chazal G, Carleton A, Golidis C, Vincent JD, Lledo PM (1998) Long-term but not short-term plasticity at mossy fiber synapses is impaired in neural cell adhesion molecule-deficient mice [In Process Citation]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 13242-13247.
82. Cremer H, Chazal G, Lledo PM, Rougon G, Montaron MF, Mayo W, le MM, Abrous DN (2000) PSA-NCAM: an important regulator of hippocampal plasticity. *Int J Dev Neurosci* 18: 213-220.
83. Critchley H, Daly E, Phillips M, Brammer M, Bullmore E, Williams S, Van AT, Robertson D, David A, Murphy D (2000) Explicit and implicit neural mechanisms for processing of social information from facial expressions: a functional magnetic resonance imaging study. *Hum Brain Mapp* 9: 93-105.
84. Crutcher KA, Davis JN (2003) Hippocampal alpha- and beta-adrenergic receptors: comparison of [3H]dihydroalprenolol and [3H]WB 4101 binding with noradrenergic innervation in the rat. *Brain Res* 182: 107-117.
85. Curet O, De Montigny C (2003a) Electrophysiological characterization of adrenoceptors in the rat dorsal hippocampus I. Receptors mediating the effect of microiontophoretically applied norepinephrine. *Brain Res* 457: 46.

86. Curet O, De Montigny C (2003b) Electrophysiological characterization of adrenoceptors in the rat dorsal hippocampus II. Receptors mediating the effect of synaptically released norepinephrine. *Brain Res* 457: 47-57.
87. Da Cunha C, Roozendaal B, Vazdarjanova A, McGaugh JL (1999) Microinfusions of flumazenil into the basolateral but not the central nucleus of the amygdala enhance memory consolidation in rats. *Neurobiol Learn Mem* 72: 1-7.
88. Dachir S, Kadar T, Robinson B, Levy A (1997) Nimodipine's protection against corticosterone-induced morphological changes in the hippocampus of young rats. *Brain research* 748: 175-183.
89. Davidson RJ, Irwin W (1999) The functional neuroanatomy of emotion and affective style. *Trends Cognit Sci* 3: 11-21.
90. de Toledo-Morrell L, Geinisman Y, Morrell F (1988) Age-dependent alterations in hippocampal synaptic plasticity: relation to memory disorders. *Neurobiol Aging* 9: 581-590.
91. De JG, Farkas E, Stienstra CM, Plass JR, Keijsers JN, de la Torre JC, Luiten PG (1999) Cerebral hypoperfusion yields capillary damage in the hippocampal CA1 area that correlates with spatial memory impairment. *Neuroscience* 91: 203-210.
92. Del Arco A, Segovia G, Mora F (2001) Dopamine release during stress in the prefrontal cortex of the rat decreases with age. *Neuroreport* 12: 4019-4022.
93. Derkach V, Barria A, Soderling TR (1999) Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-kinase II enhances channel conductance of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate type glutamate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 3269-3274.
94. Deupree DL, Bradley J, Turner DA (1993) Age-related alterations in potentiation in the CA1 region in F344 rats. *Neurobiol Aging* 14: 249-258.
95. Dickinson-Anson H, McGaugh JL (1997) Bicuculline administered into the amygdala after training blocks benzodiazepine-induced amnesia. *Brain Res* 752: 197-202.
96. Dingledine R, McBain CJ (1999) Glutamate and Aspartate. In: *Basic neurochemistry: Molecular, cellular and medical aspects* (Siegel GJ, Agranoff BW, Wayne Albers R, Fisher SK, Uhler MD, eds), pp 315-334. Lippincott Williams & Wilkin.
97. Doherty P, Fazeli MS, Walsh FS (1995) The neural cell adhesion molecule and synaptic plasticity. *J Neurobiol* 26: 437-446.
98. Dunnett SB, Wareham AT, Torres EM (1993) Septal grafts improve acquisition of an operant timing task after fimbria-fornix lesions in rats: Role of the interval between lesion and transplantation surgeries. *Restor Neurol Neurosci* 5: 263-274.
99. Dunwiddie TV, Taylor M, Heginbotham LR, Proctor WR (1992) Long-term increases in excitability in the CA1 region of rat hippocampus induced by beta-adrenergic stimulation: possible mediation by cAMP. *J Neurosci* 12: 506-517.
100. Eichenbaum H (1997) Declarative memory: Insights from cognitive neurobiology. *Annu Rev Psychol* 48: 547-572.
101. Eichenbaum H (1999) The hippocampus and mechanisms of declarative memory. *Behav Brain Res* 103: 123-133.
102. Eichenbaum H, Schoenbaum G, Young B, Bunsey M (1996) Functional organization of the hippocampal memory system. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 13500-13507.
103. Estrada R, Pérez J (1986) *Neuroanatomía Funcional*. La Habana: Pueblo y Educación.
104. Fazeli MS, Breen K, Errington ML, Bliss TVP (1994) Increase in extracellular NCAM and amyloid precursor protein following induction of long-term potentiation in the dentate gyrus of anaesthetized rats. *Neurosci Lett* 169: 77-80.
105. Fazeli MS, Corbet J, Dunn MJ, Dolphin AC, Bliss TV (1993) Changes in protein synthesis accompanying long-term potentiation in the dentate gyrus in vivo. *J Neurosci* 13: 1346-1353.
106. Fedorov NB, Brown RE, Reymann KG (1997) Fast increases of AMPA receptor sensitivity following tetanus-induced potentiation in the CA1 region of the rat hippocampus. *Neuroreport* 8: 411-414.
107. Ferry B, McGaugh JL (1999) Clenbuterol administration into the basolateral amygdala post-training enhances retention in an inhibitory avoidance task. *Neurobiol Learn Mem* 72: 8-12.
108. Ferry B, Roozendaal B, McGaugh JL (1999a) Basolateral amygdala noradrenergic influences on memory storage are mediated by an interaction between beta- and alpha1-adrenoceptors. *J Neurosci* 19: 5119-5123.

109. Ferry B, Roozendaal B, McGaugh JL (1999b) Involvement of alpha1-adrenoceptors in the basolateral amygdala in modulation of memory storage. *Eur J Pharmacol* 372: 9-16.
110. Ferry B, Roozendaal B, McGaugh JL (1999c) Role of norepinephrine in mediating stress hormone regulation of long-term memory storage: a critical involvement of the amygdala. *Biol Psychiatry* 46: 1140-1152.
111. Fields RD, Itoh K (1996) Neural cell adhesion molecules in activity-dependent development and synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 19: 473-480.
112. Fischer W, Nilsson OG, Bjorklund A (1991) In vivo acetylcholine release as measured by microdialysis is unaltered in the hippocampus of cognitively impaired aged rats with degenerative changes in the basal forebrain. *Brain Res* 556: 44-52.
113. Fischer W, Sirevaag A, Wiegand SJ, Lindsay RM, Bjorklund A (1994) Reversal of spatial memory impairments in aged rats by nerve growth factor and neurotrophins 3 and 4/5 but not by brain-derived neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 8607-8611.
114. Flexner JB, Flexner LB, Stellar E (1963) Memory in mice is affected by intracerebral puromycin. *Science* 141: 51-59.
115. Foster TC (1999) Involvement of hippocampal synaptic plasticity in age-related memory decline. *Brain Res Brain Res Rev* 30: 236-249.
116. Foster TC, Norris CM (1997) Age-associated changes in Ca<sup>2+</sup>-dependent processes: relation to hippocampal synaptic plasticity. *Hippocampus* 7: 602-612.
117. Frazer A, Hensler JG (1999) Serotonin. In: *Basic neurochemistry: Molecular, cellular and medical aspects* (Siegel GJ, Agranoff BW, Wayne Albers R, Fisher SK, Uhler MD, eds), pp 263-292. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers.
118. Freund TF, Buzsáki G (1996) Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6: 347-470.
119. Frey S, Bergado JA, Frey JU (2003) Modulation of late phases of long-term potentiation in rat dentate gyrus by stimulation of the medial septum. *Neuroscience* 118: 1055-1062.
120. Frey S, Bergado JA, Seidenbecher T, Pape HC, Frey JU (2001) Reinforcement of early-LTP in dentate gyrus by stimulation of the basolateral amygdala: Heterosynaptic induction of late-LTP. *J Neurosci* 21: 3697-3703.
121. Frey S, Schweigert C, Krug M, Lossner B (1991a) Long-term potentiation induced changes in protein synthesis of hippocampal subfields of freely moving rats: time-course. *Biomed Biochim Acta* 50: 1231-40.
122. Frey U (1997) Cellular mechanisms of long-term potentiation: late maintenance. In: *Neural Network Models of Cognition: Biobehavioral Foundations* (Donahoe JW, Dorsel VP, eds), pp 105-128. Amsterdam: Elsevier Science Press.
123. Frey U, Frey S, Schollmeier F, Krug M (1996) Influence of actinomycin D, a RNA synthesis inhibitor, on long-term potentiation in rat hippocampal neurons *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Physiology* 490: 703-711.
124. Frey U, Huang Y-Y, Kandel ER (1993a) Effects of cAMP simulate a late stage of LTP in hippocampal CA1 neurons. *Science* 260: 1661-1664.
125. Frey U, Krug M, Reymann KG, Matthies H (1988) Anisomycin, an inhibitor of protein synthesis, blocks late phases of LTP phenomena in the hippocampal CA1 region *in vitro*. *Brain Res* 452: 57-65.
126. Frey U, Matthies H, Reymann KG (1991b) The effect of dopaminergic D1 receptor blockade during tetanization on the expression of long-term potentiation in the rat CA1 region *in vitro*. *Neurosci Lett* 129: 111-114.
127. Frey U, Morris RGM (1997a) Synaptic tagging and long-term potentiation. *Nature* 385: 533-536.
128. Frey U, Morris RGM (1997b) Synaptic tagging: implications for late maintenance of hippocampal long-term potentiation. *Trends Neurosci* 21: 181-188.
129. Frey U, Schollmeier K, Reymann KG, Seidenbecher T (1995) Asymptotic hippocampal long-term potentiation in rats does not preclude additional potentiation at later phases. *Neuroscience* 67: 799-807.
130. Frey U, Schroeder H, Matthies H (1990) Dopaminergic antagonists prevent long-term maintenance of posttetanic LTP in the CA1 region of rat hippocampal slices. *Brain Res* 522: 69-75.

131. Frey U, Seidenbecher T, Krug M (1993b) The action of the RNA- synthesis inhibitor actinomycin D on a late stage of LTP in hippocampal neurons in vivo and in vitro. *Soc Neurosci Abstr* 19: 912.
132. Froc DJ, Eadie B, Li AM, Wodtke K, Tse M, Christie BR (2003) Reduced Synaptic Plasticity in the Lateral Perforant Path Input to the Dentate Gyrus of Aged C57BL/6 Mice. *J Neurophysiol* ..
133. Frotscher M, Soriano E, Leranth C (1992) Cholinergic and GABAergic neurotransmission in the fascia dentata: electron microscopic immunocytochemical studies in rodents and primates. In: *The dentate gyrus and its role in seizures* (Ribak CE, Gall CM, Mody I, eds), pp 65-78. Amsterdam: Elsevier.
134. Furmark T, Fischer H, Wik G, Larsson M, Fredrikson M (1997) The amygdala and individual differences in human fear conditioning. *Neuroreport* 8: 3957-3960.
135. Garcia R, Jaffard R (1993) A comparative study of age-related changes in inhibitory processes and long-term potentiation in the lateral septum of mice. *Brain Res* 620: 229-236.
136. Garcia R, Vouimba RM, Jaffard R (1993) Spatial discrimination learning induces LTP-like changes in the lateral septum of mice. *Neuroreport* 5: 329-332.
137. Gasbarri A, Introini-Collison IB, Packard MG, Pacitti C, McGaugh JL (1993) Interaction of cholinergic-dopaminergic systems in the regulation of memory storage in aversively motivated learning tasks. *Brain Res* 627: 72-78.
138. Gasbarri A, Sulli A, Pacitti C, Puglisi-Allegra S, Cabib S, Castellano C, Introini-Collison I, McGaugh JL (1997) Strain-dependent effects of D<sub>2</sub> dopaminergic and muscarinic- cholinergic agonists and antagonists on memory consolidation processes in mice. *Behav Brain Res* 86: 97-104.
139. Geinisman Y, deToledo-Morrell L, Morrell F, Heller RE (1995) Hippocampal markers of age-related memory dysfunction: behavioral, electrophysiological and morphological perspectives. *Prog Neurobiol* 45: 223-252.
140. Gerhardt GA, Maloney RE, Jr. (1999) Microdialysis studies of basal levels and stimulus-evoked overflow of dopamine and metabolites in the striatum of young and aged Fischer 344 rats. *Brain Res* 816: 68-77.
141. Gibson GE, Blass JP (2000) Nutrition and brain function. In: *Basic of Neurochemistry: Molecular, cellular and medical aspects* (Siegel GJ, Agranoff BW, Wayne Albers R, Fisher SK, Uhler MD, eds), pp 691-709. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers.
142. Giovannini MG, Bartolini L, Kopf SR, Pepeu G (1998) Acetylcholine release from the frontal cortex during exploratory activity. *Brain Res* 784: 218-227.
143. Gray R, Johnston D (1987) Noradrenaline and beta-adrenoceptor agonists increase activity of voltage-dependent calcium channels in hippocampal neurons. *Nature* 327: 620-622.
144. Grecksch G, Matthies H (1980) Two sensitive periods for the amnesic effect of anisomycin. *Pharmacol Biochem Behav* 12: 663-665.
145. Grecksch G, Ott T, Matthies H (1980) The effect of intrahippocampally applied anisomycin on the retention of brightness discrimination in rats. *Behav Neural Biol* 29: 281-288.
146. Guyton AC, Hall JE (1997) *Tratado de fisiología Médica*. Healthcare Group.
147. Hannesson DK, Skelton RW (1998) Recovery of spatial performance in the Morris water maze following bilateral transection of the fimbria/formix in rats. *Behav Brain Res* 90: 35-56.
148. Harley CW, Lallies MD, Nutt DJ (1996) Estimating the synaptic concentration of norepinephrine in dentate gyrus which produces beta-receptor mediated long-lasting potentiation in vivo using microdialysis and intracerebroventricular norepinephrine. *Brain Res* 710: 293-298.
149. Hastings JA, Pavia JM, Morris MJ (1996) Altered in vivo catecholamine release in the hypothalamic paraventricular nucleus of the aged rat. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 353: 161-167.
150. Hatfield T, McGaugh JL (1999) Norepinephrine infused into the basolateral amygdala posttraining enhances retention in a spatial water maze task. *Neurobiol Learn Mem* 71: 232-239.
151. Hayashi Y, Ishida A, Katagiri H, Mishina M, Fujisawa H, Manabe T, Takahashi T (1997) Calcium- and calmodulin-dependent phosphorylation of AMPA type glutamate receptor subunits by endogenous protein kinases in the post-synaptic density. *Molecular Brain Research* 46: 338-342.

152. Hayashi Y, Shi SH, Esteban JA, Piccini A, Poncer JC, Malinow R (2000) Driving AMPA receptors into synapses by LTP and CaMKII: requirement for GluR1 and PDZ domain interaction. *Science* 287: 2262-2267.
153. Hebb DO (1949) *The organization of behaviour*. New York: Wiley & Sons.
154. Hebert MA, Gerhardt GA (1999) Age-related changes in the capacity, rate, and modulation of dopamine uptake within the striatum and nucleus accumbens of Fischer 344 rats: an *in vivo* electrochemical study. *J Pharmacol Exp Ther* 288: 879-887.
155. Heginbotham LR, Dunwiddie TV (1991) Long-term increases in the evoked population spike in the CA1 region of rat hippocampus induced by beta-adrenergic receptor activation. *J Neurosci* 11: 2519-2527.
156. Heinrichs SC, Stenzel-Poore MP, Gold LH, Battenberg E, Bloom FE, Koob GF, Vale WW, Pich EM (1996) Learning impairment in transgenic mice with central overexpression of corticotropin-releasing factor. *Neuroscience* 74: 303-311.
157. Herms J, Zurmöhle U, Brysch W, Schlingensiepen K-H (1993) Ca<sup>2+</sup>/calmodulin protein kinase and protein kinase C expression during development of rat hippocampus. *Dev Neurosci* 15: 410-416.
158. Hinoi E, Balcar VJ, Kuramoto N, Nakamichi N, Yoneda Y (2002) Nuclear transcription factors in the hippocampus. *Prog Neurobiol* 145-165.
159. Holscher C (2003) Time, space and hippocampal functions. *Rev Neurosci* 14: 253-284.
160. Hopkins WF, Johnston D (1988) Noradrenergic enhancement of long-term potentiation at mossy fiber synapses in the hippocampus. *J Neurophysiol* 59: 667-687.
161. Huang YY, Kandel ER (1994) Recruitment of long-lasting and protein kinase A-dependent long-term potentiation in the CA1 region of hippocampus requires repeated tetanization. *Learn Mem* 1: 74-82.
162. Huang Y-Y, Kandel ER (1995) D1/D5 receptor agonists induce a protein synthesis-dependent late potentiation in the CA1 region of the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 2446-2450.
163. Iga Y, Arisawa H, Ise M, Yasuda H, Takeshita Y (1996) Modulation of rhythmical slow activity, long-term potentiation and memory by muscarinic receptor agonists. *European Journal of Pharmacology* 308: 13-19.
164. Ikegami S (1994) Behavioral impairment in radial-arm maze learning and acetylcholine content of the hippocampus and cerebral cortex in aged mice. *Behav Brain Res* 65: 103-111.
165. Ikegaya Y, Abe K, Saito H, Nishiyama N (1995a) Medial amygdala enhances synaptic transmission and synaptic plasticity in the dentate gyrus of rats *in vivo*. *J Neurophysiol* 74: 2201-2203.
166. Ikegaya Y, Nakanishi K, Saito H, Abe K (1997a) Amygdala  $\beta$ -noradrenergic influence on hippocampal long-term potentiation *in vivo*. *Neuroreport* 8: 3143-3146.
167. Ikegaya Y, Saito H, Abe K (1994) Attenuated hippocampal long-term potentiation in basolateral amygdala-lesioned rats. *Brain Res* 656: 157-164.
168. Ikegaya Y, Saito H, Abe K (1995b) Amygdala N-methyl-D-aspartate receptors participate in the induction of long-term potentiation in the dentate gyrus *in vivo*. *Neurosci Lett* 192: 193-196.
169. Ikegaya Y, Saito H, Abe K (1995c) High-frequency stimulation of the basolateral amygdala facilitates the induction of long-term potentiation in the dentate gyrus *in vivo*. *Neurosci Res* 22: 203-207.
170. Ikegaya Y, Saito H, Abe K (1995d) Requirement of basolateral amygdala neuron activity for the induction of long-term potentiation in the dentate gyrus *in vivo*. *Brain Res* 671: 351-354.
171. Ikegaya Y, Saito H, Abe K (1996a) Dentate gyrus field potentials evoked by stimulation of the basolateral amygdaloid nucleus in anesthetized rats. *Brain research* 718: 53-60.
172. Ikegaya Y, Saito H, Abe K (1996b) The basomedial and basolateral amygdaloid nuclei contribute to the induction of long-term potentiation in the dentate gyrus *in vivo*. *Eur J Neurosci* 8: 1833-1839.
173. Ikegaya Y, Saito H, Torii K, Nishiyama N (1997b) Activin selectively abolishes hippocampal long-term potentiation induced by weak tetanic stimulation *in vivo*. *Jpn J Pharmacol* 75: 87-89.

174. Itier V, Bertrand D (2001) Neuronal nicotinic receptors: from protein structure to function. *FEBS Lett* 504: 118-125.
175. Iversen S, Kupfermann I, Kandel ER (2000) Emotional states and feelings. In: *Principles of neural science* (Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, eds), pp 982-997. McGraw-Hill, Health Professions Division.
176. Izquierdo I, Da Cunha C, Rosat R, Jerusalinsky D, Ferreira MBC, Medina JH (1992) Neurotransmitter receptors involved in post-training memory processing by the amygdala, medial septum, and hippocampus of the rat. *Behav Neural Biol* 58: 16-26.
177. Izquierdo I, McGaugh JL (1987) Retention impairment by posttraining epinephrine: role of state dependency and of endogenous opioid mechanisms. *Behav Neurosci* 101: 778-781.
178. Izquierdo I, Quillfeldt JA, Zanatta MS, Quevedo J, Schaeffer E, Schmitz PK, Medina JH (1997) Sequential role of hippocampus and amygdala, entorhinal cortex and parietal cortex in formation and retrieval of memory for inhibitory avoidance in rats. *Eur J Neurosci* 9: 786-793.
179. Jas J, Almaguer W, Frey JU, Bergado J (2000) Lesioning the fimbria-fornix impairs basolateral amygdala induced reinforcement of LTP in the dentate gyrus. *Brain Res* 861: 186-189.
180. Jerusalinsky D, Kornisiuk E, Izquierdo I (1997) Cholinergic neurotransmission and synaptic plasticity concerning memory processing. *Neurochem Res* 22: 507-515.
181. Kalin NH (1993) The neurobiology of fear. *Sci Am* 268: 94-101.
182. Kandel ER, Kupfermann I, Iversen S (2000) Learning and memory. In: *Principles of neural science* (Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, eds), pp 1227-1246. McGraw-Hill, Health Professions Division.
183. Kandel ER, Siegelbaum SA (2000a) Overview of synaptic transmission. In: *Principles of neural science* (Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, eds), pp 175-186. McGraw-Hill, Health Professions Division.
184. Kandel ER, Siegelbaum SA (2000b) Synaptic integration. In: *Principles of neural science* (Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, eds), pp 207-228. McGraw-Hill, Health Professions Division.
185. Katsuki H, Ishihara K, Shimada A, Takeda T, Satoh M (1990) Age-related deterioration of long-term potentiation in the CA3 and CA1 regions of hippocampal slices from the senescence-accelerated mouse. *Arch Gerontol Geriatr* 11: 77-83.
186. Katsuki H, Izumi Y, Zorumski CF (1997) Noradrenergic regulation of synaptic plasticity in the hippocampal CA1 region. *J Neurophysiol* 77: 3013-3020.
187. Kitchigina V, Vankov A, Harley C, Sara SJ (1997) Novelty-elicited, noradrenaline-dependent enhancement of excitability in the dentate gyrus. *Eur J Neurosci* 9: 41-47.
188. Klüver H, Bucy PC (1939) Preliminary analysis of the temporal lobes in monkeys. *Arch Neurol Psychiatr* 42: 979-1000.
189. Knauber J, Muller WE (2000) Decreased exploratory activity and impaired passive avoidance behaviour in mice deficient for the alpha(1b)-adrenoceptor. *Eur Neuropsychopharmacol* 10: 423-427.
190. Kolb B (1999) Towards an ecology of cortical organization: experience and the changing brain. In: *Neuronal plasticity: Building a bridge from the laboratory to the clinic*. (Grafman J, Christen Y, eds), pp 17-34. Berlin: Springer-Verlag.
191. Komiyama NH, Watabe AM, Carlisle HJ, Porter K, Charlesworth P, Monti J, Strathdee DJ, O'Carroll CM, Martin SJ, Morris RG, O'Dell TJ, Grant SG (2002) SynGAP regulates ERK/MAPK signaling, synaptic plasticity, and learning in the complex with postsynaptic density 95 and NMDA receptor. *J Neurosci* 9721-9732.
192. Krug M, Jork R, Reymann K, Wagner M, Matthies H (1991) The amnesic substance 2-deoxy-D-galactose suppresses the maintenance of hippocampal LTP. *Brain Res* 540: 237-242.
193. Krug M, Lössner B, Ott T (1984) Anisomycin blocks the late phase of long-term potentiation in the dentate gyrus of freely moving rats. *Brain Res Bull* 13: 39-42.
194. Kuhar MJ, Couceyro P, Lambert PD (1999) Catecholamines. In: *Basic neurochemistry: Molecular, cellular and medical aspects* (Siegel GJ, Agranoff BW, Wayne Albers R, Fisher SK, Uhler MD, eds), pp 243-259. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers.
195. Kupfermann I, Kandel ER, Iversen S (2000) Motivational and addictive states. In: *Principles of neural science* (Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, eds), pp 998-1013. McGraw-Hill, Health Professions Division.

196. Kurosawa M, Sato A, Sato Y (1989) Well-maintained responses of acetylcholine release and blood flow in the cerebral cortex to focal electrical stimulation of the nucleus basalis of Meynert in aged rats. *Neurosci Lett* 100: 198-202.
197. Lacaille JC, Harley CW (1985) The action of norepinephrine in the dentate gyrus: beta-mediated facilitation of evoked potentials in vitro. *Brain Res* 358: 210-220.
198. Landmesser L (1997) Synaptic plasticity: Fastening synapses by adhesion. *Curr Biol* 7: R28-R30.
199. Larson J, Wong D, Lynch G (1986) Patterned stimulation at the theta frequency is optimal for the induction of hippocampal long-term potentiation. *Brain Res* 368: 347-350.
200. Lawson VH, Bland BH (1993) The role of the septohippocampal pathway in the regulation of hippocampal field activity and behavior: analysis by the intraseptal microinfusion of carbachol, atropine, and procaine. *Exp Neurol* 120: 132-144.
201. Lazaris A, Bertrand F, Lazarus C, Galani R, Stemmelin J, Poirier R, Kelche C, Cassel JC (2003) Baseline and 8-OH-DPAT-induced release of acetylcholine in the hippocampus of aged rats with different levels of cognitive dysfunction. *Brain Res* 967: 181-190.
202. LeDoux JE (1993) Emotional memory systems in the brain. *Behav Brain Res* 58: 69-79.
203. LeDoux JE (1994) The amygdala: contribution to fear and stress. *Semin Neurosci* 6: 237.
204. Lee HK, Barbarosie M, Kameyama K, Bear MF, Huganir RL (2000) Regulation of distinct AMPA receptor phosphorylation sites during bidirectional synaptic plasticity. *Nature* 405: 955-959.
205. Lee HK, Takamiya K, Han JS, Man H, Kim CH, Rumbaugh G, Yu S, Ding L, He C, Petralia RS, Wenthold RJ, Gallagher M, Huganir RL (2003) Phosphorylation of the AMPA Receptor GluR1 Subunit Is Required for Synaptic Plasticity and Retention of Spatial Memory. *Cell* 112: 631-643.
206. Levey AI, Edmunds SM, Hersch SM, Wiley RG, Heilman CJ (1995) Light and electron microscopic study of m2 muscarinic acetylcholine receptor in the basal forebrain of the rat. *J Comp Neurol* 3514: 339-356.
207. Lledo PM, Hjelmstad GO, Mukherji S, Soderling TR, Malenka RC, Nicoll RA (1995) Calcium calmodulin-dependent kinase II and long-term potentiation enhance synaptic transmission by the same mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 11175-11179.
208. Lomo T (1971a) Patterns of activation in a monosynaptic cortical pathway: the perforant path input to the dentate area of the hippocampal formation. *Exp Brain Res* 12: 18-45.
209. Lomo T (1971b) Potentiation of monosynaptic EPSPs in the perforant path-dentate granule cell synapse. *Exp Brain Res* 12: 46-63.
210. López Planes J, Almaguer Melian W, Jas García J, Bergado Rosado J (1999) Influencia de la frecuencia de estimulación sobre procesos de plasticidad sináptica en el giro dentado de la rata. *Arch Neurocién (Mex )* 4: 9-20.
211. Lössner B, Jork R, Krug M, Matthies H (1982) Protein synthesis in rat hippocampus during training and stimulation experiments. In: *Neural plasticity and memory formation* (Marsan CA, Matthies H, eds), pp 183-191. New York: Ravens Press.
212. Lössner B, Schweigert C, Pchalek V, Krug M, Frey S, Matthies H (1987) Training- and LTP-induced changes of protein synthesis in rat hippocampus. *Neurosci Suppl* 22: 9512.
213. Lupien SJ, Gaudreau S, Tchiteya BM, Maheu F, Sharma S, Nair NPV, Hauger RL, McEwen BS, Meaney MJ (1997) Stress-induced declarative memory impairment healthy elderly subjects: Relationship to cortisol reactivity. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 2070-2075.
214. Luscher C, Frerking M (2001) Restless AMPA receptors: implications for synaptic transmission and plasticity. *Trends Neurosci* 24: 665-670.
215. Lüthi A, Laurent J-P, Figurov A, Muller D, Schachner M (1994) Hippocampal long-term potentiation and neural cell adhesion molecules L1 and NCAM. *Nature* 372: 777-779.
216. Lynch MA (1998) Analysis of the mechanisms underlying the age-related impairment in long-term potentiation in the rat. *Rev Neurosci* 9: 169-201.
217. Malinow R, Malenka RC (2002) AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 25:103-26.: 103-126.

218. Malleret G, Haditsch U, Genoux D, Jones MW, Bliss TV, Vanhoose AM, Weitlauf C, Kandel ER, Winder DG, Mansuy IM (2001) Inducible and reversible enhancement of learning, memory, and long-term potentiation by genetic inhibition of calcineurin. *Cell* 104: 675-686.
219. Maren S (1996) Synaptic transmission and plasticity in the amygdala - An emerging physiology of fear conditioning circuits. *Mol Neurobiol* 13: 1-22.
220. Martin SJ, Morris RG (2001) Cortical plasticity: It's all the range! *Curr Biol* 11: R57-R59.
221. Martin SJ, Morris RG (2002) New life in an old idea: the synaptic plasticity and memory hypothesis revisited. *Hippocampus* 609-636.
222. Martinez JL, Jensen RA, McGaugh JL (1983) Facilitation of memory consolidation. In: *The Physiological Basis of Memory* (Deutsch JA, ed), pp 49-70.
223. Matthies H (1974) The biochemical basis of learning and memory. *Life Sci* 15: 2017-2031.
224. Matthies H (1976) Cellular mechanisms of learning processes and the shaping of memory. *Z Psychol* 184: 308-328.
225. Matthies H (1988) From molecular mechanisms to behavior. *Activ nerv sup (Prague)* 30: 2-17.
226. Matthies H (1989a) In search of cellular mechanisms of memory. *Prog Neurobiol* 32: 277-349.
227. Matthies H (1989b) Neurobiological aspects of learning and memory. *Annu Rev Psychol* 40: 381-404.
228. Matthies H, Frey U, Krug M, Pohle W, Reymann KG, Rüttrich H (1990) Long-term synaptic potentiation and macromolecular changes in memory formation. *Ergebn exp Med* 51: 88-94.
229. Matthies H, Reymann KG, Krug M, Frey U, Loessner B, Popov N (1989) Multiple stages of posttetanic LTP and memory. In: *Fundamentals of memory formation: Neuronal plasticity and brain function* (Rahmann, ed), pp 395-396. Stuttgart, New York: Gustav Fischer Verlag.
230. Matthies H, Ruethrich H, Ott T, Matthies HK, Matthies R (1986) Low frequency perforant path stimulation as a conditioned stimulus demonstrates correlations between long-term synaptic potentiation and learning. *Physiol Behav* 36: 811-821.
231. McGaugh BM, Martin DS, Horrobin DF, Lynch MA (1999) Age-related changes in synaptic function: analysis of the effect of dietary supplementation with omega-3 fatty acids. *Neuroscience* 94: 305-314.
232. McGaugh JL (1966) Time-dependent processes in memory storage. *Science* 153: 1351-1358.
233. McGaugh JL (2002) Memory consolidation and the amygdala: a systems perspective. *Trends Neurosci* 25: 456-461.
234. McGaugh JL (2000) Memory-a century of consolidation. *Science* 287: 248-251.
235. McGaugh JL, Cahill L (1997) Interaction of neuromodulatory systems in modulating memory storage. *Behav Brain Res* 83: 31-38.
236. McGaugh JL, Cahill L, Roozendaal B (1996) Involvement of the amygdala in memory storage: Interaction with other brain systems. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 13508-13514.
237. McGaugh JL, McIntyre CK, Power AE (2002) Amygdala modulation of memory consolidation: interaction with other brain systems. *Neurobiol Learn Mem* 78: 539-552.
238. McGaughy J, Kaiser T, Sarter M (1996) Behavioral vigilance following infusions of 192 IgG-saporin into the basal forebrain: selectivity of the behavioral impairment and relation to cortical AChE-positive fiber density. *Behav Neurosci* 110: 247-265.
239. McKernan MG, Shinnick-Gallagher P (1997) Fear conditioning induces a lasting potentiation of synaptic currents in vitro. *Nature* 390: 607-611.
240. Meiri N, Rosenblum K (1998) Lateral ventricle injections of protein synthesis inhibitor anisomycin impairs long-term memory in a spatial memory task. *Brain research* 789: 48-55.
241. Miller S, Yasuda M, Coats JK, Jones Y, Martone ME, Mayford M (2002) Disruption of dendritic translation of CaMKIIalpha impairs stabilization of synaptic plasticity and memory consolidation. *Neuron* 507-519.

242. Milner B, Squire LR, Kandel ER (1998) Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron* 20: 445-468.
243. Milner TA, Lee A, Aicher SA, Rosin DL (2003) Hippocampal alpha2a-adrenergic receptors are located predominantly presynaptically but are also found postsynaptically and in selective astrocytes. *J Chem Neuroanat* 2: 115-139.
244. Mizuno T, Kimura F (1997) Attenuated stress response of hippocampal acetylcholine release and adrenocortical secretion in aged rats. *Neurosci Lett* 222: 49-52.
245. Mochida H, Sato K, Sasaki S, Yazawa I, Kamino K, Momose-Sato Y (2001) Effects of anisomycin on LTP in the hippocampal CA1: long-term analysis using optical recording. *Neuroreport* 12: 987-991.
246. Mody I, Leung P, Miller JJ (2003) Role of norepinephrine in seizure-like activity of hippocampal pyramidal cells maintained in vitro: alteration by 6-hydroxydopamine lesions of norepinephrine-containing systems. *Pol J Pharmacol Pharm* 61: 841-846.
247. Mody I, Otis TS, Bragin A, Hsu M, Buzsáki G (1995) GABAergic inhibition of granule cells and hilar neuronal synchrony following ischemia-induced hilar neuronal loss. *Neuroscience* 69: 139-150.
248. Moore H, Stuckman S, Sarter M, Bruno JP (1996) Potassium, but not atropine-stimulated cortical acetylcholine efflux, is reduced in aged rats. *Neurobiol Aging* 17: 565-571.
249. Morris RGM, Anderson E, Lynch GS, Baudry M (1986) Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* 319: 774-776.
250. Moser EI, Moser MB (1999) Is learning blocked by saturation of synaptic weights in the hippocampus? *Neurosci Biobehav Rev* 23: 661-672.
251. Mueller AL, Hoffer BJ, Dunwiddie TV (1981) Noradrenergic responses in rat hippocampus: evidence for mediation by alpha and beta receptors in the in vitro slice. *Brain Res* 214: 113-126.
252. Müller GE, Pilzecker A (1900) Experimentelle Beiträge zur Lehre vom Gedächtnis. *Z Psychol* 1: 1-288.
253. Nagahara AH, McGaugh JL (1992) Muscimol infused into the medial septal area impairs long-term memory but not short-term memory in inhibitory avoidance, water maze place learning and rewarded alternation tasks. *Brain Res* 591: 54-61.
254. Nguyen PV, Kandel ER (1996) A macromolecular synthesis-dependent late phase of long-term potentiation requiring cAMP in the medial perforant pathway of rat hippocampal slices. *J Neurosci* 16: 3189-3198.
255. O'Connor JJ, Rowan MJ, Anwyl R (1995) Tetanically induced LTP involves a similar increase in the AMPA and NMDA receptor components of the excitatory postsynaptic current: Investigations of the involvement of mGlu receptors. *J Neurosci* 15: 2013-2020.
256. Olsen RW, Delorey TM (2003) GABA and Glycine. book chapter.
257. Orr G, Rao G, Houston FP, McNaughton BL, Barnes CA (2001) Hippocampal synaptic plasticity is modulated by theta rhythm in the fascia dentata of adult and aged freely behaving rats. *Hippocampus* 11: 647-654.
258. Orsetti M, Casamenti F, Pepeu G (1996) Enhanced acetylcholine release in the hippocampus and cortex during acquisition of an operant behavior. *Brain Res* 724: 89-96.
259. Ott T, Malisch R, Destrade C (1983) Nachweis der transmitterspezifischen Modulation der langsamen rhythmischen Aktivität des Hippokampus. *Biomed Biochim Acta* 42: 967-979.
260. Ott T, Matthies H (1973) Some effects of RNA precursors on development and maintenance of long-term memory: hippocampal and cortical pre- and post-training application of RNA precursors. *Psychopharmacologia* 28: 195-204.
261. Ott T, Matthies H (1985) Some physiological aspects of the "Kamin-Deficit". In: Symposium on pharmacology of learning and retention (Knoll J, Knoll B, eds), pp 97-99. Budapest: Publishing house of the Hungarian Academy of science.
262. Ozawa S, Iino M, Tsuzuki K (1991) Two types of kainate response in cultured rat hippocampal neurons. *J Neurophysiol* 66: 2-11.
263. O'Keefe J (1993) Hippocampus, theta, and spatial memory. *Curr Biol* 3: 917-924.
264. O'Keefe J, Nadel L (1978) Physiology. In: *Hippocampus as a cognitive map* pp 141-190. Oxford: Oxford University Press.

265. Packard MG, Cahill L, McGaugh JL (1994) Amygdala modulation of hippocampal-dependent and caudate nucleus-dependent memory processes. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 8477-8481.
266. Palmer AM, Robichaud PJ, Reiter CT (1994) The release and uptake of excitatory amino acids in rat brain: effect of aging and oxidative stress. *Neurobiol Aging* 15: 103-111.
267. Papatheodoropoulos C, Kostopoulos G (1996) Age-related change in excitability and recurrent inhibition in the rat CA1 hippocampal region. *Eur J Neurosci* 8: 510-520.
268. Parfitt KD, Hoffer BJ, Browning MD (1991) Norepinephrine and isoproterenol increase the phosphorylation of synapsin I and synapsin II in dentate slices of young but not aged Fisher 344 rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 2361-2365.
269. Paxinos G, Watson C (1998) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. London: Academic Press.
270. Penfield W, Milner B (1958) Memory deficit produced by bilateral lesions in the hippocampal zone. *Arch Neurol Psychiat* 79: 475-479.
271. Poremba A, Gabriel M (1997) Amygdalar lesions block discriminative avoidance learning and cingulothalamic training-induced neuronal plasticity in rabbits. *J Neurosci* 17: 5237-5244.
272. Porras A, Mora F (1995) Dopamine-glutamate-GABA interactions and ageing: Studies in the striatum of the conscious rat. *European journal of neuroscience* 7: 2183-2188.
273. Quirarte GL, Roozendaal B, McGaugh JL (1997) Glucocorticoid enhancement of memory storage involves noradrenergic activation in the basolateral amygdala. *Proc Nat Acad Sci USA* 94: 14048-14053.
274. Quirk GJ, Armony JL, LeDoux JE (1997) Fear conditioning enhances different temporal compounds of tone-evoked spike trains in auditory cortex and lateral amygdala. *Neuron* 19: 613-624.
275. Radulovic J, Ruhmann A, Liepold T, Spiess J (1999) Modulation of learning and anxiety by corticotropin-releasing factor (CRF) and stress: differential roles of CRF receptors 1 and 2. *J Neurosci* 19: 5016-25017.
276. Rasmussen T, Schliemann T, Sorensen JC, Zimmer J, West MJ (1996) Memory impaired aged rats: no loss of principal hippocampal and subicular neurons. *Neurobiol Aging* 17: 143-147.
277. Reymann KG (1993) Mechanisms underlying synaptic long-term potentiation in the hippocampus: Focus on postsynaptic glutamate receptors and protein kinases. *Funct Neuro* 8: 7-32.
278. Rioult-Pedotti MS, Friedman D, Hess G, Donoghue JP (1998) Strengthening of horizontal cortical connections following skill learning. *Nat Neurosci* 1: 230-234.
279. Robinson GB, Racine RJ (1985) Long-term potentiation in the dentate gyrus: effects of noradrenaline depletion in the awake rat. *Brain Res* 325: 71-78.
280. Roesler R, Roozendaal B, McGaugh JL (2002) Basolateral amygdala lesions block the memory-enhancing effect of 8-Br-cAMP infused into the entorhinal cortex of rats after training. *Eur J Neurosci* 15: 905-910.
281. Rogan MT, Staubli UV, LeDoux JE (1997) Fear conditioning induces associative long-term potentiation in the amygdala. *Nature* 390: 604-607.
282. Rolls ET (2000) Memory systems in the brain. *Annu Rev Psychol* 51:599-630: 599-630.
283. Ronn LC, Berezin V, Bock E (2000) The neural cell adhesion molecule in synaptic plasticity and ageing. *Int J Dev Neurosci* 18: 193-199.
284. Ronn LCB, Bock E, Linnemann D, Jahnsen H (1995) NCAM-antibodies modulate induction of long-term potentiation in rat hippocampal CA1. *Brain Res* 677: 145-151.
285. Roozendaal B (2000) Glucocorticoids and the regulation of memory consolidation. *Psychoneuroendocrinology* 25: 213-238.
286. Roozendaal B, Brunson KL, Holloway BL, McGaugh JL, Baram TZ (2002a) Involvement of stress-released corticotropin-releasing hormone in the basolateral amygdala in regulating memory consolidation. *Proc Natl Acad Sci U S A* ..

287. Roozendaal B, Griffith QK, Buranday J, De Quervain DJ, McGaugh JL (2003) The hippocampus mediates glucocorticoid-induced impairment of spatial memory retrieval: Dependence on the basolateral amygdala. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 1328-1333.
288. Roozendaal B, McGaugh JL (1997) Basolateral amygdala lesions block the memory-enhancing effect of glucocorticoid administration in the dorsal hippocampus of rats. *Eur J Neurosci* 9: 76-83.
289. Roozendaal B, Nguyen BT, Power AE, McGaugh JL (1999a) Basolateral amygdala noradrenergic influence enables enhancement of memory consolidation induced by hippocampal glucocorticoid receptor activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 11642-11647.
290. Roozendaal B, Quirarte GL, McGaugh JL (1997) Stress-activated hormonal systems and the regulation of memory storage. *Ann NY Acad Sci* 821: 247-258.
291. Roozendaal B, Quirarte GL, McGaugh JL (2002b) Glucocorticoids interact with the basolateral amygdala beta-adrenoceptor--cAMP/cAMP/PKA system in influencing memory consolidation. *Eur J Neurosci* 15: 553-560.
292. Roozendaal B, Sapolsky RM, McGaugh JL (1998) Basolateral amygdala lesion block the disruptive effects of long-term adrenalectomy on spatial memory. *Neuroscience* 84: 453-465.
293. Roozendaal B, Williams CL, McGaugh JL (1999b) Glucocorticoid receptor activation in the rat nucleus of the solitary tract facilitates memory consolidation: involvement of the basolateral amygdala. *Eur J Neurosci* 11: 1317-1323.
294. R uthrich H, Matthies H, Ott T (1982) Long-term changes in synaptic excitability of hippocampal cell populations as a result of training. In: *Neural Plasticity Formation* (Marsan CA, Matthies H, eds).
295. Sah P, French CR, Gage PW (1985) Effects of noradrenaline on some potassium currents in CA1 neurones in rat hippocampal slices. *Neurosci Lett* 60: 295-300.
296. Salinas JA, Introini-Collison IB, Dalmaz C, McGaugh JL (1997) Posttraining intraamygdala infusions of oxotremorine and propranolol modulate storage of memory for reductions in reward magnitude. *Neurobiol Learn Mem* 68: 51-59.
297. Sandi C, Loscertales M, Guaza C (1997) Experience-dependent facilitating effect of corticosterone on spatial memory formation in the water maze. *European journal of neuroscience* 9: 637-642.
298. Sandi C, Rose SP (1997) Protein synthesis- and fucosylation-dependent mechanisms in corticosterone facilitation of long-term memory in the chick. *Behav Neurosci* 111: 1098-1104.
299. Sano A, Aoi K, Azekawa T, Sei H, Seno H, Morita Y (1992) Diurnal monoamine variation in young and old rats: a microdialysis study. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo) Spec No*: 577-580.
300. Santiago M, Machado A, Cano J (1993) Effects of age and dopamine agonists and antagonists on striatal dopamine release in the rat: an in vivo microdialysis study. *Mech Ageing Dev* 67: 261-267.
301. Sargent PB (1993) The diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Annu Rev Neurosci* 16: 403-443.
302. Scanziani M, G hwiler BH, Thompson SM (1993) Presynaptic inhibition of excitatory synaptic transmission mediated by  $\alpha$  adrenergic receptors in area CA3 of the rat hippocampus *in vitro*. *J Neurosci* 13: 5393-5401.
303. Scharf MT, Woo NH, Lattal KM, Young JZ, Nguyen PV, Abel T (2002) Protein synthesis is required for the enhancement of long-term potentiation and long-term memory by spaced training. *J Neurophysiol* 87: 2770-2777.
304. Schuster T, Krug M, Stalder M, Hackel N, Gerardy-Schahn R, Schachner M (2001) Immunoelectron microscopic localization of the neural recognition molecules L1, NCAM, and its isoform NCAM180, the NCAM-associated polysialic acid, beta1 integrin and the extracellular matrix molecule tenascin-R in synapses of the adult rat hippocampus. *J Neurobiol* 49: 142-158.
305. Segal M (1986) Properties of rat medial septal neurons recorded in vitro. *J Physiol* 379: 309-330.
306. Segal M, Auerbach JM (1997) Muscarinic receptors involved in hippocampal plasticity. *Life Sci* 60: 1085-1091.
307. Segal M, Greenberger V, Hofstein R (1981) Cyclic AMP-generating systems in rat hippocampal slices. *Brain Res* 213: 351-364.
308. Segovia G, Del Arco A, Mora F (1999) Effects of aging on the interaction between glutamate, dopamine, and GABA in striatum and nucleus accumbens of the awake rat. *J Neurochem* 73: 2063-2072.

309. Seidenbecher T, Balschun D, Reymann KG (1995) Drinking after water deprivation prolongs "unsaturated" LTP in the dentate gyrus of rats. *Physiol Behav* 57: 1001-1004.
310. Seidenbecher T, Reymann KG, Balschun D (1997) A post-tetanic time window for the reinforcement of long-term potentiation by appetitive and aversive stimuli. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 1494-1499.
311. Shapiro ML, Eichenbaum H (1999) Hippocampus as a memory map: synaptic plasticity and memory encoding by hippocampal neurons. *Hippocampus* 9: 365-384.
312. Shen JM, Barnes CA (1996) Age-related decrease in cholinergic synaptic transmission in three hippocampal subfields. *Neurobiol Aging* 17: 439-451.
313. Sherrington CS (1947) *The integrative action of the nervous system*. Cambridge: Cambridge University Press.
314. Shibata S, Kodama K, Koga Y, Ueki S, Watanabe S (1993) Improving effect of acetylcholine receptor agonists on a deficit of 2-deoxyglucose uptake in cerebral cortical and hippocampal slices in aged and AF64A-treated rats. *Brain Res* 603: 248-254.
315. Skelton RW, Scarth AS, Wilkie DM, Miller JJ, Phillips AG (1987) Long-term increases in dentate granule cell responsivity accompany operant conditioning. *J Neurosci* 7: 3081-3087.
316. Soderling TR (2000) CaM-kinases: modulators of synaptic plasticity. *Curr Op Neurobiol* 10: 375-380.
317. Soininen HS, Partanen K, Pitkänen A, Vainio P, Hänninen T, Hallikainen M, Koivisto K, Riekkinen PJ, Sr. (1994) Volumetric MRI analysis of the amygdala and the hippocampus in subjects with age-associated memory impairment: Correlation to visual and verbal memory. *Neurology* 44: 1660-1668.
318. Spanis CW, Bianchin MM, Izquierdo I, McGaugh JL (1999) Excitotoxic basolateral amygdala lesions potentiate the memory impairment effect of muscimol injected into the medial septal area. *Brain Res* 816: 329-336.
319. Stanford JA, Giardina K, Gerhardt GA (2000) In vivo microdialysis studies of age-related alterations in potassium-evoked overflow of dopamine in the dorsal striatum of Fischer 344 rats. *Int J Dev Neurosci* 18: 411-416.
320. Stanton PK, Heinemann U (1986) Norepinephrine enhances stimulus-evoked calcium and potassium concentration changes in dentate granule cell layer. *Neurosci Lett* 67: 233-238.
321. Stanton PK, Sarvey JM (1985a) Blockade of norepinephrine-induced long-lasting potentiation in the hippocampal dentate gyrus by an inhibitor of protein synthesis. *Brain Res* 361: 276-283.
322. Stanton PK, Sarvey JM (1985b) Depletion of norepinephrine, but not serotonin, reduces long-term potentiation in the dentate gyrus of rat hippocampal slices. *J Neurosci* 5: 2169-2176.
323. Stanton PK, Sarvey JM (1987) Norepinephrine regulates long-term potentiation of both the population spike and dendritic EPSP in hippocampal dentate gyrus. *Brain Res Bull* 18: 115-119.
324. Stäubli U, Faraday R, Lynch G (1985) Pharmacological dissociation of memory: anisomycin, a protein synthesis inhibitor, and leupeptin, a protease inhibitor, block different tasks. *Behav Neural Biol* 43: 287-297.
325. Straube T, Frey JU (2003) Involvement of alpha-adrenergic receptors in protein synthesis-dependent late long-term potentiation (ltp) in the dentate gyrus of freely moving rats: the critical role of the ltp induction strength. *Neuroscience* 119: 473-479.
326. Takei N, Nihonmatsu I, Kawamura H (1989) Age-related decline of acetylcholine release evoked by depolarizing stimulation. *Neurosci Lett* 101: 182-186.
327. Tamaru M, Yoneda Y, Ogita K, Shimizu J, Nagata Y (1991) Age-related decreases of the N-methyl-D-aspartate receptor complex in the rat cerebral cortex and hippocampus. *Brain Res* 542: 83-90.
328. Tan SE, Liang KC (1996) Spatial learning alters hippocampal calcium calmodulin-dependent protein kinase II activity in rats. *Brain research* 711: 234-240.
329. Tan S-E, Wenthold RJ, Soderling TR (1994) Phosphorylation of AMPA-type glutamate receptors by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* 14: 1123-1129.
330. Taylor P, Brown JH (1999) Acetylcholine. In: *Basic neurochemistry: Molecular, cellular and medical aspects* (Siegel GJ, Agranoff BW, Wayne Albers R, Fisher SK, Uhler MD, eds), pp 213-242. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers.

331. Tees RC (1999) The influences of rearing environment and neonatal choline dietary supplementation on spatial learning and memory in adult rats. *Behav Brain Res* 105: 173-188.
332. van der Zee EA, Luiten PG (1999) Muscarinic acetylcholine receptors in the hippocampus, neocortex and amygdala: a review of immunocytochemical localization in relation to learning and memory. *Prog Neurobiol* 58: 409-471.
333. Van Praag H, Kempermann G, Gage FH (2000) Neural consequences of environmental enrichment. *Nat Rev Neurosci* 1: 191-198.
334. Vankov A, Herve-Minvielle A, Sara SJ (1995) Response to novelty and its rapid habituation in locus coeruleus neurons of the freely exploring rat. *J Neurosci* 7: 1180-1187.
335. Vizi ES, Kiss JP (1998) Neurochemistry and pharmacology of the major hippocampal transmitter systems: synaptic and nonsynaptic interaction. *Hippocampus* 8: 566-607.
336. Walz R, Lenz G, Roesler R, Vianna MM, Martins V, Brentani R, Rodnight R, Izquierdo I (2000) Time-dependent enhancement of inhibitory avoidance retention and MAPK activation by post-training infusion of nerve growth factor into CA1 region of hippocampus of adult rats. *Eur J Neurosci* 12: 2185-2189.
337. Wang XJ (2001a) Neural oscillations. In: *Encyclopedia of Cognitive Science*. pp 1-15. Mac Millan Ref. Ltd.
338. Wang XJ (2001b) Pacemaker neurons for the theta rhythm and their synchronization in the septohippocampal reciprocal loop. *J Neurophysiol* 87: 889-900.
339. Weisz DJ, Clark GA (1984) Increased responsivity of dentate granule cells during nictitating membrane response conditioning in rabbit. *Behav Brain Res* 12: 145-154.
340. Wenk GL, Walker LC, Price DL, Cork LC (1991) Loss of NMDA, but not GABA-A, binding in the brains of aged rats and monkeys. *Neurobiol Aging* 12: 93-98.
341. Wetzel W, Getsova VM, Jork R, Matthies H (1980) Effect of serotonin on Y-maze retention and hippocampal protein synthesis in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 12: 319-322.
342. Wright JW, Krama'r EA, Meighan SE, Harding JW (2002) Extracellular matrix molecules, long-term potentiation, memory consolidation and the brain angiotensin system. *Peptides* 23: 221-246.
343. Wu YL, Tanaka M, Yoshida M, Yokoo H, Tanaka T, Tomita M, Ishikawa M (1997) Effect of aging on psychological stress-induced increases in noradrenaline release in the rat anterior hypothalamus: an in vivo microdialysis study. *Brain Res* 771: 347-350.
344. Yamamuro Y, Hori K, Tanaka J, Iwano H, Nomura M (1995) Septo-hippocampal cholinergic system under the discrimination learning task in the rat: A microdialysis study with the dual-probe approach. *Brain Res* 684: 1-7.
345. Yang HW, Lin YW, Yen CD, Min MY (2002) Change in bi-directional plasticity at CA1 synapses in hippocampal slices taken from 6-hydroxydopamine-treated rats: the role of endogenous norepinephrine. *Eur J Neurosci* 14: 1117-1128.
346. Yin JC, Del Vecchio M, Zhou H, Tully T (1995a) CREB as a memory modulator: induced expression of a dCREB2 activator isoform enhances long-term memory in *Drosophila*. *Cell* 81: 107-115.
347. Yin JC, Wallach JS, Wilder EL, Klingensmith J, Dang D, Perrimon N, Zhou H, Tully T, Quinn WG (1995b) A *Drosophila* CREB/CREM homolog encodes multiple isoforms, including a cyclic AMP-dependent protein kinase-responsive transcriptional activator and antagonist. *Mol Cell Biol* 15: 5123-5130.
348. Zhang WQ, Mundy WR, Thai L, Hudson PM, Gallagher M, Tilson HA, Hong JS (1991) Decreased glutamate release correlates with elevated dynorphin content in the hippocampus of aged rats with spatial learning deficits. *Hippocampus* 1: 391-397.
349. Zyzak DR, Otto T, Eichenbaum H, Gallagher M (1995) Cognitive decline associated with normal aging in rats: a neuropsychological approach. *Learn Mem* 2: 1-16.

## AUTOBIBLIOGRAFÍA

### *Autobibliografía relacionada con el tema de la tesis*

1. Almaguer-Melian, W., Martínez-Martí, L., Frey, J.U., and Bergado, J.A., The amygdala is part of the behavioral reinforcement system modulating long-term potentiation in rat hippocampus, *Neuroscience*, 119 (2003) 319-322.
2. Almaguer, W., Estupiñán, B., Frey, J.U., and Bergado, J.A., Aging impairs amygdala-hippocampus interactions involved in hippocampal LTP., *Neurobiol. Aging*, 23 (2002) 319-324.
3. Bergado, J.A., Almaguer, W., Ravelo, J., Rosillo, J.C., and Frey, J.U., Behavioral reinforcement of long-term potentiation is impaired in aged rats with cognitive deficiencies., *Neuroscience*, 108 (2001) 1-5.
4. Bergado, Jorge. A.; Almaguer-Melian, W.; Kostenko, Sergiy ; Frey, Sabine; Frey, Julietta U. (2003) Behavioral reinforcement of long-term potentiation in rat dentate gyrus *in vivo* is protein-synthesis dependent. *Neurosci. Lett.*, 351 (2003) 56-58.
5. W. Almaguer-Melian, R. Cruz-Aguado, C. de la Riva\*, K. Kendrick\* , J.U. Frey\*\*, J. Bergado. Effect of LTP-reinforcing paradigms on neurotransmitter systems in the dentate gyrus of young and aged animals. A microdialysis-biochemical study. *Hippocampus* (en preparación).

### *Autobibliografía no relacionada directamente con la tesis*

6. Almaguer-Melian, W., Cruz-Aguado, R., and Bergado, J., Synaptic plasticity is impaired in rats with a low glutathione content, *Synapse*, 38 (2000) 369-374.
7. Almaguer-Melian, W. and Bergado Rosado, J.A., Interactions between the hippocampus and the amygdala in synaptic plasticity processes. A key to understanding the relations between motivation and memory, *Rev. Neurol.*, 35 (2002) 586-593.
8. Almaguer Melian, W., Jas García, J., Francis Turner, L., Antúnez Potashkina, I., and Bergado Rosado, J., Estudio comparativo de la lesión de fimbria-fornix por aspiración y transección., *Rev. Neurol.*, 29 (1999) 704-709.
9. Bergado, J.A. and Almaguer-Melian, W., Aging and synaptic plasticity: a review, *Neural Plast.*, 9 (2002) 217-232.
10. Cruz-Aguado, R., Almaguer Melian, W., Díaz, C.M., Lorigados, L., and Bergado, J., Behavioral and biochemical effects of glutathione depletion in the rat brain., *Brain Res. Bull.*, 55 (2001) 327-333.
11. Cruz, R., Almaguer-Melian, W., and Bergado-Rosado, J.A., El glutatión en la función cognitiva y la neurodegeneración, *Rev. Neurol.*, 36 (2003) 877-886.

12. Jas, J., Almaguer, W., Frey, J.U., and Bergado, J., Lesioning the fimbria-fornix impairs basolateral amygdala induced reinforcement of LTP in the dentate gyrus., *Brain Res.*, 861 (2000) 186-189.
13. López Planes, J., Almaguer Melian, W., Jas García, J., and Bergado Rosado, J., Influencia de la frecuencia de estimulación sobre procesos de plasticidad sináptica en el giro dentado de la rata., *Arch. Neurocién. (Mex. )*, 4 (1999) 9-20.
14. Piñero, J., Cruz-Aguado, R., Almaguer-Melian, W., and Francis-Turner, L., Influence of nerve growth factor on striatal GABA and glutamate content in quinolinic acid-lesioned rats, *Arch. Neuroci.*, 7 (2002) 124-127.
15. Almaguer-Melian, W.; Vallejo, A.; Ramírez, M.; Capdevila, V.; Rosillo, J.C.; Bergado-Rosado, J.A. Estudio comparativo de la lesión bilateral de corteza entorrinal y de la fimbria-fórnix. *Rev. Neurol.*, 37 (2003) 619-622.
16. William Almaguer Melian, Reyniel Cruz Aguado, Yosvani Bouza y Jorge A. Bergado Rosado. Comparación de los efectos de la lesión de la fimbria-fornix y el estriado en una prueba de exploración de objetos. *Arch. Neuroci.*
17. Bergado Rosado JA, Almaguer Melian W (2000) Mecanismos celulares de la neuroplasticidad. *Rev Neurol* 31: 1074-1095.
18. María R. Castellanos, Jorge Aguiar, Caridad Ivett Fernández, William Almaguer, Carmen Mejias, Alfredo Varela. Evaluation of the Neurorestorative Effects of the Murine Beta-Nerve Growth Factor Infusions in Old Rat with Cognitive Deficit (en prensa).

#### *Presentaciones en eventos*

1. USA-Cuba Neurometing, La Habana, Octubre 20-23, 1999
  - ◆ Amygdala-hippocampal interaction in synaptic plasticity. Bergado, J.A. Almaguer-Melian, W.; Frey, J.U.
2. Xth International Neurobiological Symposium. Germany, octubre 2000
  - ◆ Bergado, J.; Almaguer, W.; Frey, S\*.; Frey, J.U. Aging impairs amygdala-hippocampus interactions in LTP
3. 2<sup>th</sup> Experimental Neurosciences Meeting: regeneration, plasticity and neural repair, La Habana, marzo 20-23, 2001.
  - Bergado, J.; Almaguer, W.; Frey, S\*.; Frey, J.U. Heterosynaptic interaction on late ltp phases of long-term potentiation in the hippocampus mechanisms and impairment by aging.
4. Evento conjunto de la ISN y la ASN. Agosto 26-31, 2001. Buenos Aires
  - Almaguer, W., Estupiñán, B., Frey, J.U., And Bergado, J.A. Aging impairs amygdala-hippocampus interactions involved in hippocampal LTP (poster)
5. Annual meeting of the society for neuroscience (USA). San Diego. Noviembre 2001
  - Bergado, J.; Almaguer, W.; Frey, S.; Frey, J.U. Heterosynaptic modulation of late phases of long-term potentiation in the hippocampus by limbic structures and their impairment by aging.

6. VII Escuela Latinoamericana de Neurociencias del 4-22 de marzo del 2002, Montevideo, Uruguay.
  - Almaguer, W., Estupiñán, B., Frey, J.U., And Bergado, J.A. Reforzamiento afectivo de procesos de plasticidad sináptica en el giro dentado del hipocampo
7. 6to Congreso Mundial de la IBRO, Praga, Julio 10-15, 2003
  - ◆ Effects of aging on limbic plasticity and affective modulation of LTP. Almaguer, W., Jas, J., Ravelo, J., Alvaré, A., Bergado, J., Frey, S., Frey, J.U.
8. VI Congreso Nacional de la Sociedad Cubana de Ciencias Fisiológicas. La Habana, Octubre 15 al 20 de 2001
  - ◆ Mesa Redonda: Neurociencias Experimentales en Cuba con el Tema: Plasticidad sináptica, memoria y envejecimiento. Bergado, J.A., Almaguer, W., Frey, J.U.
9. 3ra Conferencia de Neurología. Santiago de Cuba, Marzo 14-17 de 2002.
  - Bases fisiológicas de la memoria, su relación con los procesos afectivos y su deterioro con el envejecimiento. Bergado, J.A., Almaguer, W., Frey, J.U.
10. 2nd Cuba-Usa Neurosciences Meeting, La Habana, Enero 20-25, 2004
  - Motivation, cognition and synaptic plasticity.  
Jorge Bergado, William Almaguer<sup>1</sup> and Julietta U. Frey
11. 2nd Scientific Conference “Restauración Neurológica 2004”. La Habana Febrero 25-27
  - Motivational consolidation of LTP. Mechanisms and effects of aging  
Almaguer W., Bergado J.A., Frey S., Frey J

*Premio anual de la salud 2003.*

Parte del trabajo aquí presentado fue objeto de un premio en el concurso anual de salud del año 2003 en la categoría de Artículo Científico.

- Almaguer, W., Estupiñán, B., Frey, J.U., And Bergado, J.A. Aging impairs amygdala-hippocampus interactions involved in hippocampal LTP. (Premio al Nivel Nacional)

## AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer a todas las personas que hicieron realidad este trabajo de más de cinco años. Se sigue un orden alfabético-temático, tal vez caótico.

Gracias le doy:

a Abelito, Anzardo y Renato por su ayuda en las reparaciones y adaptaciones de cables y equipos  
a Araceli, Guillermo, Manuel y Erick por la atención y cuidados a los animales  
a Baby, Lisis y Juan Carlos por los estudios histológicos  
a Fernando por hacer más bellos nuestros días en el CIREN  
al Prof. Frank Coro, quien me mostro primero el fascinante mundo de la fisiología, por sus presiones a la tesis  
a Jennifer por su colaboración en el estudio del efecto del envejecimiento sobre el reforzamiento conductual  
a Ismael, Jesús y Guillermo, por la creación de artefactos y rediseños que propiciaron nuestro trabajo  
a Jorge Bergado, el gran provocador de todo este sueño, le agradezco la oportunidad de trabajar junto a él y todas las enseñanzas y conocimientos que me ha transmitido  
a Julieta Frey, por el equipamiento, los electrodos, los reactivos suministrados y por confiar en nosotros  
a Lazarita, por sus útiles señalamientos y por su fe en la calidad de nuestro trabajo  
a Lili Francis, quien me inició en el conocimiento de las pruebas conductuales y cuyas enseñanzas trato de mantener hasta hoy  
a Lourdes por haber realizado la oponencia de predefensa cuando nadie podía, por sus útiles sugerencias  
a Macias, por propiciar el mejoramiento científico de todos nosotros, por revisar el documento de tesis  
a Magali por su ayuda en el salón de cirugía experimental  
a Margarita por la minuciosa revisión que le hizo al documento de tesis  
a la profesora Martha Pérez por las bellas clases de fisiología, y por las buenas y exhaustivas recomendaciones para la tesis.  
a la oficiosa Mawi, todas sus emeradas atenciones en la Biblioteca  
a Maylen, las innumerables ocasiones que nos libró de los resabios de Windows y de las incertidumbres de la Red  
a Morejón, quien trabajó en el montaje del *set* para animales con libre movimiento  
a Nancy por estar siempre dispuesta a colaborar, por ayudarme a corregir el documento de tesis  
a Raquel y a Mirta por mantener limpio el laboratorio y por invitarme a una tasa de café de vez en vez  
a Reyniel, por su colaboración en la recolección de muestras y determinación de los neurotransmisores en el estudio de microdiálisis, por su amistad y por otras tantas aventuras  
a Xonia por su amable e inestimable ayuda con la estadística  
a Yeni y Armando por su colaboración en el estudio del efecto de la norepinefrina y la oxotremoriana sobre la LTP  
a Yosvani Bauza por su colaboración en la recolección de muestras y determinación de los neurotransmisores en el estudio de microdiálisis.  
a Maydelin, a ella más que agradecerle, le pido disculpas por todos los contratiempos, por todas las postergaciones y fiestas aguadas.

Muchas gracias a todos.