



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias
División de Ciencias Biológicas
Departamento de Ciencias Ambientales
INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS

Estudio experimental sobre la modulación serotoninérgica del ritmo theta hipocampal durante el curso temporal del aprendizaje espacial

TESIS

Que para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS DEL COMPORTAMIENTO
(Opción Neurociencias)

Presenta

María Esther Olvera Cortés

Comité tutelar:

Dr. Ignacio González Burgos (Director)

Dr. Miguel Ángel Guevara Pérez

Dra. Marisela Hernández González

Dra. Julieta Ramos Loyo

Guadalajara, Jalisco

Octubre de 2003

INDICE

RESUMEN	1-10
ABSTRACT	11-17
ANTECEDENTES	18-31
Orientación espacial.....	19
El hipocampo.....	22
Aferentes al hipocampo.....	24
Inervación colinérgica y serotoninérgica al hipocampo.....	26
El hipocampo y la memoria.....	31
Actividad eléctrica hipocampal.....	32
Modulación colinérgica y serotoninérgica del ritmo theta hipocampal.....	38
Evidencia experimental en el estudio del aprendizaje y la memoria de la información espacial.....	43
Sistemas de memoria de la información espacial.....	46
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	50
HIPÓTESIS	52
OBJETIVO GENERAL	53
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	53
MATERIAL Y MÉTODOS	56
Implantación de electrodos.....	56

Lesión de los aferentes serotoninérgicos del hipocampo.....	57
Evaluaciones conductuales.....	57
Registro del EEG hipocampal.....	59
Estudios histológicos.....	60
Bioquímica.....	61
Diagrama de flujo.....	63
Diseño experimental.....	65
Análisis estadístico.....	66
RESULTADOS	67
Histología.....	68
Neuroquímica.....	69
Aprendizaje de Lugar	
Conducta.....	71
Electroencefalograma.....	75
Aprendizaje de señal	
Conducta.....	94
Electroencefalograma.....	98
Aprendizaje egocéntrico	
Conducta.....	112
Electroencefalograma.....	114
Morfología.....	129
DISCUSIÓN	132
Histología.....	133
Neuroquímica.....	133

Conducta.....	135
Electroencefalograma.....	152
Citoarquitectura.....	173
DISCUSIÓN GENERAL.....	177
CONCLUSIONES.....	180
CONCLUSIÓN GENERAL.....	182
REFERENCIAS.....	183
NOTAS Y COMENTARIOS.....	197
PUBLICACIONES.....	200
• <i>Neurosci Lett</i> , 313:29-32, 2001.....	201
• Increase of the hippocampal theta activity in the Morris' maze is due to learning, rather than to motor activity. Esther Olvera-Cortés#, Miguel Angel Guevara+ and Ignacio González-Burgos*.	
ENVIADO A PUBLICACIÓN.....	205

RESUMEN

La capacidad de orientación espacial de los animales depende de la recolección y procesamiento de la información ambiental que se efectúa según la naturaleza de la misma, por diferentes substratos neurales. Las relaciones entre una señal prominente y una respuesta motora, y; las relaciones que establece el individuo entre su posición en el espacio y su propio movimiento corporal, son llamadas aprendizaje de señal (AS) y aprendizaje egocéntrico (AL), respectivamente. Ambos procesos dependen de un sistema de memoria del que forma una parte principal el cuerpo estriado. Un tercer tipo de aprendizaje espacial, el aprendizaje de lugar (AL) consiste en el procesamiento de la información espacial en la integración de una representación cognoscitiva del espacio o "mapa espacial", que permite al individuo localizar un objeto o lugar por la posición que guarda con respecto a la configuración de señales ambientales, y requiere de la función predominante del hipocampo. Por otro lado, se ha demostrado que la actividad eléctrica espontánea del hipocampo cambia en estrecha correlación a los cambios en la conducta de los individuos; así, durante ejecuciones relacionadas con la extracción activa de información ambiental predomina la actividad theta, cuya supresión afecta de manera adversa las pruebas que requieren el establecimiento de mapas espaciales sin afectar aquellas que requieren estrategias de resolución no hipocampales. Sin embargo, falta por establecer si la asociación de la actividad theta con las conductas voluntarias tiene un significado estrictamente motor o si esta expresión electrofisiológica de la función hipocampal está relacionada con el procesamiento de información espacial dependiente del hipocampo; lo cual podría ser diferenciado al evaluar a los animales en pruebas espaciales cuyos componentes estratégicos sean efectivamente dependientes del hipocampo, en comparación con el aprendizaje espacial adquirido por estrategias independientes de dicha región cerebral; y la relación de

cada una de ellas con la actividad theta presente en el hipocampo, concomitantemente al desarrollo temporal de la adquisición de la información.

Se ha demostrado que la actividad theta requiere de la integridad del sistema de neurotransmisión colinérgico para su existencia y que aquellas maniobras experimentales que interrumpen la función normal de este sistema, interfieren también con el aprendizaje de lugar y con la expresión de actividad theta hipocampal. Por otro lado se ha postulado la existencia de una actividad theta hipocampal resistente a la inhibición del sistema colinérgico que dependería presumiblemente del sistema de neurotransmisión serotoninérgico. A este respecto, algunos autores sugieren que existe una subdivisión de la actividad theta y que la sub-banda de baja frecuencia (4-7 Hz) depende de la actividad serotoninérgica aferente al hipocampo y que se presenta durante conductas voluntarias tipo 1 exclusivamente; mientras que la actividad theta de alta frecuencia (7-9 Hz) depende de la transmisión colinérgica aferente al hipocampo y se presenta tanto durante conductas tipo 1 como durante las tipo 2. Sin embargo, al respecto otros autores indican que no existe tal disociación farmacológica de la actividad theta hipocampal y que el núcleo del raquídeo medial es el único cuya actividad desincroniza el EEG hipocampal. Independientemente de cual sea el sentido de la regulación serotoninérgica sobre el hipocampo, es un hecho que existe una interacción funcional de las terminales serotoninérgicas y colinérgicas en dicha área cerebral, en la que se ha propuesto que la primera regula la actividad de la segunda.

Con respecto a la conducta se ha observado una participación poco clara del sistema serotoninérgico en la modulación del aprendizaje y la memoria y se ha reportado que la interferencia de la función serotoninérgica hipocampal o cerebral, facilita, impide o no altera el desempeño de los animales. Un factor determinante de estos resultados es el tipo de evaluación conductual que se traduce en el tipo y naturaleza de la información procesada por los individuos. Así dependiendo de la naturaleza de la información procesada podría esperarse un efecto particular de la

alteración de la función serotoninérgica sobre la ejecución de pruebas de aprendizaje y memoria. Particularmente en lo que respecta a la información espacial, se ha reportado que el abatimiento de serotonina no altera la ejecución en pruebas de AL, mientras que facilita la ejecución de pruebas con componentes egocéntricos predominantes y no se conoce el efecto de esta maniobra experimental sobre el desempeño en pruebas de AS. Por contraparte el incremento experimental de la función serotoninérgica produce deficiencias en el AL, y en el AS, mientras que no se conoce lo que podría ocurrir con respecto al AE.

Así mientras que se ha postulado la modulación serotoninérgica de la actividad theta hipocampal y se ha propuesto la existencia de un tipo de actividad theta dependiente de serotonina, se ha observado que la función serotoninérgica toma relevancia en condiciones de lesión del sistema colinérgico al cual regula estrechamente. También se ha esbozado una relación confusa entre la manipulación experimental de la serotonina y la función espacial. Así, mientras que por una parte aún no está clara cual es la participación de la serotonina en la modulación del EEG hipocampal en condiciones de reposo, no existen estudios acerca de las modificaciones que pudiesen ocurrir al evaluar la actividad EEG hipocampal concomitante a los procesos de aprendizaje que éste sustenta, con respecto a los que no dependen de su función, en condiciones de alteración del sistema serotoninérgico hipocampal (de existir tal participación). Además, las alteraciones fisiológicas que resultan de la desnervación serotoninérgica podrían modificar la citoarquitectura neuronal de las células piramidales del propio campo CA1; y faltaría demostrar la relación entre estas alteraciones y las resultantes en el patrón de disparo neuronal reflejadas en el EEG hipocampal.

En el presente trabajo se estudio la relación entre la actividad eléctrica hipocampal en su rango theta y la ejecución conductual de tres pruebas de orientación espacial, AL, AS y AE; de las cuales solamente el AL es dependiente del hipocampo. El estudio se realizó tanto en condiciones normales como en condiciones de disminución de las concentraciones de serotonina cerebral, con la

finalidad de identificar la modulación de la actividad theta concomitante a la conducta por parte de éste sistema de neurotransmisión con respecto a cada una de las estrategias conductuales. Para ello se utilizaron ratas macho de la cepa Sprague-Dawley de 350-450 g de peso que fueron implantadas crónicamente con electrodo bipolar concéntrico en el hipocampo derecho. Los animales experimentales recibieron microinyecciones de 5,7-dihidroxitriptamina en el haz del cíngulo y fimbria fórnix para eliminar la entrada aferente de serotonina específicamente al hipocampo, mientras que los del grupo control recibieron ácido ascórbico al 2% en solución salina como vehículo. Los animales fueron entrenados en un laberinto acuático de Morris, en el cual realizaron 4 ensayos diarios durante 6 días bajo tres paradigmas diferentes para evaluar el AL, el AS o el A E. Al final de cada prueba se realizó un ensayo de 30 segundos sin plataforma (prueba de transferencia) para verificar la estrategia desplegada por los animales en la resolución de la prueba. Se realizó la comparación de la latencia de escape, distancia y velocidad de nado del primer día con respecto a los siguientes para cada grupo y tipo de entrenamiento. Los registros de la actividad eléctrica se realizaron concomitantemente al entrenamiento conductual y para su análisis fueron divididos en tres etapas: basal, búsqueda y meta. El EEG hipocampal fue procesado mediante el análisis de Fourier y la potencia absoluta de la banda theta (4-12 Hz) fue obtenida. Posteriormente y a partir de ella se calculó la potencia relativa (PR) en cada sub-banda de frecuencia theta (4-6.5, baja frecuencia; 6.5-9.5, alta frecuencia y 9.5-12, máxima frecuencia). Se realizaron comparaciones de la PR entre el primer día de prueba y los subsecuentes para cada etapa de entrenamiento y banda de actividad theta. Así, mismo se realizaron comparaciones intergrupales por cada día de entrenamiento, etapa conductual y banda de frecuencia. Al finalizar las pruebas conductuales se realizó la verificación histológica de la posición del electrodo y de la lesión farmacológica, mientras que el contenido de serotonina hipocampal fue medido mediante cromatografía líquida de alta resolución. Se realizó el estudio morfológico de las neuronas piramidales de CA1

En el cual se consideraron los parámetros: densidad de espinas y proporción de tipos de espinas en las formas ancha, gorda, hongo, larga y ramificada.

Los animales del grupo experimental mostraron una reducción del 90 % de la serotonina hipocampal aunada a un incremento del recambio de serotonina de aproximadamente 30 veces con respecto al grupo testigo, por lo que el efecto resultante de la manipulación farmacológica sobre el grupo experimental fue el de una exacerbación de la actividad de la serotonina hipocampal. Sin embargo, el grupo control mostró una disminución moderada de serotonina hipocampal (50 %) como consecuencia de la aplicación del ácido ascórbico, por lo que este grupo representó el efecto de disminución de actividad serotoninérgica que no se produjo en el grupo experimental.

En cuanto al desempeño conductual, la disminución de la serotonina hipocampal no produjo efectos sobre el AL mientras que el incremento de la función serotoninérgica (grupo experimental) produjo una deficiencia moderada al inicio del aprendizaje, pero un ulterior desempeño normal. En la prueba de AS, la disminución de serotonina hipocampal sin modificaciones en la velocidad de utilización (grupo control) produjo un desempeño deficiente los últimos días de entrenamiento y a diferencia de los reportes de la literatura, nuestro grupo experimental que presentó un incremento de la actividad serotoninérgica suficiente para interferir con la adquisición de información espacial por parte del hipocampo, no mostró deficiencias en el AS. Con respecto a la prueba de AE nuestros resultados muestran que los animales del grupo testigo redujeron significativamente su latencia de escape desde el segundo día de entrenamiento mientras que los animales del grupo control lo hicieron hasta el tercer día de entrenamiento. Por su parte los animales del grupo experimental no redujeron significativamente su latencia de escape ningún día de entrenamiento con respecto al primero. Además, éstos animales mostraron incipiente tendencia espacial. De esta manera, nuestros resultados sugieren fuertemente la participación de la serotonina en la organización de la información egocéntrica y una posible

modulación cooperativa de la integración de información egocéntrica en mapas (durante la fase inicial del aprendizaje de lugar), así como, una modulación cooperativa a nivel hipocampal sobre el establecimiento de asociaciones estímulo-respuesta.

En cuanto a la actividad eléctrica, los tres grupos conductualmente deficientes mostraron la menor PR de alta frecuencia durante la búsqueda (AL, grupo experimental; AS, grupo control, y; A E, grupo experimental). Además, no hubo diferencias en la banda de alta frecuencia entre etapas para los animales entrenados en la prueba de aprendizaje de señales, lo que podría deberse a que no existe procesamiento predominante del hipocampo; sin embargo, sí fue necesaria una separación entre la banda de baja y alta frecuencia durante la búsqueda para que el procesamiento de esta información fuera eficiente.

En la comparación de la potencia total en cada sub-banda de frecuencia con respecto al día de entrenamiento, los animales entrenados en la prueba de AL mostraron una separación de bandas bien definida (diferencias significativas entre las tres bandas para cada día de entrenamiento en el sentido de que la PR de la banda de alta frecuencia fue mayor que la PR de la banda de baja frecuencia) para los grupos testigo y control, mientras que el grupo experimental no mostró ésta separación entre las bandas de baja y alta frecuencia los dos primeros días de entrenamiento, mismos en que su desempeño conductual fue deficiente con respecto al del grupo testigo. De ésta manera, podría existir una relación entre un patrón bien definido de bandas separadas (baja y alta frecuencia) y la eficiencia conductual, de manera que en aquellos días en que no alcanza a ser mayor la PR de alta frecuencia con respecto a la de baja frecuencia (tomando como conjunto las tres etapas conductuales) el desempeño conductual fue deficiente con respecto al de los animales testigo. Aunque esta interpretación debe ser explorada, en apoyo a ésta hipótesis los animales entrenados en la prueba de AS también mostraron una separación de bandas bien definida para el grupo testigo y experimental, pero no para el grupo control; mismo que presentó un desempeño conductual menos

eficiente que los otros dos grupos. Igualmente, en la prueba de AE los animales del grupo testigo mostraron una separación bien definida de la PR de las tres bandas todos los días de entrenamiento, mientras que los animales del grupo control mostraron dicha separación todos los días excepto el primero, y; paralelamente, a éste grupo le tomó un día más que al testigo establecer una disminución significativa de latencias. El grupo experimental mostró un patrón fluctuante de separación de bandas de manera que alternó días de separación con días sin separación de la PR de las bandas de baja y alta frecuencia. Concomitantemente a ello, este grupo de animales no logró reducir significativamente sus latencias de escape. Así, es notable un patrón repetitivo de pérdida de separación entre las bandas de baja y alta frecuencia durante malas ejecuciones conductuales en lo que respecta a las tres estrategias

En éste sentido los hallazgos derivados del presente estudio apuntan hacia una separación de bandas definida, como requisito para un procesamiento espacial óptimo, lo que podría estar relacionado con dicha razón ruido-síñal. De esta manera, la separación de las bandas de baja y alta frecuencia significaría una mayor actividad theta de alta frecuencia asociada con una afinación y activación selectiva de aquellas neuronas principales (piramidales) relacionadas con la codificación de información.

En las comparaciones intergrupales por banda y día de entrenamiento, los animales entrenados en la prueba de AE mostraron una mayor PR en la banda de baja frecuencia con respecto al grupo control, el segundo día de entrenamiento y una menor PR en la banda de alta frecuencia con respecto a los otros dos grupos los días 2 y 4 de entrenamiento. En la prueba de AS no hubo diferencias entre los grupos testigo y control ni entre el testigo y el experimental. En cambio, hubo una tendencia del grupo control a presentar menor actividad de alta frecuencia que sí fue significativa con respecto al grupo experimental, y este mismo grupo control fue conductualmente deficiente los últimos días de entrenamiento. No hubo diferencias intergrupales de PR en los animales entrenados en la prueba de AE.

Con respecto a las modificaciones en la citoarquitectura neuronal de las células piramidales del campo CA1 hipocampal, derivadas de las modificaciones en el patrón de innervación serotoninérgica; los resultados mostraron una menor densidad total de espinas para los grupos control y experimental con respecto al testigo. Con respecto al tipo de espinas dendríticas, encontramos que los grupos control y experimental mostraron una mayor proporción de espinas gordas con respecto al grupo testigo. Además, mientras que el grupo testigo tuvo una mayor proporción de espinas en hongo con respecto a las espinas gordas, ninguno de los grupos control y experimental mostró diferencias entre estos dos tipos de espinas. Así, ambos grupos control y experimental mostraron una disminución en la densidad de espinas y una proporción mayor de espinas menos eficientes en la transmisión del impulso nervioso, pero a partir de cambios opuestos en la excitabilidad de las neuronas. Este cambio de espinas más eficientes a espinas menos eficientes es un indicador de una menor eficacia en la transmisión sináptica puesto que se ha postulado que las espinas que tienen cuellos cortos -como las gordas- son menos proclives de sufrir LTP. Así, ambos grupos presentarían una menor probabilidad de sufrir LTP el cual se sabe, se produce preferentemente con estimulación que sigue el patrón de actividad theta de manera que existe una posible relación entre menor proporción de espinas eficientes, menor actividad theta de alta frecuencia (siempre que hubo pérdida de la separación de bandas) y menor capacidad de producción de LTP, en relación con el desempeño conductual deficiente tanto en animales control como en animales experimentales. De lo anterior, es importante recalcar que la modulación de la actividad eléctrica hipocampal dependió de manera predominante del tipo de información procesada por el hipocampo que de la manipulación experimental per se.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican por un lado que la serotonina está fuertemente involucrada en la modulación de los tres tipos de aprendizaje evaluados, pero que esta modulación involucra la actividad theta hipocampal solamente en las pruebas de aprendizaje de lugar (que depende del

hipocampo) y aprendizaje de señal (que ocurre con participación hipocampal). En ambas pruebas hubo una modificación en la expresión de la actividad theta luego de la alteración de la actividad serotoninérgica asociada al desempeño conductual deficiente. De manera que en la prueba de aprendizaje de lugar solamente el incremento de la función serotoninérgica alteró el patrón de actividad theta (disminuyó la actividad de alta frecuencia y aumentó la de baja frecuencia) y produjo deficiencias en la adquisición de la información por parte de los animales, aunque solo en la etapa temprana del entrenamiento. En la prueba de aprendizaje de señal, la disminución moderada de la concentración de serotonina hipocampal (grupo control) produjo deficiencias en la ejecución de la prueba (en los últimos días de entrenamiento) de manera que aunque lograron realizar el aprendizaje no lo hicieron al mismo nivel que los testigo, concomitantemente en estos animales la disminución de serotonina hipocampal produjo modificaciones del patrón de actividad theta (disminución de actividad de alta frecuencia e incremento de la actividad de baja frecuencia) que aunque no fue significativo con respecto al grupo testigo si lo fue con respecto al grupo experimental (cuya conducta no fue alterada), mientras que entre estos últimos no hubo diferencias. Por último los animales entrenados en la prueba de aprendizaje egocéntrico mostraron deficiencias solamente como resultado del incremento de la función serotoninérgica (grupo experimental) y estas deficiencias no estuvieron relacionadas con la actividad theta concomitante a la ejecución de la prueba ya que no mostraron modificaciones del patrón de actividad theta. Así parece existir una relación entre el patrón de actividad theta y el desempeño conductual solamente en aquellas pruebas que involucran la codificación allocéntrica del espacio (aprendizaje de lugar y de señal). Es importante recalcar que la maniobra experimental que alteró el patrón de actividad eléctrica y el desempeño conductual fue diferente en los dos tipos de aprendizaje, esto es, en el aprendizaje de lugar el incremento de la función serotoninérgica, mientras que, en aprendizaje de señal la disminución de la concentración de serotonina hipocampal; pero en ambos casos la

alteración del patrón de actividad eléctrica fue semejante. Así, parece haber una estrecha relación entre la eficiencia conductual y el patrón de actividad theta, mientras que el efecto de la manipulación del sistema serotoninérgico parece depender fuertemente del tipo de información procesada.

ABSTRACT

Spatial orientation ability depends on the acquisition and processing of environmental information by the subjects. It is carried out by different memory systems depending on the nature of the information. The association between one prominent cue and a motor response (stimulus-response association) is called cue learning (CL), while the orientation in the space based on the own body movement is known as egocentric learning (EL). Both classes of learning rely on the function of a memory system which includes the corpus striatum. A third class of spatial learning, the place learning (PL), is the ability of the individuals to establish a cognitive representation of the environment (a spatial map) based on the relationships between the groups of signals. This capacity depends on the function of a memory system which includes the hippocampus. The hippocampal EEG changes in close relationship with the kind of motor activity displayed by the animals. Thus, the theta activity predominates during the execution of movements related to extraction of environmental information, and its suppression adversely affects behavioral tests requiring the establishment of spatial maps, without affection of those tests requiring a non-hippocampal dependent strategy. However, a possible association between the spatial information processing by the hippocampus and the theta activity, independent of the underlying motor activity, remains unclear. This objective could be reached through the evaluation of the theta activity concomitant to the execution of three spatial tests, being hippocampal-dependent only one of them, but all three with the same motor demands.

It has been stated that theta activity requires of the integrity of the septo-hippocampal cholinergic system and also that those experimental approaches interfering with the hippocampal theta activity disrupts the place learning performance. On the other hand, the existence of a second type of theta activity independent from the cholinergic activity and putatively dependent on the

serotonergic neurotransmission has been proposed. In this sense, a sub-division of the theta activity in a serotonin-dependent low frequency (4-7 Hz) theta activity present during voluntary behaviors, and a cholinergic-dependent high frequency (7-9 Hz) theta activity present during both voluntary and reflexive behaviors has been proposed. However, other studies showed that there is not a sub-division of theta activity and that the raphe nucleus activity desynchronizes the hippocampal EEG. Independently of this controversy, the functional interaction between the serotonergic and cholinergic transmission upon the hippocampus is an accepted fact, in the sense that serotonin regulates the cholinergic system activity.

In regard to behavior, a controversial participation of the serotonin system in the regulation of the learning and memory has been observed. Thus, a facilitation, disruption, or lack of effect following the manipulation of the serotonergic system in the resolution of the spatial tasks, has been reported. A determinant factor in this controversy is related to the different tests applied in the evaluation of the serotonergic system and consequently, in the nature of the information processing involved in each corresponding test. Thus, depending of the nature of the information required in the resolution of a spatial task, a different effect of the serotonergic manipulation could be expected. In regard to the spatial information processing it has been observed that serotonin depletion does not modify the performance of PL tasks, while, a facilitation of tasks with prominent egocentric components has been reported. In the other sense, the increase of the serotonergic function leads to a deficient PL and CL performance.

Thus, while a serotonergic modulation of the hippocampal theta activity as well as the existence of a serotonin-dependent theta activity has been proposed, a relevant serotonin participation in the behavioral modulation under cholinergic lesion conditions has also been observed. In addition, a controversial relationship between the experimental manipulation of the serotonergic system and the spatial navigation has been reported. Thus, while the role of serotonin in the hippocampal EEG modulation is not clear, there are not studies related to the

relationship between the hippocampal theta activity, the alteration of the hippocampal serotonergic transmission, and the execution of both hippocampal dependent and non-dependent spatial tasks. Moreover, the physiological alterations induced by manipulation of the serotonergic system modifies the neuronal citoarchitecture of the CA1 pyramidal cells, and a relationship between this alterations and possible changes in the firing pattern of these cells reflected in the EEG activity, has not been examined.

In the present work we studied the relationship between the hippocampal electrical activity in the theta range and the behavioral performance in three spatial tests: PL, CL and EL. The study was conducted under alteration of the hippocampal serotonergic system conditions, in order to identify if a modulation of the theta activity concomitant to the behavioral performance by this system in regard to each one of the spatial strategies, exists.

A chronic recording electrode (bipolar concentric) was implanted in the right hippocampus of male Sprage-Dawley rats weighing 350-450 g. In order to destroy the serotonergic afferents to the hippocampus, microinjections of 5,7-Dihydroxytryptamine were applied in the fimbria fornix and the bundle of cingulum of the experimental animals, while 2% ascorbic acid diluted in saline solution was microinjected to control rats as vehicle. The rats were trained in the Morris maze, receiving four daily trials during six days under three different behavioral paradigms for the evaluation of PL, CL and EL. On the seventh day the rats received one trial of 30 second without platform (probe trial). The comparison of escape latency, distance swam and swimming velocity was made between the first and the subsequent training days for each group and training. The EEG records were taken concomitantly to the behavioral training and divided for their analysis in three behavioral stages: basal, searching and platform. The hippocampal EEG was processed using the FFT, and the absolute power from the theta band (4-12 Hz) was obtained. Thereafter, the relative power (RP) was calculated from the AP correspondingly to each sub-frequency band (4-6.5 Hz, low

frequency; 6.5-9.5 Hz high frequency; and 9.5-12 Hz, maximum frequency). Comparisons of the RP between the first day of training and the subsequent training days were made for each behavioral stage and sub-band of frequency. Intergroup comparisons of RP for each training day and each behavioral stage were made. Once the behavioral training had been concluded the rats were sacrificed and the histological verification of both the electrode position and the microinjections were made. Moreover, the serotonin concentration was measured using HPLC, and the morphological study of the CA1 pyramidal cells was also conducted, i.e., the spine density and the proportion of spines shape (wide, stubby, mushroom, thin and ramified).

The experimental animals showed a 90 % reduction in the hippocampal serotonin content of along with an increase of the serotonin turnover of 30 times regarding to the intact group. Based on this, the resultant effect of the pharmacological manipulation in the experimental group was an exacerbation of the hippocampal serotonergic activity. However, the control group showed a moderate decrease of the hippocampal serotonin content (50 %) as a consequence of the ascorbic acid injection. Thus, this group represented the effect of the decrease of hippocampal serotonin concentration which was not observed in the experimental group.

Regarding to the behavioral performance, the decrease of hippocampal 5-HT (control group) did not alter the performance of the rats in the PL task, while the increase in the serotonergic function (experimental group) produced an adverse effect in the early performance, although this rats reached the performance levels of the intact animals. In the CL test, the decrease of hippocampal serotonin resulted in a deficient performance, while the increase of serotonergic activity did not lead to behavioral alterations. As to EL tests, our results showed that the decrease in hippocampal serotonin did not alter the rats performance while, the increase of serotonergic activity resulted in a complete disruption of EL

performance. Moreover, these animals showed a spatial tendency in their probe trial.

Our results strongly suggest a role for the serotonergic system in the egocentric learning organization, in the integration of egocentric information into the structure of maps (in the early stage of the place learning), as well as, a cooperative modulation on the establishment of stimulus-response associations, at hippocampal level.

In the electrical activity results, we observed that the three groups behaviorally deficient showed lower RP in the high frequency sub-band during the searching of the platform (PL, experimental group; AS, control group, and; EL, experimental group). Moreover there were no differences in the RP of the high frequency sub-band between the three behavioral stages (basal, searching and platform) in the animals trained on the CL test. This could be due to this strategy does not require a predominant processing by the hippocampus; however, a difference between the high frequency and the low frequency RP during the searching of the platform was necessary for the accurate performance of this task.

In the comparison of RP for each sub-frequency band each training day, the animals of the intact and control groups trained in the PL task showed a difference between the high frequency and the low frequency RP all training days, while the animals of the experimental group did not show this difference between bands the two first days of training, also in these same days this animals showed behavioral deficiencies in comparison to the intact rats. Thus, a relationship between the separation between the RP of the low and high frequency sub-bands, and a good behavioral performance could exist, in a manner that those days in which this separation of bands is not present the animals were not efficient in the resolution of the task. This is supported by the fact that the rats trained in the CL task from the intact and the experimental groups showed a defined separation of bands, while, the control rats did not show the separation and were behaviorally deficient. In this sense, EL trained rats showed a well defined separation of bands but not the

experimental group which did not establish the EL. Thus, a notable repetition of a concomitant occurrence of lack of separation of bands and a deficient behavioral performance occurred, throughout all the training tasks.

Thus, a well defined separation of bands is required for the efficient behavioral performance. This separation of bands could imply that a higher high frequency activity is associated to the selective activation and tuning of those neurons related with the processing of spatial information.

Accordingly, the intergroup comparisons showed a minor RP in the high frequency band for the experimental group trained in the PL task, which showed a deficient behavioral performance; while in the CL task the control group showed minor RP in the high frequency band in regard to the experimental group and a tendency in the same direction in regard to the intact group. The control group also showed behavioral deficiencies and in the EL task differences in RP between groups were not observed.

The morphological study revealed that pyramidal neurons from the control and experimental groups had less spine density in regard to the intact group. Moreover, both control and experimental rats showed a higher proportion of stubby spines in comparison to the intact group. For on its part, the intact group showed a higher proportion of thin spines in comparison to stubby spines, and that was not observed in the other two groups.

Control and experimental animals showed a minor proportion of thin spines as well as a minor density of total spines. This change in the density and proportion of stubby spines could represent a reduction in the efficacy of the synaptic transmission since this spines are less capable of induce long term potentiation (LTP). This minor capability of produce LTP could be related to the decreased RP observed in that groups that showed impairments in the behavioral performance.

Finally, the results obtained in the present work indicates that the serotonin is related to the modulation of the PL, CL and EL, but this modulation only was

related to the hippocampal theta activity in the PL task (hippocampal-dependent) and CL task (hippocampal-related). For both strategies, the alteration in theta activity expression was related to a deficient behavioral performance following the alteration of the hippocampal serotonergic function. Interestingly, the experimental manipulation that induced the alteration of the theta expression was different for the two classes of task (PL, increase of the serotonergic activity; CL, decrease in hippocampal serotonin content), but in both tasks the consequences of such manipulations on the pattern of theta activity were similar, that is, a decrease in the RP of the high frequency band. Thus, a close relationship between the behavioral performance and the theta pattern is strongly suggested, while, the effect of increasing or decreasing the content of hippocampal serotonin upon the behavioral performance appear strongly dependent on the nature of the information processed.

ANTECEDENTES

Orientación espacial

La adaptación de los individuos a su entorno requiere del manejo y procesamiento de la información espacial procedente del mismo (Poucet, 1993). Las funciones espaciales están enmarcadas en el concepto de navegación espacial, definido por Gallistel en 1990 como el proceso de mantener un curso o trayectoria de un lugar a otro. Para ello es fundamental el uso de aquellos procesos que estiman la posición del individuo con respecto al mundo conocido (Trullier, y cols., 1997). La navegación espacial está definida por las respuestas a tres preguntas: ¿dónde estoy?, ¿Dónde están los otros lugares con respecto a mí? y, ¿cómo puedo ir a otros lugares desde aquí? (Trullier, y cols., 1997). Poucet en 1993 definió tres funciones espaciales: reconocimiento e identificación espacial, localización y memoria espacial, y planeación de acciones espaciales; con estas funciones, el sujeto es capaz de reconocer e identificar el medio en el que se desenvuelve, localizar objetos y lugares específicos y planear trayectorias en la solución de las demandas de sobrevivencia (Poucet, 1993). Tolman postuló en 1948 que los individuos no basan sus acciones en asociaciones estímulo-respuesta simples, sino que reorganizan internamente la información para formar una representación cognoscitiva del ambiente (“mapeo cognoscitivo”; Tolman, 1948); ello no implica que los individuos no hagan uso de asociaciones simples tales como respuestas específicas de aproximación a señales prominentes particulares o bien, asociaciones condicionales acerca de las consecuencias sensoriales de secuencias específicas de movimientos; las cuales, bajo algunas circunstancias pueden ser estrategias eficientes (Poucet, 1993). La navegación espacial no sería posible sin la habilidad básica de los individuos para aproximarse a objetos percibidos y tal habilidad es adquirida al aprender la coordinación motora, primero, en un espacio aprehensivo (espacios visual-motores tales como la coordinación ojo-extremidad u ojo-cabeza-extremidad-boca) y luego, en el espacio locomotor. Cuando tal habilidad es adquirida, podemos asumir que siempre que el objeto sea detectable

el animal es capaz primero de orientarse sobre la base de la información sensorial en dirección a la meta y luego será capaz de moverse hacia ella. En términos neuropsicológicos esta es una asociación típica estímulo-respuesta (Trullier, y cols., 1997).

O'keefe y Nadel (1978) postularon que los animales responden a un problema espacial mediante el uso de tres estrategias posibles:

- 1) Estrategias de dirección (de taxón o respuestas aloclínicas). En este tipo de respuestas los animales tienden a aproximarse a una señal directamente sobre o en dirección a la meta (sea un lugar con o sin recompensa) (McDonald y White, 1995) y corresponde al denominado aprendizaje de señal (McDonald y White, 1994). Este tipo de estrategias ha sido relacionado con un sistema de memoria que incluye al cuerpo estriado dorsal, presumiblemente encargado de adquirir este tipo de información.
- 2) Estrategias de respuesta (egocéntricas). Los animales aprenden a localizar un lugar específico sobre un laberinto y expresan una respuesta egocéntrica basada en su orientación y movimientos corporales (McDonald y White, 1995). Este tipo de información también ha sido relacionada con la actividad del cuerpo estriado.
- 3) Estrategias de posición (de lugar). El animal aprende a localizar un lugar o una recompensa preferentemente por la relación que guarda con las otras señales del ambiente. El uso de la información de esta manera es denominado aprendizaje de lugar ("mapeo" cognoscitivo) e implica la construcción de una representación cognoscitiva del ambiente. Este tipo de estrategias han sido relacionadas con el funcionamiento normal de un sistema de memoria que incluye al hipocampo (McDonald y White, 1995) (Figura 1).

ESTRATEGIAS ESPACIALES O'keffe y Nadel 1978

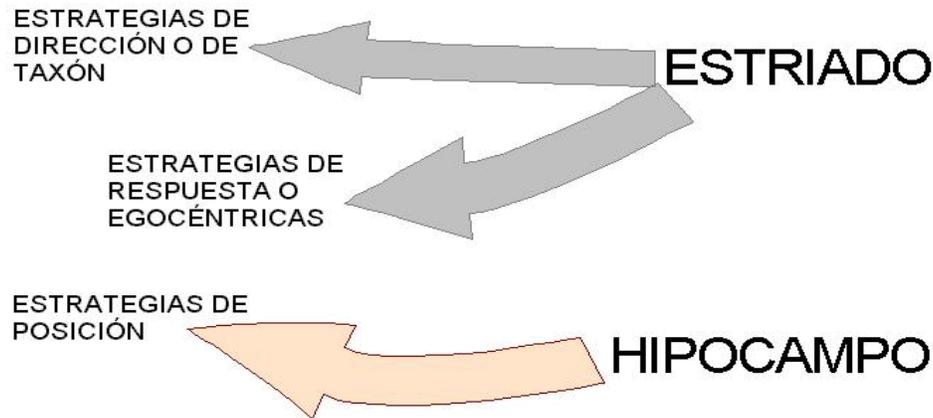


Figura 1. Estrategias espaciales y estructuras cerebrales subyacentes.

Los dispositivos utilizados en la evaluación experimental de los procesos de aprendizaje y memoria relacionados con el hipocampo son principalmente el laberinto radial de Olton y el laberinto acuático de Morris. Ambos enfrentan al animal a un problema que debe resolver haciendo uso de la información espacial emanada del conjunto de estímulos que forman su entorno. El laberinto acuático de Morris fue desarrollado originalmente para probar la capacidad de las ratas para aprender, recordar y localizar un espacio definido sólo por su posición con respecto a señales ambientales fuera del laberinto. Este dispositivo consiste en una tina circular llena con agua; en uno de los “cuadrantes” de la misma se coloca una plataforma que queda hundida unos centímetros por debajo de la superficie del agua de manera que el animal no puede verla aun cuando debe subir a ella para ponerse a resguardo. En el procedimiento estándar de evaluación la rata es colocada en el laberinto desde diferentes puntos de inicio de manera aleatoria, y dado que no existen señales dentro de la tina, el animal debe resolver el problema mediante una estrategia espacial (aprendizaje de lugar) y localizar la plataforma por la posición que guarda con respecto a la configuración de señales externas.

Otras estrategias posibles incluyen las de señal, en las que las ratas guían sus movimientos con relación a una sola señal en el ambiente que indique la posición de la plataforma (suele utilizarse la plataforma misma como señal) y; por último, estrategias egocéntricas mediante las que la rata responde de acuerdo a una secuencia específica de movimientos. Estas dos últimas, son menos eficientes. En el laberinto acuático se realiza además lo que se conoce como prueba de “transferencia”, en la que el animal una vez entrenado, es colocado en la tina sin plataforma, durante un periodo generalmente de 30 a 60 segundos. El uso de cada estrategia es revelado por el tiempo que la rata emplea en cada cuadrante y por las rutas de nado que despliega en su búsqueda. Cabe acotar que el uso de estrategias de señal es revelado por vías de nado que no muestran preferencia hacia ningún cuadrante en particular (McNamara y Skelton, 1993).

El hipocampo

Particularmente en el uso de estrategias de lugar, la actividad hipocampal juega un papel preponderante. El hipocampo es una estructura subcortical localizada dentro de un anillo de arquicorteza que rodea al sistema ventricular y que se conoce como corteza límbica (Noback y Demarest, 1975). El hipocampo es una estructura enrollada sobre si misma en ambos extremos que se localiza dorsoventralmente en un eje septotemporal, que se extiende, dorsalmente desde el septum, hasta la parte caudal de la amígdala en su extensión ventral (Noback y Demarest, 1975; Witter, 1989). Su eje longitudinal corre desde el polo septal hasta el temporal y su eje transversal está definido como el plano perpendicular al eje longitudinal (Witter, 1989) (Figura 2).

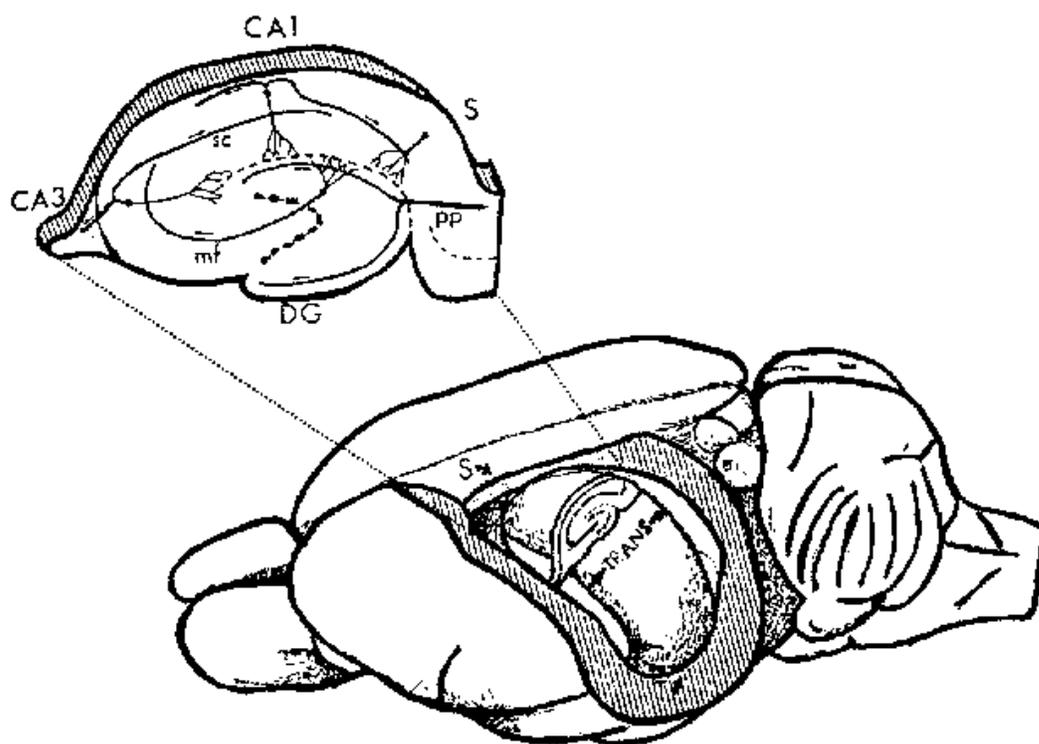


Figura 2. Representación esquemática de la localización topográfica del hipocampo de la rata en su eje septotemporal y de sus conexiones intrínsecas principales. CA1 y CA3, regiones del Cuerno de Ammón; S, núcleo septal; DG, giro dentado; TRANS, eje transversal del hipocampo; T, corteza temporal; pp, vía perforante; sc, colaterales de Shaffer; mf, fibras musgosas. Tomado de: Amaral, 1989.

Se distinguen tres regiones bien diferenciadas: 1) el cuerno de Ammón o hipocampo propiamente dicho, que incluye los campos CA1, CA2 y CA3, formados por una hilera continua de neuronas piramidales glutamatérgicas; 2) el giro dentado, formado por una hilera de neuronas granulares de naturaleza glutamatérgica, y; 3) la región hilar formada por células polimórficas también de naturaleza glutamatérgica. Es importante hacer la distinción entre “hipocampo” y “formación hipocampal”, ésta última, incluye a la corteza entorrinal y a la región subicular (Jarrad, 1993). La arquitectura básica de los subcampos hipocampales es muy similar; todos consisten de una capa de neuronas cuyas dendritas apicales se extienden a una zona de pocas células: el estrato radiado y el lacunoso-molecular,

en el cuerno de Ammón; y el estrato molecular en el giro dentado (Witter, 1989) (Figura 3).

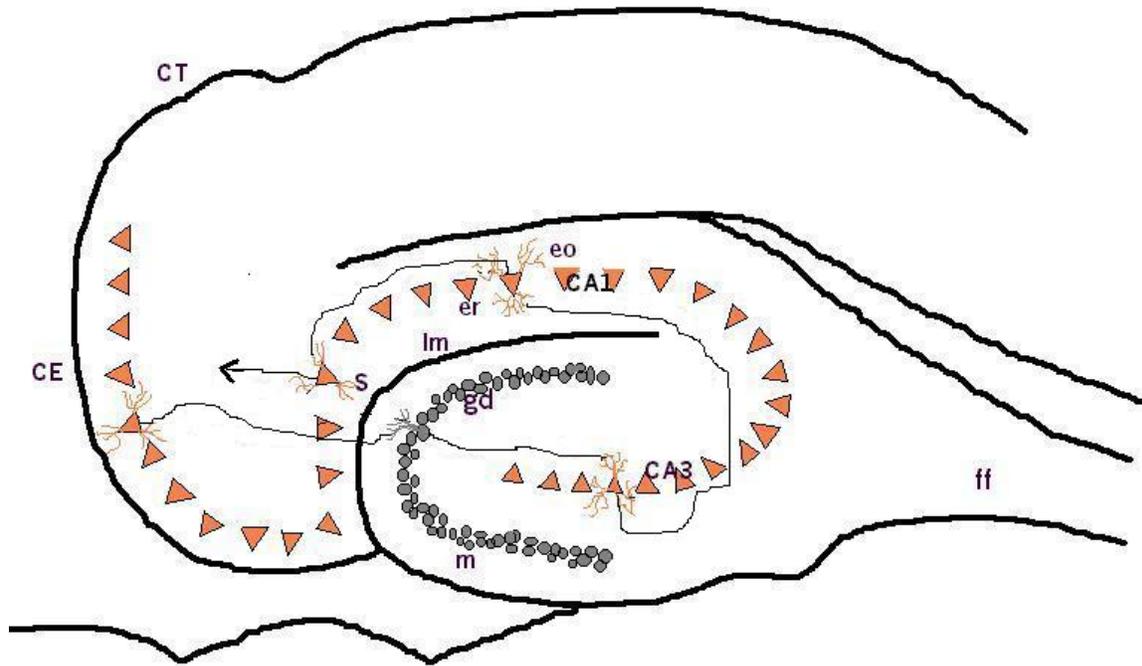


Figura 3. Representación esquemática de las regiones topográficas de la formación hipocampal de la rata, en un corte coronal con respecto a su eje transversal. CE, corteza entorrinal; CT, corteza temporal; CA1 y CA3, regiones del cuerno de Ammón; gd, giro dentado; ff, fimbria fornix; eo, estrato oreins; er, estrato radiado; lm, estrato lacunoso molecular; m, estrato molecular.

En todas las regiones del cuerno de Ammón se encuentran interneuronas inhibitorias de naturaleza GABAérgica principalmente, aunque, coexisten otros neuropeptidos en ellas. En CA1 existen tres tipos de interneuronas, las oriens/alveus y las lacunoso/molecular nombradas con base en su localización y las células en canasta, localizadas en el nivel de la capa piramidal. En el giro dentado existen tipos de interneuronas análogos a los de CA1 (Lacaille, y cols., 1989).

Aferentes al hipocampo

Entre las aferencias al hipocampo se encuentra la llamada vía perforante, la cual procede de la corteza entorrinal. Es una proyección masiva de fibras que termina predominantemente en el giro dentado. De las células de la capa II de la corteza entorrinal lateral en sus porciones medial y caudal, se originan predominantemente proyecciones al giro dentado y a CA3, mientras que las neuronas de la capa III de la corteza entorrinal lateral en su porción medial, dan origen a proyecciones hacia CA1. Las fibras de la vía perforante entran a la sustancia blanca subyacente a la corteza entorrinal y pasan al haz angular, atraviesan la capa de células piramidales del subículo y una parte de las fibras atraviesa la capa molecular del subículo, CA1 y la fisura hipocampal hasta alcanzar la capa molecular del giro dentado. Muchas de las fibras restantes viajan en la capa molecular del cuerno de Ammón a lo largo de su eje transversal, “dejando” varicosidades de paso en CA3; subsecuentemente entran a la parte suprapiramidal de la capa molecular del giro dentado, donde terminan a lo largo de su extensión transversal. Las aferencias que constituyen la vía perforante (información cortical altamente procesada) se dirigen hacia el giro dentado donde terminan sobre los dos tercios externos de la capa molecular dentada en contactos sinápticos con dendritas de las células granulares, de las cuales emergen las llamadas fibras musgosas, que hacen sinápsis con células piramidales del campo CA3 en el estrato lucidum. Fibras colaterales de los axones de las células de CA3 -las colaterales de Schaffer- envían la información hacia CA1 donde terminan sobre las dendritas de las células piramidales cuyos axones, a su vez, proyectan al subículo y a la corteza entorrinal (Buhl, y cols., 1989); ambos constituyen la vía de salida de la información organizada en el hipocampo; este es el denominado circuito trisináptico (Figura 3) siendo a su vez el subículo quien da origen a la mayoría de los eferentes hipocámpales hacia áreas corticales y subcorticales incluida la corteza entorrinal misma, con una contribución de CA1 a este sistema eferente que termina predominantemente en el área entorrinal medial. El subículo envía además proyecciones al septum, al núcleo acumbens, al complejo amigdalóide, al complejo

mamilar, al tálamo anterior y al hipotálamo (Witter, 1989; Jarrad, 1993). Adicionalmente, las neuronas piramidales de CA3 envían colaterales excitadoras al septo lateral y al hipocampo contralateral, así como colaterales intrínsecas que corren longitudinalmente a partes más septales o temporales de CA3 (Buhl, 1989).

Las células granulares dentadas también envían información al hilus. La mayoría de las entradas comisurales y de asociación que entran al giro dentado se originan de células hilares (Witter, 1989). Existe un sistema comisural y un ipsilateral formado por proyecciones celulares hilares al tercio interno de la capa molecular dentada ipsilateral y contralateral (Buhl, 1989). La región hilar recibe además aferentes extrínsecos predominantemente de la corteza cerebral y del área septal. Dado que los árboles dendríticos de las células hilares alcanzan la capa molecular del giro dentado, ellas podrían estar influidas directamente por la entrada cortical principal al giro dentado (Witter, 1989).

Los aferentes hipocampales desde estructuras subcorticales arriban principalmente a través del fimbria-fórnix e incluyen fibras colinérgicas originadas en el núcleo septal medial y el asa vertical de la banda diagonal de Broca, así como terminales procedentes del tallo cerebral que incluyen fibras noradrenérgicas del locus coeruleus y serotoninérgicas del complejo del rafé (Vanderwolf, 1988).

Inervación colinérgica y serotoninérgica del hipocampo

La inervación colinérgica al hipocampo y al giro dentado se inicia en el septum medial y en la banda diagonal de Broca (Robbins, y cols., 1992) (Figura 4).

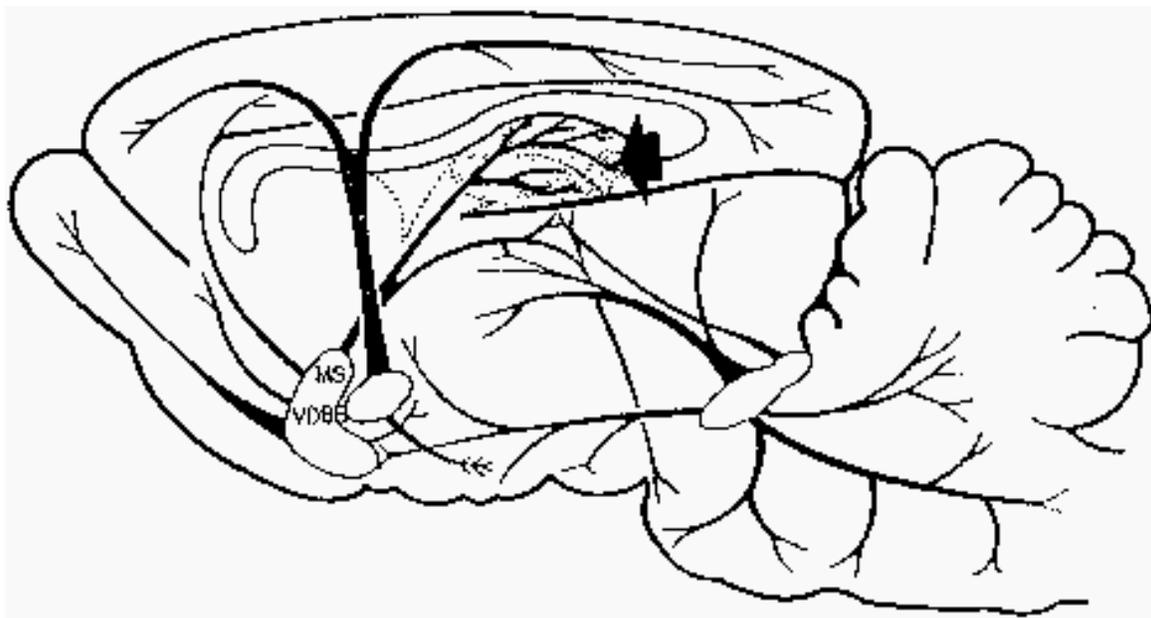


Figura 4. Inervación colinérgica en el cerebro de la rata, La acetilcolina que llega al hipocampo se origina de neuronas del área septal. MS, septo medial; VABB, banda diagonal de Broca; Flecha: hipocampo. Modificado de: Robbins, 1992.

Las neuronas piramidales y granulares reciben densa inervación colinérgica mediante un plexo pericelular alrededor de sus somas con los que establecen contactos sinápticos simétricos, al igual que sobre los troncos de sus ramificaciones dendríticas, en tanto que los contactos sobre las espinas dendríticas de CA1 son asimétricos (Figura 5). Además, las terminales colinérgicas también inervan a las interneuronas del propio campo CA1, donde establecen contactos asimétricos tanto sobre sus somas, como sobre las prolongaciones dendríticas. El efecto de la acetilcolina sobre las neuronas piramidales y las interneuronas es una despolarización lenta asociada con un aumento en la excitabilidad (Buhl, 1989; Pitler y Alger, 1992).

Por otro lado toda la serotonina hipocampal es de origen extrínseco. Los somas de las células responsables de liberar serotonina al hipocampo se localizan predominantemente en los núcleos del rafé dorsal y medial del mesencéfalo. Las prolongaciones axónicas alcanzan al hipocampo a través de dos haces principales: el haz fimbria-fórnix y el haz del cíngulo (Altman, y cols., 1990) (Figura 6).

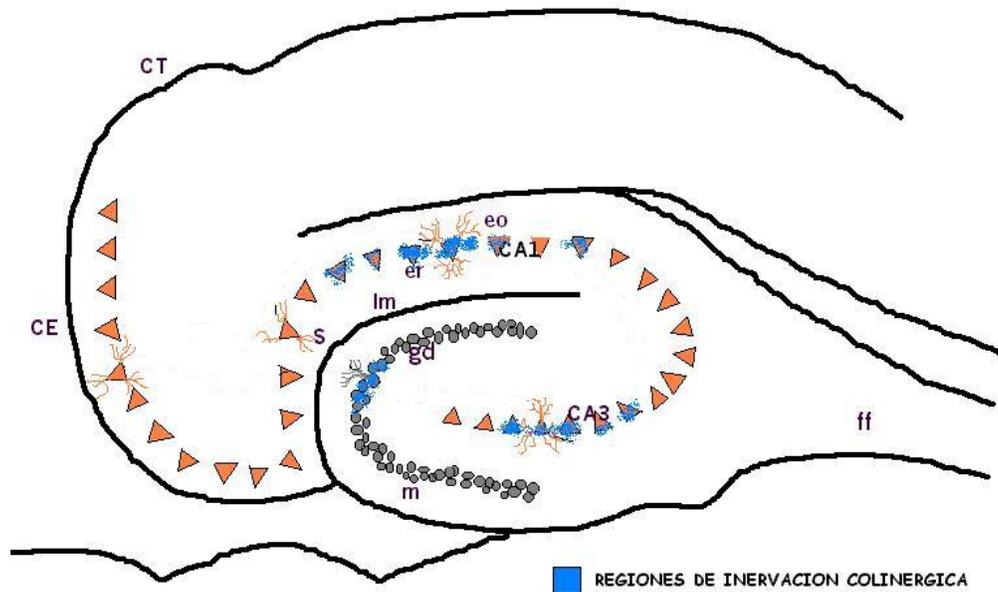


Figura 5. La inervación colinérgica forma un plexo peri-celular sobre las neuronas piramidales de CA3, CA1 y también sobre las neuronas granulares del giro dentado. Aunque ésta es predominante, existe inervación menos densa en los demás estratos de la formación hipocampal. CE, corteza entorrinal; CT, corteza temporal; CA1 y CA3, regiones del cuerno de Ammón; gd, giro dentado; ff, fimbria fornix; eo, estrato oriens; er, estrato radiado; lm estrato lacunoso molecular; m, estrato molecular.

El hipocampo es una de las regiones más ricas en receptores a serotonina, principalmente del tipo 1A, con predominancia sobre el giro dentado y el campo CA1; CA3 contiene relativamente pocos sitios de unión. El hipocampo recibe una red de inervación serotoninérgica densa en el hilus con un patrón más difuso fuera de él; otro gradiente va de más denso en el polo temporal a menos denso en el septal (Altman, y cols., 1990; Segal, 1989) (Figura 7).

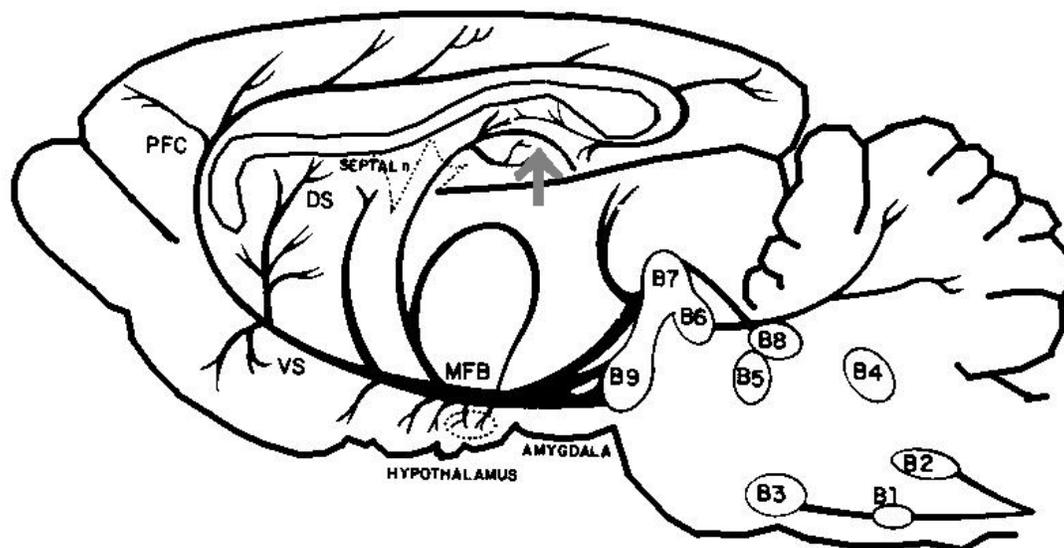


Figura 6. Diagrama de la inervación serotoninérgica en el cerebro de la rata. Se origina en los núcleos del rafe localizados en la formación reticular del tallo cerebral (B#) de los cuales el rafe medial y el dorsal (B5/8, B6 y B7) inervan al hipocampo (flecha). PFC, corteza prefrontal; DS, estriado dorsal; VS, estriado ventral; SEPTALn, núcleo septal; MFB, haz medial telencefálico; HYPOTHALAMUS, hipotálamo; AMYGDALA, amígdala. Modificado de: Robbins, 1992.

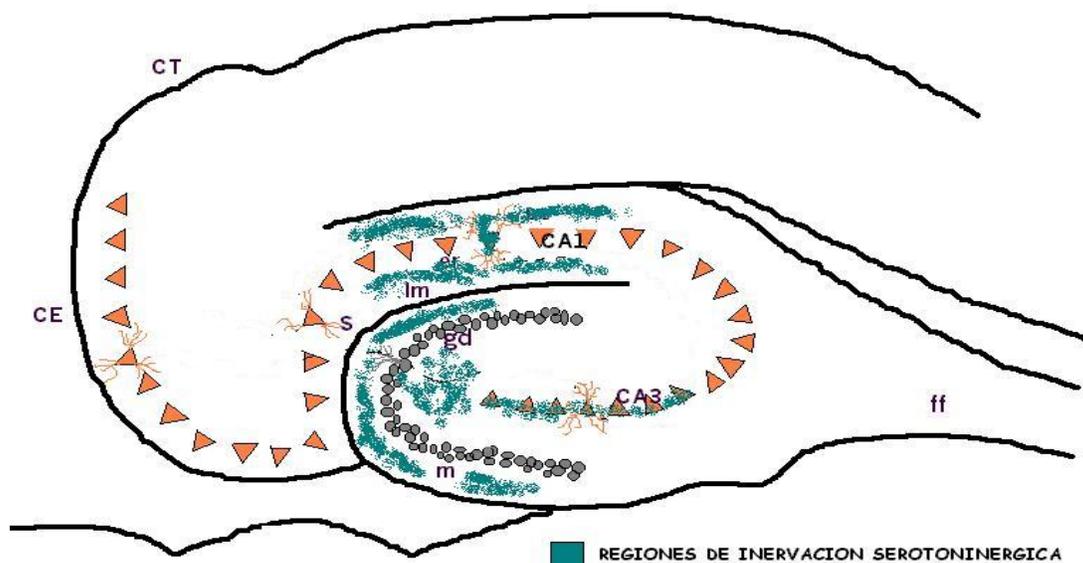


Figura 7. Diagrama de la distribución topográfica de la inervación serotoninérgica al hipocampo. El hipocampo recibe una red de inervación serotoninérgica densa en el hilus con un patrón más difuso fuera de él; otro gradiente va de más denso en el polo temporal a menos denso en el septal. CE, corteza entorrinal; CT, corteza temporal; CA1 y CA3, regiones del cuerno de Ammón; gd, giro dentado; ff, fimbria fornix; eo, estrato oriens; er, estrato radiado; lm estrato lacunoso molecular; m, estrato molecular.

La serotonina hiperpolariza las neuronas principales de CA1 y del giro dentado. El potencial de inversión y la sensibilidad a cambios de potasio externo indican que la serotonina activa una corriente de potasio lo que provoca un incremento en su salida, aunque se ha sugerido que en el giro dentado este neurotransmisor activa la conductancia de cloro. La serotonina además bloquea una corriente lenta de potasio dependiente de calcio subyacente a la hiperpolarización tardía lenta que sigue a una ráfaga de descargas y bloquea la despolarización lenta que sigue al incremento inicial de la conductancia de potasio. La liberación de serotonina por la aplicación de fenfluramina *in vivo* al parecer aumenta la excitabilidad de las células granulares dentadas a la estimulación de la vía perforante con un correspondiente cambio en los potenciales postsinápticos excitatorios (EPSP), lo que indica que modifica la reactividad postsináptica. En ratas con libertad de movimiento la serotonina también produce cambios de excitabilidad en el hipocampo (Segal, 1989; Hong y Krnjevic, 1989).

Las neuronas serotoninérgicas originadas en el rafé dorsal y medial proyectan a regiones que contienen neuronas colinérgicas y se conoce que la manipulación de la neurotransmisión serotoninérgica modifica la magnitud de la liberación de la acetilcolina. Así, existen reportes que sugieren que la serotonina tiene una acción inhibitoria sobre la neurotransmisión colinérgica en regiones como la corteza cerebral, el hipocampo y el cuerpo estriado (Altman, y cols., 1990). Las terminales serotoninérgicas y colinérgicas en CA1 se traslapan y al parecer la serotonina liberada de los núcleos del rafé ejerce una modulación inhibitoria sobre la transmisión colinérgica en el hipocampo (Hong y Krnjevic, 1989). De este modo, las alteraciones en los patrones de inervación de estos dos sistemas de neurotransmisión podrían modificar, en el largo plazo, la citoarquitectura neuronal de las células piramidales del propio campo CA1, lo que estaría en relación directa con alteraciones en el patrón de disparo neuronal resultante de alteraciones en la modulación de las propiedades electrofisiológicas de las células hipocámpales por parte de dichos sistemas (Buhl, 1989; Pitler, 1992; Segal, 1989; Hong y Krnjevic,

1989) y, ulteriormente; con alteraciones conductuales derivadas de dicha manipulación experimental.

El hipocampo y la memoria

El hipocampo participa en la organización de la conducta exploratoria, interviene en el componente motivacional de la actividad motriz, participa en la organización de los patrones de ingesta y procesos motivacionales básicos, en la manifestación de la capacidad de alternancia espontánea, en la discriminación olfativa y en la organización del aprendizaje y la memoria (Jarrad, 1993). En cuanto a estos últimos fenómenos existen diferentes teorías sobre la participación hipocampal. O'keefe y Nadel han propuesto que el hipocampo está involucrado en el procesamiento y memoria de la información espacial específicamente, en tanto que otras teorías enfatizan su participación en procesos de memoria y aprendizaje más específicos, independientemente del tipo de información que se trate. De esta manera Cohen & Eichenbaum proponen su participación en el establecimiento de la memoria declarativa; Olton, Becker & Handelman, en la memoria de trabajo; Rawlins, en la memoria temporal; Sutherland & Rudy, en el aprendizaje configural (Jarrad, 1993).

La memoria declarativa es la responsable de la acumulación de hechos y datos derivados de experiencias aprendidas tanto espaciales como no espaciales. Así mismo, tanto en la memoria de trabajo como en la memoria temporal, independientemente del tipo de información, el hipocampo juega un papel importante en el procesamiento de las relaciones temporales entre estímulos en curso y representaciones de eventos recientes. Para Olton, el hipocampo está involucrado selectivamente con el mantenimiento de la información pertinente sólo a períodos muy cortos de tiempo (memoria de trabajo) pero no con información que permanece constante en el tiempo (memoria de referencia). En el aprendizaje configural se propone que el hipocampo es necesario para la

formación y utilización de asociaciones configurales, pero no para las asociaciones simples. La teoría del mapeo cognoscitivo de O'keefe y Nadel involucra al hipocampo en el establecimiento de un mapa cognoscitivo del ambiente en donde más de un tipo de información puede ser codificada (Poucet, 1993).

Actividad eléctrica hipocampal

La actividad eléctrica espontánea hipocampal cambia continuamente en estrecha correlación con la actividad motora concurrente. La actividad rítmica lenta o ritmo theta hipocampal es un patrón de actividad eléctrica aproximadamente sinusoidal con frecuencias en un rango de 5-12 Hz (Vanderwolf, 1988; Vertes, 1986). Al patrón de actividad rítmica lenta (6-9 Hz) presente durante conductas como movimientos de cabeza, cambios posturales, desplazamiento, carrera, nado, salto y manipulación de objetos (conductas voluntarias o tipo 1) se le ha denominado también actividad theta de tipo 1 o de alta frecuencia; mientras que durante conductas reflexivas como asearse lamer o roer (conductas tipo 2) se observa actividad irregular de gran amplitud (AIGA) con breves periodos de actividad rítmica lenta (ARL) en una banda de 4 a 7 Hz éste es el llamado theta de tipo 2 o de baja frecuencia. Cuando ambos tipos de conductas se presentan simultáneamente ocurre siempre la ARL (Vanderwolf, 1988; Gravilov, y cols., 1995) (Figura 8).

La actividad theta es producida por corrientes inducidas por la actividad sináptica tanto de las células piramidales como de las granulares dentadas, originada por las descargas rítmicas de sus aferentes (Vanderwolf, 1988). Los cambios del potencial de membrana de las interneuronas no parece contribuir a la actividad theta significativamente, debido a su pequeña proporción, geometría y a su localización dispersa (Buszaki, y cols., 1983).

Actividad rítmica lenta



Actividad irregular de gran amplitud



Figura 8. Actividad electroencefalográfica del hipocampo de la rata y su relación con la conducta. Actividad rítmica lenta (ARL) registrada durante desplazamiento (conducta tipo 1). Actividad irregular de gran amplitud (AIGA) registrada durante inmovilidad (conducta tipo 2). Modificado de; Vanderwolf, 1988.

Registros del EEG hipocampal a través de diferentes regiones en el sentido superficie-profundidad en animales bajo anestesia muestran que la actividad theta hipocampal se registra con máxima amplitud en el estrato oriens de CA1 y en el estrato molecular de la hoja dorsal del giro dentado, con un desfase de aproximadamente 180° (Vertes, 1986; Monmaur y Thomson, 1986) (Figura 9).

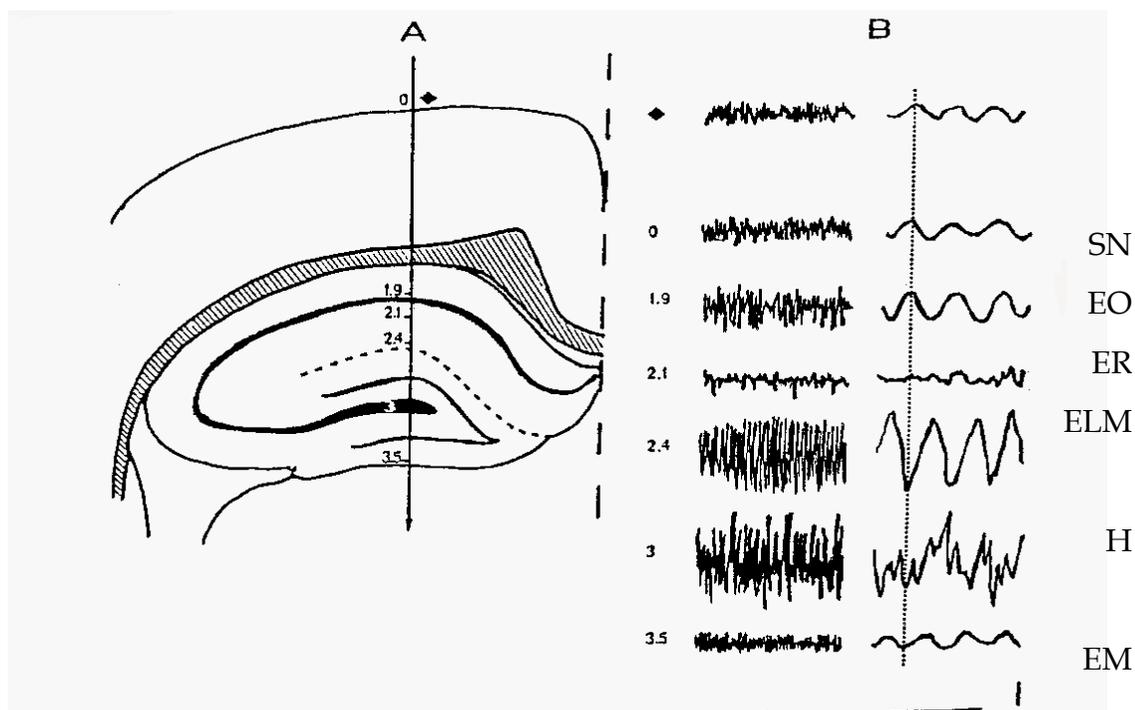


Figura 9. Perfil laminar de la actividad eléctrica hipocampal de la rata. A) representación esquemática de una sección coronal de la formación hipocampal izquierda. B) Registros de las actividades correspondientes a los puntos indicados en A. SN, superficie de la neocorteza; EO, estrato oriens; ER, estrato radiado; ELM, estrato lacunoso molecular; H, hilus; EM, estrato molecular. Calibración: 1 segundo y $500 \mu\text{V}$. Modificado de: Monmaur, 1986.

Según Vanderwolf, la actividad theta se asocia con conductas tipo 1 sin importar los niveles de atención, motivación o el establecimiento de la memoria. Sin embargo, la inhibición farmacológica combinada de la actividad colinérgica y serotoninérgica es capaz de eliminar todo el ritmo theta hipocampal sin eliminar la actividad motora espontánea (Vanderwolf, 1988). Por otro lado, se ha mostrado la ausencia de cualquier correlación directa entre el movimiento *per se* y la actividad theta hipocampal en ratas y ratones, lo que es más evidente en especies como el conejo, el gato y los primates, en los que la actividad theta de alta frecuencia está presente durante la inmovilidad completa (Vinogradova, 1995). A pesar de ello, existe un grupo de movimientos que se correlacionan estrechamente con la actividad theta; estos incluyen la olfacción exploratoria, los movimientos de vibrisas (como fuente de información táctil), los movimientos de ojos durante la exploración visual inmóvil en estado alerta o los movimientos oculares rápidos en el sueño paradójico. Con excepción de éste último, todos los anteriores movimientos participan en la extracción activa de información acerca del ambiente y abastecen de elementos sensoriales para que se lleve a cabo el procesamiento de estímulos nuevos y potencialmente significativos (Tabla 1). Así, la actividad theta con todo su rango de frecuencias ha sido encontrada durante estos componentes de atención sensorial y en la manifestación de respuestas orientadas (Vinogradova, 1995) (Figura 10).

Eichenbaum sugiere que dada la asociación del ritmo theta con la conducta exploradora espontánea, aquel podría reflejar el procesamiento de la información hipocampal. Los resultados obtenidos en sus experimentos sobre discriminación olfativa sugieren que los fenómenos sensoriales asociados con la adquisición de estímulos relevantes, están acoplados al ciclo interno del procesamiento hipocampal durante el análisis de señales útiles en dicho proceso de discriminación (Eichenbaum, 1992).

RITMO THETA HIPOCAMPAL

- DISCRIMINACIÓN OLFATIVA
- OLFACCIÓN EXPLORATORIA
- MOVIMIENTO DE VIBRISAS
- MOVIMIENTO DE OJOS (EXPLORACIÓN VISUAL)
- ATENCIÓN SENSORIAL
- RESPUESTAS ORIENTADAS

Figura 10. Movimientos relacionados con la extracción de información por parte de los animales durante los cuales ocurre theta hipocampal.

Diferentes trabajos indican que la actividad theta aparece cuando información nueva y potencialmente significativa sobresale de un sustrato sensorial relativamente estable, durante la respuesta orientada de un animal en estado inmóvil o durante la exploración activa, con frecuencia en proporción al nivel y complejidad de la información aferente. En condiciones estables de entrada de información sensorial la actividad theta se habitúa gradualmente, pero reaparece junto con un estado de atención activa orientada al comienzo del aprendizaje. El establecimiento del aprendizaje y la automatización de las respuestas en una situación de aprendizaje simple produciría la supresión de la actividad theta, si bien durante otros tipos de aprendizaje como el de diferenciación compleja y el cambio de significado de estímulos, tal actividad puede persistir (Vinogradova, 1995; Eichenbaum, 1992).

En un esfuerzo por explicar el modo de operación de la actividad theta en el hipocampo durante el procesamiento y consolidación de la información, se han desarrollado varias hipótesis. De esta manera, Eccles en 1998, propuso que la actividad theta representa la expresión electroencefalográfica de un sistema de flujo de información reverberante cortico-hipocampal, necesario para la formación del trazo de memoria; Miller, en 1991 propuso que el ritmo theta actúa como un indexador específico de representaciones para circuitos cortico-hipocampales

específicos, correspondientes a diferentes frecuencias theta; Gray y Rawlins en 1986, proponen que ésta actividad actúa como un factor asociado a la potenciación de larga duración selectiva de las células piramidales hipocampales con base a las frecuencias theta; dando como resultado un almacén de información distribuido temporalmente en el hipocampo; MaNaugton y Morris en 1987, Buszaki en 1989, y; Eichenbaum y Otto en 1992 propusieron que esta actividad funciona como un mecanismo de facilitación y prolongación de los estímulos que entran en fase con la actividad theta en procesos generados por eventos previos, conduciendo a la supresión de la interferencia durante el procesamiento y registro de la información, como un mecanismo de atención selectiva (Vinogradova, 1995; Eichenbaum, 1992). Experimentalmente se ha visto que durante conductas asociadas a la actividad theta el patrón de respuestas eléctricas registradas en la capa de células granulares varía continuamente en concordancia con un posible efecto dicha actividad en la modulación del disparo de las mismas, en función del momento en que arriba la información por la vía perforante con respecto a la fase de la actividad theta (Wilson, 1986). De esta manera, los cambios asociados a la actividad theta potenciarían la acción de la información que arriba de otros aferentes al hipocampo actuando como un tetanizador natural para producir modificaciones sinápticas (Vertes, 1986).

Se ha encontrado que la potenciación de larga duración –un incremento en la eficacia sináptica y substrato potencial de los procesos de memoria en el sistema nervioso de los vertebrados (Shen y Specht, 1994)- es inducida preferentemente por ráfagas de estimulación a intervalos correspondientes a las frecuencias de 5-12 Hz y son más efectivos para inducirla cuando son aplicados durante la deflexión positiva de las ondas del theta del giro dentado y CA1 (Stäubli y Xu, 1995). Todo ello sugiere que la estimulación aplicada en relación temporal adecuada con la actividad previa y el ritmo theta en curso puede aumentar marcadamente la eficacia sináptica (Stäubli y Xu, 1995; Morris, y cols., 1990).

Por otro lado la potenciación de larga duración es capaz de inducir modificaciones de la morfología neuronal que han sido asociadas con el almacenamiento de información a largo plazo (Harris y Kater, 1994). El grado de ramificación dendrítica, la longitud de las prolongaciones dendríticas individuales y la densidad de espinas dendríticas son modificadas por la experiencia y probablemente representan el crecimiento de nuevas sinapsis (Greenough y Bailey, 1988). Las espinas dendríticas, son pequeñas protrusiones protoplasmáticas que cubren la superficie de muchas neuronas y representan los sitios de contacto de alrededor del 90% de las sinapsis excitadoras en el SNC (Harris y Kater, 1994). Las espinas dendríticas pueden ser largas o cortas, gordas o delgadas, rectas o curvas, cilíndricas o irregulares, y ramificadas o no ramificadas; en todas las combinaciones. Las cabezas de las espinas pueden ser pequeñas o grandes, esféricas, ovals o irregulares en su forma (Harris y Kater, 1994).

Las neuronas espinosas tienden a ser las neuronas principales de salida o entrada de una región cerebral (Shepherd, 1998). Como tales, las neuronas espinosas integran diversas entradas excitadoras e inhibitorias, de diferentes regiones y de diferentes tipos celulares en una región cerebral dada (Harris y Kater, 1994). En CA1, las células piramidales son las células principales. En ellas las espinas que se localizan sobre los dos tercios proximales de las dendritas reciben entradas excitadoras del hipocampo ipsilateral y contralateral, en tanto que las espinas distales de estas mismas células reciben sinápsis excitadoras de la corteza entorrinal (Shepherd, 1998). Evidencia electrofisiológica muestra que diferentes sinapsis excitadoras pueden tener muy diferente eficacia sináptica y que la estructura de la espina dendrítica participa en definir las diferencias en la eficacia sináptica (Harris y Kater, 1994). De ésta manera la heterogeneidad de la fuerza sináptica debe ser evidente en la estructura de la espina ya que la diversidad en la morfología de las espinas puede reflejar estados dinámicos durante la historia de la vida de espinas individuales y/o diferentes eficacias sinápticas ocurriendo a lo largo de una sola dendrita en un tiempo particular (Harris y Kater, 1994). Así una

relación entre la actividad theta hipocampal, el LTP y la modificación en la forma de las espinas se propone como ruta de eventos en el establecimiento de la memoria de largo plazo.

Modulación colinérgica y serotoninérgica del ritmo theta hipocampal

En la actualidad existe controversia acerca del origen neuroquímico del ritmo theta (Vinogradova, 1995). Vanderwolf y colaboradores distinguieron dos tipos de actividad theta, uno dependiente de la neurotransmisión colinérgica y otro dependiente de la neurotransmisión serotoninérgica. Concluyeron que durante la ocurrencia de conductas tipo 1 la actividad theta hipocampal es producido por la acción conjunta de ambos sistemas de neurotransmisión y si alguna de ellas es inactivada experimentalmente, la otra actuará para producirlo. Durante conductas tipo 2 la actividad theta sería dependiente de la actividad colinérgica (Vanderwolf, 1988; Vanderwolf y Baker, 1986), susceptible de ser inhibida por atropina y dependería presumiblemente de la inervación colinérgica procedente del área septal medial (Vanderwolf, 1988). De hecho, existe un traslape significativo dentro del área medial del septum de sitios cuya estimulación incrementa la actividad theta hipocampal y aquellos con alta concentración de neuronas colinérgicas. La aplicación de acetilcolinesterasa central o periféricamente produce trenes largos y continuos de actividad theta hipocampal y la aplicación de antagonistas colinérgicos elimina o atenúa a la misma; en tanto que lesiones del septo medial dan como resultado una disminución simultánea y paralela de la actividad de la colina acetil transferasa (sintetizadora de acetilcolina) y de la actividad theta (Vertes, 1986; Olpe, y cols., 1987). Además, existe paralelismo entre el desarrollo ontogenético de las conexiones septohipocampales y el la actividad theta en el EEG del hipocampo. La desconexión del complejo formado por la banda diagonal de Broca y el septo medial abate la actividad theta en otras áreas cerebrales, incluido el hipocampo; y cuando las características de la actividad rítmica de las neuronas

de éste complejo son modificadas experimentalmente el hipocampo refleja pasivamente estas características (Vinogradova, 1995) (Figura 11).

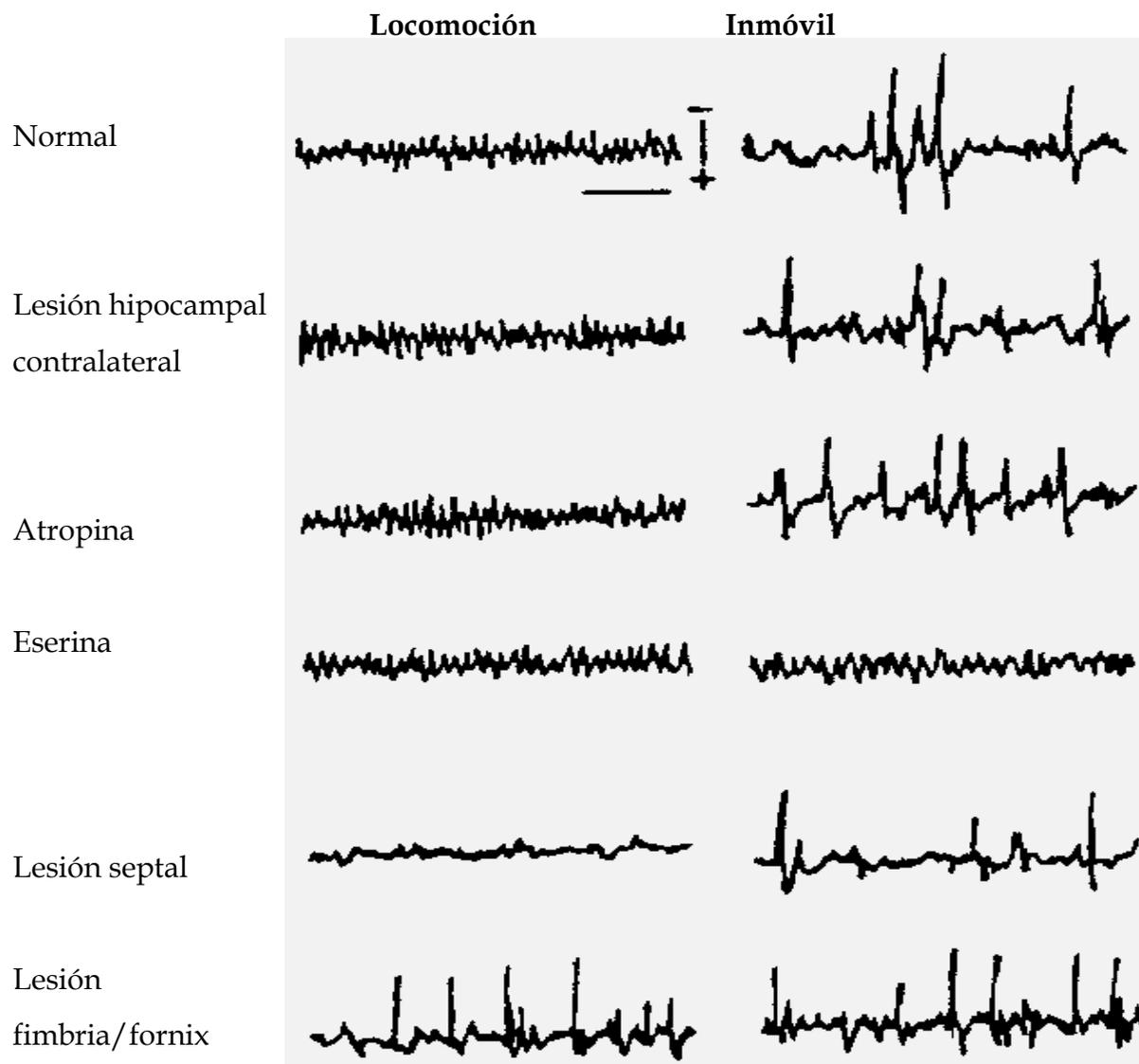


Figura 11. Registro de la actividad eléctrica del hipocampo de rata y su relación con la actividad del sistema colinérgico septo-hipocampal. Segmentos registrados del estrato radiado de CA1 durante el desplazamiento (Locomoción) e inmovilidad (inmóvil) en diferentes condiciones: En estado normal; tras la lesión completa del hipocampo contralateral; tras la aplicación de atropina (50 mg/kg i.p.); tras la aplicación de eserina (1 mg/kg i.p.); tras la lesión del septo medial; tras la sección quirúrgica del complejo fimbria fórnix y la corteza subyacente, Calibraciones: 1s y 1 mV. Modificado de: Buzsaki, 1983.

El segundo tipo de actividad theta postulado por Vanderwolf y colaboradores (1988) no es afectado por la atropina y depende de la inervación serotoninérgica ascendente desde los núcleos del rafé del tallo cerebral. Es inhibido por los anestésicos e inducido por la estimulación de alta frecuencia del núcleo del rafé medial en ratas con libertad de movimiento (Vanderwolf, 1988).

Sin embargo, a éste respecto, otros autores indican que no existe este segundo tipo de actividad theta; Vertes y colaboradores (1986) han encontrado que la estimulación del rafé mesencefálico suprime y desorganiza las ráfagas de la actividad theta del área septal medial y de la banda diagonal de Broca, o bien, disminuye su frecuencia con una inhibición paralela de la ocurrencia de actividad theta hipocampal; y que, además, la lesión del núcleo del rafé es suficiente para la aparición de un ritmo theta continuo y persistente (Vertes, 1986; Vinogradova, 1995). El núcleo del rafé es la única estructura cerebral que se ha encontrado que suprime o disminuye la regularidad y/o frecuencia del ritmo theta hipocampal. Por otro lado, la actividad de las neuronas del rafé es mínima durante el sueño paradójico, el cual se caracteriza por la ocurrencia de ritmo theta de gran amplitud, además su actividad también es suprimida durante la manifestación de actividad exploratoria, atención o procesamiento de información (Vertes, 1986; Vinogradova, 1995). La reducción de la actividad serotoninérgica cerebral mediante la administración de paraclorofenilalanina (PCPA), afecta poco la actividad theta en animales con libertad de movimiento, de hecho cuando se compara el porcentaje de actividad theta entre inmovilidad y desplazamiento en animales intactos éstos muestran un porcentaje de incremento del 91.9%, mientras que la animales que recibieron la administración de la PCPA mostraron un incremento del 132.8 %, mientras que animales que recibieron atropina mostraron un incremento de sólo 69.5 % y en animales con doble tratamiento se observó un incremento de 12.0 % con la desaparición de prácticamente todo el theta hipocampal (Vanderwolf y Baker, 1986) (Figura 12).

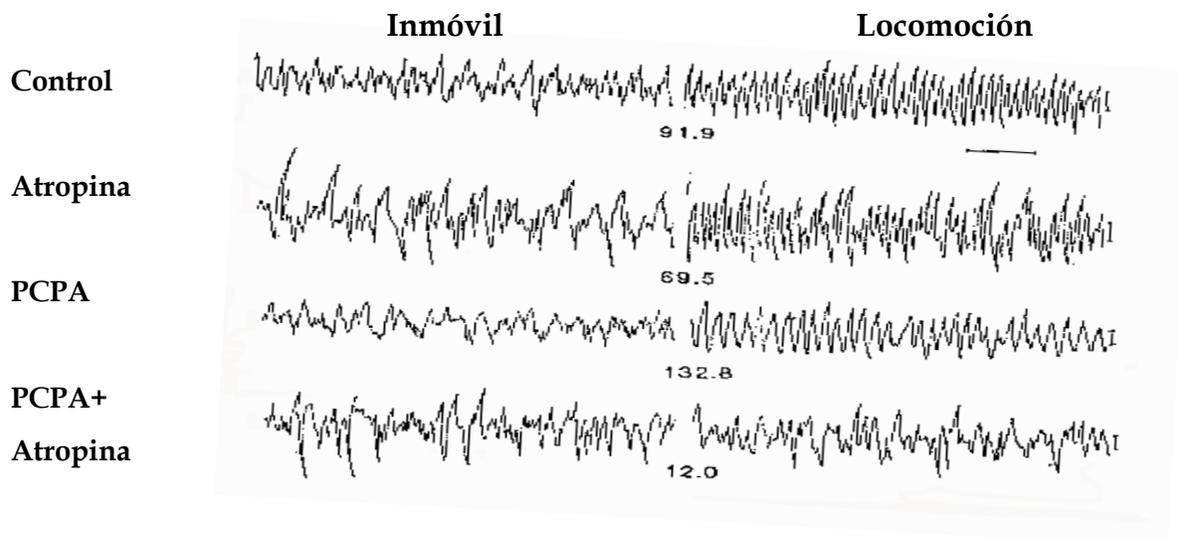


Figura 12. Registro de la actividad eléctrica hipocampal de la rata durante inmovilidad y locomoción, luego de la aplicación de de atropina, paraclorofenilalanina (PCPA) y la combinación de ambos. Calibración: 5 mV, 1 segundo. Modificado de Vanderwolf, et al. 1986.

Por otro lado McNaughton y colaboradores han encontrado que la lesión selectiva de los aferentes serotoninérgicos al hipocampo disminuye el umbral de inducción de la actividad theta hipocampal por estimulación septal mediante la aplicación de estímulos con frecuencias de 6-10 Hz. El umbral mínimo de corriente para inducir la actividad theta se encuentra a estimulaciones de 7.7 Hz de frecuencia, mientras que los animales con serotonina disminuida presentan el umbral mínimo de corriente cuando se estimula a 6.9 Hz de frecuencia (McNaughton, y cols., 1980).

De acuerdo con lo anterior Vertes y colaboradores encontraron que la actividad del núcleo del rafé medial tiene un efecto normalmente supresor sobre la actividad theta del hipocampo. Ellos encontraron que la administración intracerebral de agonistas a los receptores 5-HT_{1A} del rafé como lo es la 8-OH-DPAT [8-hidroxi-2-(di-n-propil-amino)teralina] y la ipsapirona, así como la administración intracerebral de clorhidrato de procaína, provocaron trenes continuos de actividad theta en ratas anestesiadas (Vertes, y cols., 1994) (Figura 13). Sin embargo, se ha discutido que la actividad theta presente en animales

anestesiados estaría mas bien relacionada con conductas tipo 2 y que el papel de la serotonina procedente del rafé medial sería generar el ritmo theta asociado con conductas tipo 1 e inhibir el tipo 2 en animales alertas (Vertes, y cols., 1994).

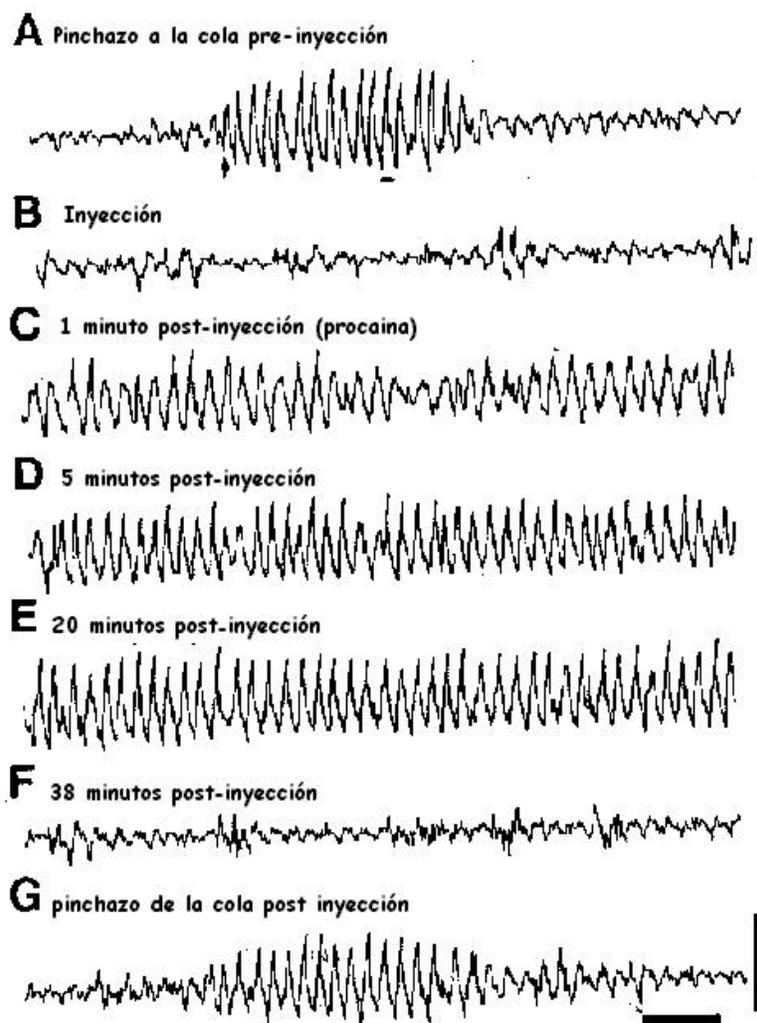


Figura 13. Registros de la actividad eléctrica del hipocampo de la rata tras la inactivación de los núcleos del rafé por la aplicación de procaína. Actividad theta evocada por la estimulación táctil (A) antes de la inyección de procaína, (B) durante la inyección, (C, D y E) 1 minuto, 5 minutos y 20 minutos después de la inyección; (F) 38 minutos después de la inyección; (G) posterior al efecto de la procaína. Calibración: 1s, 500 μ V. Modificado de: Vertes y cols., 1994.

Evidencia experimental en el estudio del aprendizaje y memoria de la información espacial

La evidencia experimental en animales con lesión hipocampal selectiva muestra deficiencias en la exploración en ratas hiperactivas en el campo abierto que usualmente no desarrollan un patrón normal de habituación, aunque su habilidad de discriminación sensorial simple permanece intacta. Estas ratas también están afectadas en cuanto a su reacción a la novedad (Poucet, 1993). Además, estos animales muestran deficiencias en la adquisición de información espacial tanto en la memoria de referencia como en la de trabajo, deficiencias moderadas en la retención de información espacial aprendida antes de la lesión hipocampal, extinción facilitada de la información espacial y deficiencias en el aprendizaje contextual. Por otro lado, se ha reportado que éstos animales no muestran deficiencias en el aprendizaje y memoria generados a partir de información no espacial, ni en tareas de discriminación de objetos y discriminación concurrente, ni muestran deficiencias en el aprendizaje señalizado del laberinto radial (Jarrad, 1993). Por otro lado, animales con lesión selectiva del campo CA1 o CA3 muestran deficiencias en el aprendizaje en el laberinto acuático de Morris, si bien eventualmente demostraron adquisición de información y una mejoría consistente con las repeticiones; sin embargo, nunca alcanzaron las bajas latencias de los animales control (Stubley-Weatherly, y cols., 1996).

La desconexión completa de los aferentes hipocampales produce efectos semejantes a la desconexión hipocampal, que no son exacerbados por la lesión de la amígdala pero si además del hipocampo es dañado el subículo o el cuerpo estriado, los animales presentan una deficiencia más severa que incluye además a la memoria guiada por señales (McDonald y White, 1995; Jarrad, 1993). Este patrón de alteraciones también ocurre en el laberinto acuático de Morris, en el que sólo después de eliminar al hipocampo y al subículo las deficiencias se equiparan a las de la desconexión del sistema hipocampal (Jarrad, 1993) (Figura 14).

Lesión	Hipocampo o fornix	Estriado	Amígdala
Discriminación Sensorial	Intacta	Intacta	Intacta
Aprendizaje egocéntrico	Intacto	Deficiente	Intacto
Aprendizaje de señal	Intacto	Deficiente	Intacto
Aprendizaje de lugar	Deficiente	Intacto	Intacto

Figura 14. Evidencia experimental sobre las consecuencias conductuales de la lesión hipocampal en pruebas de orientación espacial.

Se han evaluado las consecuencias de la lesión del sistema colinérgico y serotoninérgico o de ambos sobre diferentes aspectos conductuales y se ha sugerido que la interacción de estos sistemas es relevante en los procesos mnemónicos involucrados en la etiología de las demencias, particularmente en la enfermedad de Alzheimer, en la que estos sistemas se ven afectados. Los estudios conductuales en animales han confirmado la importancia del sistema colinérgico en los procesos de aprendizaje y memoria. En el laberinto acuático de Morris las lesiones del núcleo basal magnocelular y el septo medial producen deficiencias en el aprendizaje de lugar que se correlacionan con el grado de disminución del contenido de acetilcolina hipocampal. El bloqueo farmacológico de receptores colinérgicos muscarínicos inducido antes del entrenamiento impide el establecimiento de dicho tipo de aprendizaje sin afectar el aprendizaje señalizado ni el uso de estrategias egocéntricas (McNamara y Skelton, 1993; Altman, y cols., 1990; Lamberti y Gower, 1991; Albert, 1996), mientras que la administración post-entrenamiento no afecta su desempeño; en tanto que la aplicación de atropina afecta tareas de discriminación simultánea tanto espacial como no espacial. En general, las evidencias experimentales sugieren que la integridad del sistema colinérgico es indispensable para el aprendizaje de lugar en el laberinto acuático de

Morris (McNamara y Skelton, 1993). Así mismo, a pesar de que los animales con lesión del sistema colinérgico eventualmente pueden adquirir la información haciendo uso de estrategias como el aprendizaje de señal (Nilsson, y cols., 1988; Richter-Levin y Segal, 1991) la pérdida de dicha capacidad no ocurre si la lesión septal es sólo parcial (Richter-Levin y Segal, 1989).

Por otra parte, ha sido motivo de controversia la participación de la actividad serotoninérgica en las habilidades de navegación. Se ha reportado que la interferencia experimental del sistema serotoninérgico impide, mejora o no afecta el desempeño de los animales en el aprendizaje y la memoria espacial. En trabajos en los que se realizó el abatimiento de las concentraciones de serotonina cerebral mediante la aplicación de 5,7-dihidroxitriptamina (5,7-DHT) se reporta que no hay efectos sobre el desempeño de las ratas en el laberinto acuático y el radial (Richter-Levin y Segal, 1989; Murtha y Pappas, 1994), mientras que en las pruebas de evitación activa y en la resolución del laberinto de Stone -un laberinto "T" secuencial que requiere que las ratas aprendan una secuencia de giros izquierda-derecha-, los animales tuvieron un mejor desempeño (Altman, y cols., 1990; Carli, y cols., 1995; Olvera-Cortés, y cols., 1998). De igual manera, el abatimiento de la concentración de la serotonina hipocámpal no tiene efecto sobre el desempeño en el laberinto acuático, mientras que induce un mejor desempeño en el laberinto de Stone. Sin embargo, cuando la lesión al sistema serotoninérgico, ya sea general o selectiva al hipocampo, se realiza en presencia de daño al sistema colinérgico, se observa un efecto potenciador de las deficiencias ocasionadas por la lesión colinérgica en la memoria espacial (Richter-Levin y Segal, 1989); mientras que, estas lesiones colinérgicas que no afectan el desempeño en el laberinto de Stone eliminan la facilitación originada por la deficiencia serotoninérgica (Murtha y Pappas, 1994). Por otro lado, en trabajos realizados en nuestro laboratorio basados en el abatimiento de la concentración de serotonina cerebral mediante una dieta deficiente en triptofano, se encontraron deficiencias en la ejecución de tareas que involucran al aprendizaje de lugar; esto es los animales fueron incapaces de

alcanzar latencias semejantes a las del grupo control y, al parecer, mostraron alteraciones en las estrategias de resolución del problema espacial en virtud de haber recurrido exclusivamente a una búsqueda egocéntrica (Olvera-Cortés, y cols., 1998).

La inactivación combinada de la actividad farmacológica de los sistemas colinérgico y serotoninérgico modifica también el aprendizaje señalado con plataforma visible en el laberinto acuático (Richter-Levin y Segal, 1989), el cual no es afectado por la sola lesión del sistema colinérgico (Richter-Levin, y cols., 1993). En tanto que los animales inactivación colinérgica y serotoninérgica aprenden la existencia de la plataforma y la alcanzan mediante la utilización de una estrategia aleatoria de búsqueda, pero no aprenden la posición de la misma. Así, las pruebas de transferencia de estos animales y su análisis de rutas revelan la pérdida de tendencias espaciales (Nilsson, y cols., 1988; Richter-Levin y Segal, 1991) (Figura 15).

ESTRATEGIA	ÁREA RELACIONADA	LESIÓN HIPOCAMPAL	5-HT↓	ACh↓	5-HT/ACh↓
De señal	Estríado	↔	?	↔	↓
Egocéntrica	Estríado Cerebelo ?	↔	↑	↔	?
De lugar	Hipocampo	↓	↔	↓	↓↓↓

Figura 15. Evidencia experimental acerca de las consecuencias de la lesión hipocámpal, interrupción de la actividad serotoninérgica, interrupción de la actividad colinérgica y de ambas sobre pruebas conductuales de orientación espacial.

Sistemas de memoria de la información espacial

Mientras que la normalidad morfológica y funcional del hipocampo parecen ser requisitos para la realización de tareas que requieren el uso de información

acerca de las relaciones entre estímulos, en la versión estándar del laberinto acuático de Morris el animal puede aprender la localización de la plataforma en relación con las otras señales del ambiente. La dependencia de este tipo de aprendizaje respecto a la actividad hipocampal está bien documentada. En contraste, cuando las ratas deben encontrar la plataforma desde un punto de inicio constante, el daño del fórnix deteriora pero no impide el aprendizaje. Probablemente, las ratas aprendan la posición de la plataforma con respecto a una sola señal distal o a un grupo de señales distales localizadas directamente por detrás de la plataforma, en lugar de aprender la relación entre varias señales distales (McDonald y White, 1995). Las lesiones del cuerpo estriado dorsal impiden el aprendizaje de tareas en las cuales una respuesta motora es reforzada en presencia de una sola señal. En tales condiciones, se han observado deficiencias en la discriminación de brillo, en la resolución de laberintos egocéntricos, en la reversión del aprendizaje y en el aprendizaje señalizado en el laberinto radial (McDonald y White, 1993).

Las señales ambientales pueden ser usados individualmente o se puede adquirir información acerca de sus relaciones en la estructuración de un "mapa espacial" del ambiente. La naturaleza de la conducta que los animales despliegan durante el aprendizaje puede influir en el tipo de información que adquieren de las señales distales y cuales, de diferentes sistemas neurales, procesan y almacenan la información (McDonald y White, 1995). Las tareas que son impedidas por lesiones de la amígdala no son afectadas por el daño al sistema hipocampal; lo mismo que las tareas afectadas por daño al cuerpo estriado dorsal no son afectadas por la lesión del hipocampo o de la amígdala. De acuerdo con McDonald y white (1995), existen tres estructuras cerebrales involucradas en el aprendizaje y la memoria de tareas usadas comúnmente en las pruebas de laboratorio, que corresponden a tres sistemas diferentes que procesan de manera simultánea la información, con la posibilidad de interactuar entre sí en función de las demandas de la tarea (McDonald y White, 1995). Uno incluye a la amígdala y participa en la adquisición

de asociaciones entre estímulos neutros con respuestas producidas por estímulos biológicamente significativos y que tienen propiedades afectivas; por ejemplo tareas que requieren asociaciones de estímulos incentivos (McDonald y White, 1993). Un segundo sistema incluye al cuerpo estriado y participa en la adquisición de asociaciones entre estímulos neutros y respuestas motoras que ocurren en asociación con estímulos reforzadores; por ejemplo, en tareas en las que una respuesta motora es reforzada en presencia de una sola señal. Finalmente, un tercer sistema que incluye al hipocampo se ha propuesto que participa en la adquisición de información acerca de las relaciones entre estímulos, lo que puede disminuir la ambigüedad en el aprendizaje de situaciones que requieren que un estímulo particular pueda tener diferente significado con base a la presencia o ausencia de otro estímulo; este tipo de procesamiento ayudaría a identificar y localizar posiciones espaciales (McDonald y White, 1993).

Packard y McGaugh mostraron una doble disociación de la función del hipocampo y del cuerpo estriado dorsal (núcleo caudado) en dos versiones de la tarea del laberinto acuático. La inducción de daño al hipocampo impidió la versión espacial, pero no la discriminación visual de la tarea, mientras que la discriminación visual sí fue impedida por daño estriatal mismo que no afectó la versión espacial de la tarea. Existe evidencia por otra parte de que el hipocampo no participa en el aprendizaje egocéntrico (McDonald y White, 1994; Holscher y Smidt, 1994).

Se ha sugerido que la habilidad para usar respuestas egocéntricas o de señal en la búsqueda de la plataforma no es afectada por la lesión del sistema colinérgico, mientras que la navegación espacial con estrategias de lugar depende de la integridad de este sistema. Estas dos formas resultarían de estrategias de búsqueda resistentes o susceptibles a las acciones de la atropina respectivamente, en tanto que la lesión combinada de los sistemas colinérgico y serotoninérgico eliminaría ambos tipos de estrategias (Richter-Levin y Segal, 1991). Así las deficiencias encontradas en la orientación espacial luego de la desnervación

serotoninérgica pueden deberse a diferencias en las demandas de las tareas utilizadas para su evaluación. El laberinto acuático con la plataforma hundida evalúa eminentemente aprendizaje de lugar (McNamara y Skelton, 1993), mientras que se ha relacionado a la serotonina con el aprendizaje señalizado, cuyas deficiencias por la lesión a tal sistema podrían estar enmascaradas por el uso de estrategias de lugar en animales con el sistema colinérgico intacto; otro tanto podría estar ocurriendo con el aprendizaje egocéntrico. Ello podría explicar el hecho de que la participación serotoninérgica sólo es evidente luego de la lesión colinérgica.

De lo anterior se desprende que la participación del sistema serotoninérgico en la organización del proceso de navegación espacial en general es poco clara, Así mismo, aunque se han reportado alteraciones conductuales como consecuencia del abatimiento de la serotonina en dicha región sobre el EEG hipocampal (Vertes, 1986; Vanderwolf y Baker, 1986; Richter-Levin y Segal, 1991); la asociación entre los dos eventos durante la percepción, adquisición y consolidación de la información, así como su asociación con la memoria espacial no ha sido explorada, ni en lo particular, ni en relación con las diferentes estrategias de resolución de una tarea espacial.

Partiendo de lo anterior y tomando en cuenta que tanto los estados psiconeurales como las actividades relacionadas con el aprendizaje pueden estar correlacionados con las dinámicas de la red neural que promueve los cambios sinápticos de larga duración y la formación de memoria (Staübli y Xu, 1995), la manipulación de los sistemas responsables del establecimiento de los ritmos eléctricos hipocampales derivaría en alteraciones de los procesos en los que el hipocampo participa -como son el aprendizaje y memoria-, así como, de los mecanismos neuroquímicos subyacentes y de los parámetros morfológicos que reflejan e involucran la actividad funcional de dicha región cerebral.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La utilización de diferentes paradigmas de evaluación conductual parece ser un factor determinante en la controversia acerca de la participación serotoninérgica en la organización de los procesos de aprendizaje y memoria dependientes de la actividad hipocampal. Mientras que en algunos paradigmas el abatimiento de la serotonina cerebral produce un mejor desempeño, en otros se encuentran efectos adversos. Con respecto a la orientación espacial, al evaluar ratas entrenadas en una tarea de aprendizaje espacial según el procedimiento estándar desarrollado por Morris y colaboradores, se ha encontrado que la serotonina participa solamente en condiciones con alteración de la modulación colinérgica del hipocampo, potenciando los efectos de deterioro de la función cognoscitiva provocados por dicha alteración, a pesar de que individualmente, el abatimiento de serotonina cerebral o hipocampal no produce efectos observables sobre tales pruebas. Por otro lado, se ha reportado que en la evaluación conductual de ratas en el aprendizaje egocéntrico y de señales, el abatimiento de serotonina produce un mejor desempeño en el primero y una deficiencia en el segundo. Así, los reportes aparentemente contradictorios acerca de la participación serotoninérgica en la orientación espacial podrían ser resultado de la diferencia en las demandas estratégicas que cada tipo de prueba representa para los animales, de tal forma que en condiciones de abatimiento de la serotonina cerebral o hipocampal aquellas estrategias dependientes del hipocampo como el aprendizaje de lugar no resultarían afectadas, mientras que las no dependientes del hipocampo como el aprendizaje egocéntrico y el de señales presentarían alteraciones. Electroencefalográficamente se ha observado que dentro de la actividad eléctrica espontánea del hipocampo se presenta la actividad theta, la cual ha sido asociada tanto con la ocurrencia de movimientos que permiten la extracción activa de información sensorial y la obtención y procesamiento de la información espacial, como con la emisión de respuestas orientadas. Durante las acciones conductuales

mencionadas se ha registrado la actividad theta con todo su rango de frecuencias y se ha propuesto que tal actividad refleja el procesamiento de dicha información por parte del hipocampo. Sin embargo, falta por establecer si la asociación de la actividad theta con las conductas voluntarias tiene un significado estrictamente motor o si esta expresión electrofisiológica de la función hipocampal está relacionada con el procesamiento de información espacial dependiente del hipocampo; lo cual podría ser diferenciado al evaluar a los animales en pruebas espaciales cuyos componentes estratégicos sean efectivamente dependientes del hipocampo, en comparación con el aprendizaje espacial adquirido por estrategias independientes de dicha región cerebral; y la relación de cada una de ellas con la actividad theta presente en el hipocampo, concomitantemente al desarrollo temporal de la adquisición de la información.

Se ha propuesto que la actividad theta se origina de la actividad colinérgica aferente sobre el hipocampo y que es modulada por la inervación serotoninérgica. A este respecto, algunos autores sugieren que existe una subdivisión de la actividad theta y que la sub-banda de baja frecuencia (4-7 Hz) depende de la actividad serotoninérgica aferente al hipocampo y que se presenta durante conductas voluntarias tipo 1 exclusivamente; mientras que la actividad theta de alta frecuencia (7-9 Hz) depende de la transmisión colinérgica aferente al hipocampo y se presenta tanto durante conductas tipo 1 como durante las tipo 2. Sin embargo, otros autores proponen que la serotonina desincroniza al EEG hipocampal y que al abatirla se produce una mayor expresión de actividad theta en esta región cerebral. Independientemente de cual sea el sentido de la regulación serotoninérgica sobre el hipocampo, es un hecho que existe una interacción funcional de las terminales serotoninérgicas y colinérgicas en dicha área cerebral, en la que se ha propuesto que la primera regula la actividad de la segunda y aunque las alteraciones en los patrones de inervación de estos dos sistemas de neurotransmisión que resultan de la denervación serotoninérgica modifican la citoarquitectura neuronal de las células piramidales del propio campo CA1; en el

largo plazo faltaría demostrar la relación entre estas alteraciones y las resultantes en el patrón de disparo neuronal. Sin embargo, todos estos cambios al parecer no están relacionados con el aprendizaje espacial dependiente del hipocampo, según lo indican los antecedentes ya mencionados. Así, mientras que por una parte aún no está clara cual es la participación de la serotonina en la modulación del EEG hipocampal en condiciones de reposo, no existen estudios acerca de las modificaciones que pudiesen ocurrir al evaluar la actividad EEG hipocampal concomitante a los procesos de aprendizaje que éste sustenta, de existir tal participación.

JUSTIFICACIÓN

Dado que no existen aún datos concluyentes que conduzcan a la conciliación de todos los hallazgos experimentales antes mencionados, es importante evaluar la participación de la serotonina hipocampal en la organización de la capacidad de orientación espacial, tanto con respecto al nivel estratégico en que pudiera estar involucrada, como a la relación que guarda con la actividad theta hipocampal presente durante el aprendizaje espacial, en tareas en las que el componente estratégico se halle efectivamente dissociado.

HIPÓTESIS

El abatimiento de la concentración de serotonina hipocampal que altera el uso de las estrategias de aprendizaje de señales y aprendizaje egocéntrico, no modificará la actividad theta del hipocampo, ni el uso de estrategias de aprendizaje de lugar.

OBJETIVO GENERAL

Establecer la participación del sistema serotoninérgico hipocampal en la resolución de diferentes problemas de orientación espacial en correlación con los cambios de la actividad theta del hipocampo concurrente a la resolución de mismas y con las modificaciones en la citoarquitectura neuronal de las células piramidales del campo CA1 hipocampal.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Establecer de que manera participa la serotonina hipocampal durante la adquisición de información espacial con respecto al tipo de estrategia utilizada en cada prueba y, por lo tanto, al tipo de información que el animal adquiere:
 - 1.1. Registrar la latencia y la distancia recorrida por los animales hasta encontrar la plataforma en el laberinto acuático en cada uno de cuatro ensayos diarios durante los 6 días consecutivos que durará cada una de las pruebas de aprendizaje espacial.
 - 1.2. Registrar el tiempo empleado por los animales y la distancia recorrida en la mitad del laberinto que no contenía la plataforma y en la mitad donde ésta se encontraba colocada durante el entrenamiento, al realizar la prueba de transferencia a los animales entrenados en el aprendizaje de lugar y el egocéntrico.
 - 1.3. Dibujar las rutas establecidas por los animales durante la búsqueda de la plataforma de escape, en cada una de las pruebas conductuales.

2. Evaluar las modificaciones de la actividad eléctrica hipocampal durante el proceso de aprendizaje y el efecto que produce el abatimiento de serotonina hipocampal sobre la actividad theta concomitante.
 - 2.1. Registrar la actividad eléctrica hipocampal, durante el desarrollo de las pruebas de orientación espacial divididas en tres etapas: atento quieto (basal), de búsqueda y meta; a partir de lo cual se obtendrá el espectro de potencia por etapa de cada grupo.
 - 2.2. A partir de la división del espectro de la banda theta en tres sub-bandas de frecuencia: de baja (4-6.5 Hz), alta (6.5-9.5 Hz) y máxima (9.5-12 Hz) frecuencia establecer las diferencias de la potencia relativa de la actividad theta hipocampal para cada sub-banda de frecuencia y etapa de prueba, del primer día de entrenamiento con respecto a los subsiguientes.
 - 2.3. A partir de la división del espectro de la banda theta en tres sub-bandas de frecuencia: de baja (4-6.5 Hz), alta (6.5-9.5 Hz) y máxima (9.5-12 Hz) frecuencia establecer las diferencias de la potencia relativa de la actividad theta hipocampal para cada sub-banda de frecuencia, con respecto a la etapa de conductual: atento quieto, búsqueda y meta; en un mismo día de entrenamiento.
3. Conocer la repercusión de la desnervación serotoninérgica hipocampal específica, sobre la estructura citoarquitectónica de las neuronas piramidales del área CA1, y su posible relación con la actividad eléctrica (EEG) de ésta región:

- 3.1. Cuantifica la densidad y proporcionalidad de la forma geométrica de las espinas dendríticas en la dendrita apical, en una dendrita oblicua y en una dendrita basal; de las neuronas piramidales del campo CA1 hipocampal.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 92 sujetos ratas macho de la cepa Sprague-Dawley de 350 a 450 g de peso mantenidas bajo condiciones estándar de bioterio con ciclos luz oscuridad de 12X12 hrs. Se formaron 3 lotes de animales, de los cuales un lote fue entrenado en la prueba de aprendizaje de lugar, el segundo en el aprendizaje de señal y el último en el aprendizaje egocéntrico. Cada uno de estos lotes fue dividido en 3 grupos: 1) Grupo testigo (n = 13, n = 10 y n = 10; para los animales entrenados en las pruebas de aprendizaje de lugar, de señal y egocéntrico; respectivamente), que fue implantado con un electrodo bipolar concéntrico en el hipocampo dorsal derecho; 2) Grupo control (n = 10, n = 9 y n = 10; para los animales entrenados en las pruebas de aprendizaje de lugar, de señal y egocéntrico; respectivamente), que fue sometido a la implantación del electrodo de registro y al procedimiento de lesión de las aferentes serotoninérgicas sin la aplicación de la sustancia neurotóxica, y; 3) Grupo experimental (n = 10, para los tres grupos de animales experimentales), que fue sometido a la implantación del electrodo de registro y a la lesión de los aferentes serotoninérgicos hipocampales.

Implantación de electrodos

Diez días antes de iniciar las pruebas conductuales se colocó un electrodo bipolar concéntrico en el estrato oriens/piramidal del área CA1 del hipocampo derecho a cada animal con coordenadas 4.0 mm posterior a Bregma, 2.2 mm lateral a la línea media y 2.7 mm dorsoventral a la superficie del cráneo (Paxinos y Watson, 1986). Para ello las ratas fueron anestesiadas con dehidrobenzoperidol (1 mg/k) y ketamina (50 mg/k), aplicados intraperitonealmente, así como éter etílico como anestesia de mantenimiento. El electrodo bipolar estuvo construido con alambre de nicromo de 65 µm de diámetro, fijado dentro de una cánula de acero inoxidable de calibre 25 aislada con resina epóxica, con una pequeña superficie de registro expuesta en la punta. Un tornillo de acero inoxidable colocado en el hueso

frontal sirvió como electrodo de tierra. Los electrodos fueron soldados a un conector que fue fijado al cráneo del animal con acrílico.

Lesión de los aferentes serotoninérgicos del hipocampo

Durante la misma intervención quirúrgica en que se realizó la implantación del electrodo, los animales de los grupos control y experimentales recibieron la aplicación de la solución vehículo y el neurotóxico 5,7-DHT respectivamente, para lo cuál se procedió de la siguiente manera: las lesiones de las fibras serotoninérgicas se realizaron aplicando bilateralmente una microinyección de 5,7-DHT en el haz del cíngulo y otra en fimbria fórnix. La 5,7-DHT fue disuelta en solución salina al 1% de ácido ascórbico (0.4 µg de base libre de 5,7-DHT en 0.4 µl de solución salina). Las coordenadas fueron: 15° de inclinación con respecto a la vertical, 1.0 mm posterior a Bregma, **1.4** mm bilateral a la línea media y, **2.4** mm dorsoventral a la superficie del cráneo para lesionar el haz del cíngulo mientras que para lesionar fimbria-fórnix la profundidad fue de **4.4** mm dorsoventral a la superficie del cráneo. Media hora antes de realizar la lesión los animales recibieron 30 mg/kg de desipramina ip., con la finalidad de evitar la captura del neurotóxico por parte de terminales noradrenérgicas y dopaminérgicas (Murtha y Pappas, 1994). Luego de 10 días de recuperación se realizaron las evaluaciones conductuales.

Evaluaciones conductuales

Para realizar las pruebas conductuales se utilizó una tina circular de 130 cm de diámetro llena con agua mantenida a 25°C dentro de la cual se colocó una plataforma de cristal de 12X12 cm, hundida o visible según el tipo de prueba.

Durante 6 días consecutivos y en 4 turnos diarios con un intervalo inter-ensayo de 2 minutos. Cada ensayo consistió en lo siguiente, se colocó a la rata de cara a la tina y se le permitió buscar la plataforma y una vez que la localizó se le permitió estar sobre ella por 15 segundos. Si luego de 60 segundos la rata no logró

localizar la plataforma, fue colocada sobre ella por el experimentador e igualmente se le permitió permanecer en ella durante 15 segundos. Todos los animales fueron sometidos a la prueba conductual correspondiente y el séptimo día a la prueba de transferencia.

Prueba de aprendizaje egocéntrico: para la prueba de aprendizaje egocéntrico se rodeó al laberinto con una cortina negra con la finalidad de suprimir las señales espaciales. Dentro de la tina se colocó una plataforma de cristal de 12X12 cm, cuya superficie quedó por debajo del nivel del agua. El entrenamiento se realizó durante 6 días consecutivos en un ambiente sin señales espaciales. El punto de inicio y la posición de la plataforma hundida fueron mantenidos en una relación física constante entre sí, pero en rotación positiva alrededor del interior del laberinto; con la finalidad de evitar que el animal resolviera el problema mediante señales auditivas.

Prueba de aprendizaje de señal: para la prueba de aprendizaje de señal se colocó dentro de la tina una plataforma de cristal de 12X12 cm, cuya superficie pintada de blanco quedó visible por encima del nivel del agua (2cm). La posición de la plataforma fue modificada al azar en cada ensayo y el animal salió así mismo, de diferente punto de inicio en cada ensayo. El entrenamiento tuvo una duración de 6 días consecutivos.

Prueba de aprendizaje del lugar: De igual manera que para la prueba de aprendizaje egocéntrico se utilizó una plataforma de cristal de 12X12 cm, cuya superficie quedó por debajo del nivel del agua. Sin restricción de señales espaciales (constituidas por los elementos del cuarto de registro) y la plataforma hundida mantenida en una posición constante, se dejó a cada animal partir desde diferentes puntos de inicio de manera aleatoria.

Al séptimo día, luego de 6 días consecutivos de entrenamiento todos los animales de los tres lotes de entrenamiento fueron sometidos a la prueba de transferencia, que consistió en colocar al animal en la tina sin la plataforma y

dejarle buscarla durante 30 segundos, posteriormente a los cuales fue retirado de la misma.

Las rutas de nado fueron video-grabadas y procesadas cuantitativa y cualitativamente con la ayuda de un analizador de imágenes digital Zeiss Image 3.0.

A partir de las pruebas conductuales de los animales se cuantificaron las siguientes variables

- La distancia total recorrida por cada animal durante la búsqueda de cada ensayo, así como la latencia de escape de los 6 días de entrenamiento.
- El promedio de velocidad de nado por grupo (como indicativo del desempeño motor y del estado motivacional del animal).
- La distancia recorrida por cada animal durante los 30 segundos de la prueba de transferencia, en cada uno de los 4 cuadrantes en que fue dividido virtualmente el laberinto.
- A partir del trazo de las trayectorias de los animales, se elaboraron composiciones representativas de sus vías de nado con la finalidad de realizar el análisis cualitativo de las mismas.

Con el propósito de evaluar la adquisición de información, se promediaron los resultados de los 4 ensayos diarios de cada grupo y se analizaron estadísticamente.

Registro del EEG hipocampal

El registro de la actividad eléctrica hipocampal se realizó simultáneamente con las pruebas conductuales (Neuro Data Acquisition System de GRASS Mod. 12C-4-23). Se realizó un registro bipolar diferencial a partir del electrodo bipolar concéntrico colocado en el área CA1 del hipocampo dorsal derecho, en el que el alambre de nicromo correspondió a G1 y la cánula a G2. Los filtros de alta y baja frecuencia fueron colocados a 1 y 30 Hz respectivamente y los registros capturados con una frecuencia de muestreo de 256 Hz, y fueron almacenados para su análisis posterior en la memoria del equipo de cómputo.

El día del ensayo de habituación correspondió al primer día de registro y sirvió como línea basal para las comparaciones posteriormente descritas. El registro del EEG hipocampal durante el ensayo de habituación fue dividido en tres etapas “atento quieto”, “búsqueda” y “meta”. El registro “atento quieto” se realizó a la rata mojada en su caja de reposo durante un periodo de 15 segundos. Enseguida el registro de la etapa “búsqueda” se realizó desde el momento que la rata fue colocada en el agua y terminó cuando el animal subió a la plataforma de escape. El de “meta” consistió en un registro de 15 segundos sobre la plataforma de escape.

De manera semejante al registro del ensayo de habituación, para los 6 días de entrenamiento propiamente dicho se tomó un registro “atento quieto” del animal mojado en su caja de mantenimiento, así como; durante la búsqueda de los animales (“búsqueda”), y durante 15 segundos sobre la plataforma de escape (“meta”); en cada uno de los 4 ensayos diarios.

Una vez registrada la actividad eléctrica de la banda hipocampal correspondiente al ritmo theta, ésta fue dividida para su análisis en tres sub-bandas: banda theta de baja frecuencia: 4-6.5 Hz (theta tipo 1), banda theta de alta frecuencia: 6.5-9.5 Hz (theta tipo 2) y banda theta de máxima frecuencia: 9.5-12 Hz (el resto de la banda theta).

De cada sub-banda se obtuvo el promedio de los cuatro ensayos diarios por cada día de prueba, de la potencia relativa de cada una de las etapas conductuales: -“atento quieto”, “búsqueda” y “meta”-; con el propósito de evaluar la adquisición de información. La potencia relativa se obtuvo a partir de la potencia absoluta de la banda de 4 a 12 Hz,

Estudios histológicos

Para verificar la posición del electrodo, así como la ubicación y extensión de la lesión, al final de los experimentos los animales fueron perfundidos por vía intra-cardiaca con 200 ml de una solución lavadora constituida por amortiguador

de fosfatos (pH 7.4 y 0.1 M), a la que se añadieron 1000 UI/L de heparina sódica como anticoagulante y 1 g/L de procaína como vasodilatador (Feria-Velasco y Karnovsky, 1970); seguido de la perfusión de 200 ml de una solución fijadora constituida por formaldehído al 4 % amortiguado en una solución de fosfatos (pH 7.4 y 0.1 M). Se realizó la craneotomía y la extracción del cerebro, del que se obtuvieron bloques de tejido de la zona de lesión de los aferentes serotoninérgicos y del hipocampo derecho para ser procesados mediante técnicas histológicas de rutina y teñidos conforme a la técnica de violeta de cresilo.

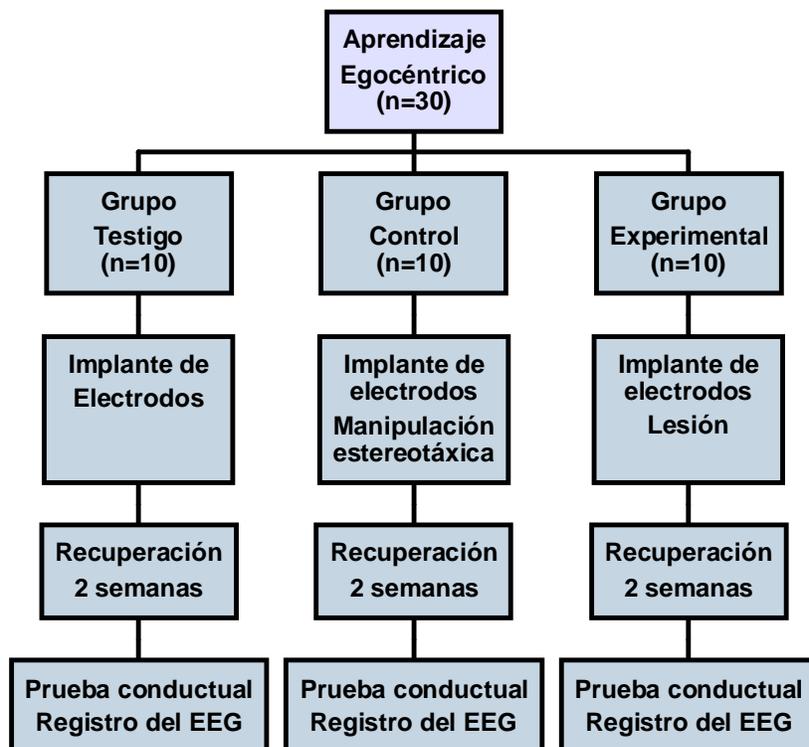
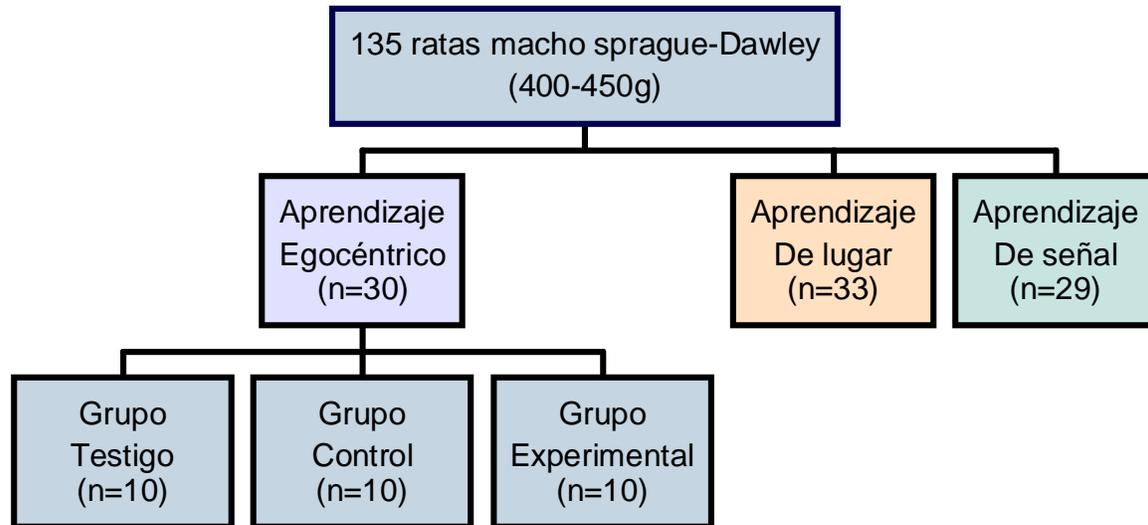
A partir de la fijación inicial por perfusión y para el estudio de la citoarquitectura neuronal se procesó el hipocampo izquierdo de 8 animales con la técnica de Golgi modificada (González-Burgos, y cols., 1992). Se disecaron fragmentos del hipocampo dorsal izquierdo, de cada uno de los cuales se obtuvieron no más de 10 cortes coronales de 150 μm de espesor; de éstos, se seleccionaron 5 neuronas claramente distinguibles de la capa más profunda del hipocampo para la medición en un analizador de imágenes (Zeiss Image 3.0) de la densidad de espinas en 50 μm mediales de: la dendrita apical tanto en su porción radiada como en su porción lacunoso-molecular, de una dendrita oblicua y de una dendrita basal. Adicionalmente, a partir del punto central de tales segmentos dendríticos se contabilizó la proporcionalidad de 100 espinas categorizadas con base en su estructura geométrica en: "larga", "gorda" "en hongo" y "ramificada" (Edwards, 1995). La observación de espinas se realizó a 1000 ampliaciones en un microscopio óptico (Zeiss mod. axiolab).

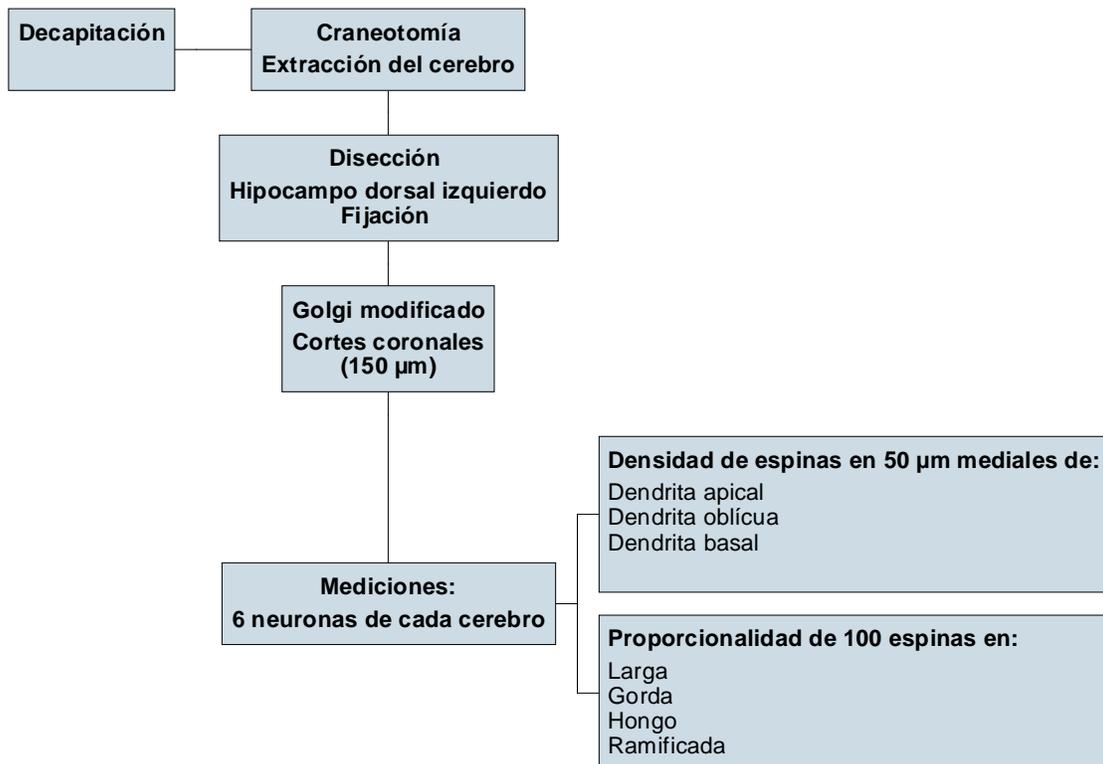
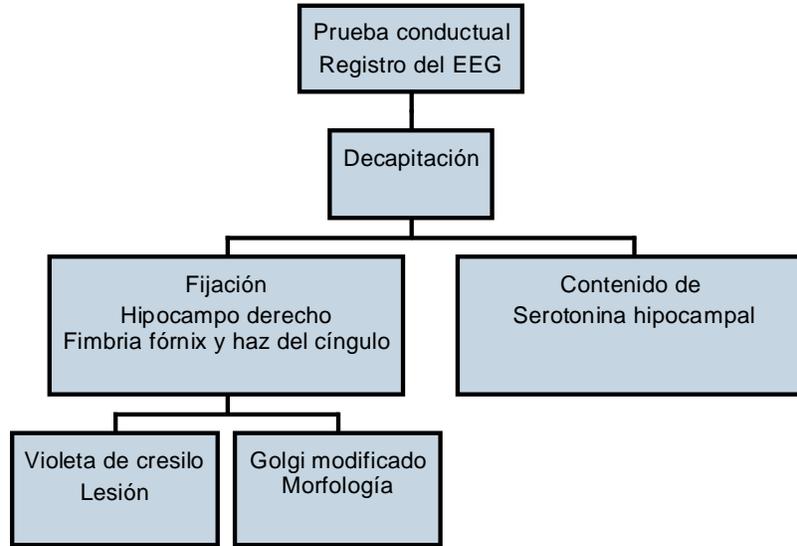
Bioquímica

Para cuantificar la disminución de serotonina hipocampal resultante del procedimiento de desnervación de los aferentes rafé-hipocampales, se midieron las concentraciones de serotonina y su metabolito principal ácido 5-hidroxi-indolacético (5HIAA) a 7 animales testigo, 7 animales control y 12 animales experimentales (sin importar el entrenamiento recibido) utilizando la técnica de

cromatografía líquida de alta resolución. Se realizó la decapitación de las ratas y la disección del tejido en frío (50 mg) se homogeneizó el tejido en 300 μ l de HCl 0.1N (frío), seguido de dos enjuagues de 100 μ l cada uno con agua HPLC (fría) y la aplicación de 30 μ l de ácido perclórico (por 50 mg de tejido). Posteriormente se centrifugó a 15,000 g/5 minutos (5000 RPM). El sobrenadante fue retirado y filtrado (con membrana de 22 μ m). La fase móvil utilizada estuvo constituida de NaH_2PO_4 0.1M, EDTA (0.372 g/L), ácido octanosulfónico sódico 2mM, y metanol 8% (pH 3.78-3.8). La velocidad de flujo fue de 0.8 ml/min en una columna Altex ultraesfera ODS 5- μ M que sirvió como fase estacionaria (34). Se utilizó un equipo Waters con detector electroquímico (Electrodo de hidrógeno $-V_{\text{trabajo}} = 0.584$ mV-ajustado para el pH 3.78). Los resultados fueron expresados en pg /mg de tejido.

DIAGRAMA DE FLUJO





Diseño experimental

Para los experimentos conductuales se utilizó un diseño de parcelas divididas de dos factores, un factor intergrupar (grupo: comparación de distancia y velocidad de nado de un mismo día entre grupos) y un factor intragrupal (día de entrenamiento, comparación de latencia del primer día vs. los subsecuentes dentro de cada grupo).

Para los experimentos del registro de la actividad eléctrica se utilizó un diseño de parcelas divididas de tres factores (uno para cada grupo de entrenamiento conductual). Un factor intergrupar (grupo: comparaciones de la potencia absoluta y relativa entre los tres grupos: testigo, control y experimental, por cada etapa y día de prueba). Dos factores intragrupal (etapa de prueba y día de entrenamiento: comparaciones de la potencia relativa de cada etapa de prueba entre el primer día y los subsecuentes y entre etapas un mismo día de prueba).

Variabes: distancia y velocidad de nado

Prueba APRENDIZAJE EGOCENTRICO		Día					
		1	2	3	4	5	6
Grupo	T						
	C						
	E						

Lo mismo se aplica para los otros dos tipos de entrenamiento.

Variable: potencia relativa

Prueba APRENDIZAJE EGOCENTRICO		Día							
		1			2	3	4	5	6
Grupo	T	Etapa							
		BASAL	BUSQUEDA	META					
	Banda B / A / M.								
C									
E									

B, baja; A, alta; y, M, máxima frecuencia.

Se aplica lo mismo para los otros dos tipos de entrenamiento.

Variable: densidad de espinas

Morfología I		Dendrita		
		ap	ob	ba
Grupo	T			
	C			
	E			

ap, apical; ob, oblicua; ba, basal.

Variable: tipo de espina

Morfología II		Dendrita						
		ap			ob	ba		
Grupo	T	G	A	H	L	R		
	C							
	E							

G, gorda; A, ancha; H, hongo; L, larga; R, ramificada.

Análisis estadístico

Se realizaron las comparaciones intragrupalas de la mediana tanto de las latencias promedio por día, mediante el análisis de varianza no paramétrico de Friedman y la prueba de rangos señalados y pares igualados de Wilcoxon. Así mismo, los datos de distancia total recorrida y velocidad de nado durante la etapa de búsqueda fueron comparados mediante el ANOVA de medidas repetidas y tukey. Las comparaciones intergrupales de latencia de escape fueron realizadas mediante la prueba de Kruskal-Wallis y por la "U" de Mann-Withney.

La actividad eléctrica hipocampal una vez dividida en las tres bandas antes mencionadas fue comparada entre fases en un mismo día de prueba y por día de prueba en una misma fase. Las comparaciones de las potencias absoluta y relativa fueron realizadas mediante un análisis de varianza de 3 factores y como prueba *post-hoc* se aplicó la prueba de Tukey.

Todas las cuantificaciones relativas a la citoarquitectura neuronal se realizaron mediante estudios "ciegos" y el análisis estadístico de los datos se llevó a cabo mediante un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores (grupo y tipo de dendrita, para la comparación de densidad de espinas, y; grupo y tipo de espinas para la forma de espinas) y de la prueba de Tukey para las comparaciones *post hoc*

RESULTADOS

Histología

El control histológico para la verificación del sitio de colocación del electrodo y del sitio de aplicación del neurotóxico, son mostrados en la figura R1. En la Figura R1A se muestra el sitio donde estuvo colocada la punta del electrodo en el estrato oriens/pirámidal de CA1. En la figura R1B se observa la zona de aplicación del 5,7-DHT, que se circunscribe a las regiones de fimbria fórnix y el haz del cíngulo.

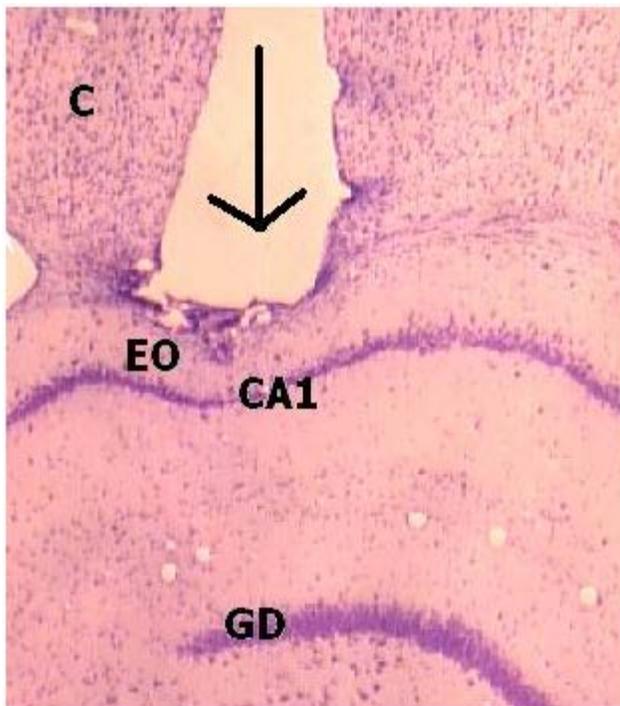


Figura R1A (arriba). Micrografía de un corte coronal del hipocampo dorsal derecho que muestra la posición del electrodo de registro (flecha) en el estrato oriens-pirámidal. C, corteza cerebral; EO, estrato oriens; CA1, Cuerno de Ammón 1; GD, giro dentado. Magnificación 4 X.

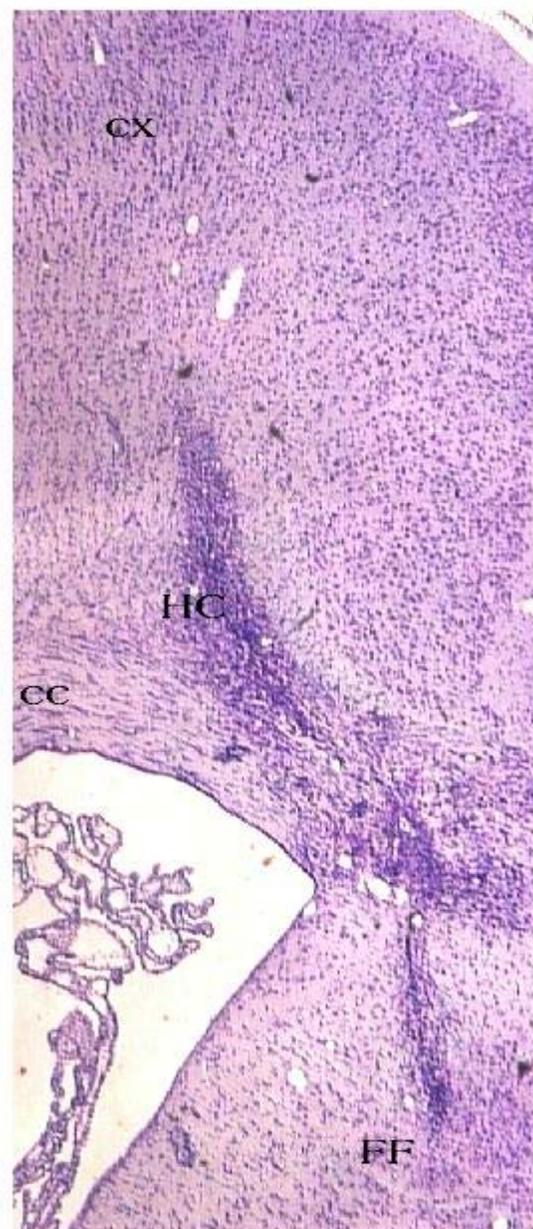


Figura R1B (derecha). Micrografía de un corte coronal del cerebro anterior que muestra el sitio de la aplicación de 5,7-DHT. HC, haz del cíngulo, FF, fimbria fórnix. cx, corteza; cc, cuerpo calloso. Magnificación 4X.

Bioquímica

La figura R2 muestra los valores obtenidos a partir de la medición de 7 animales testigo, 7 control y 12 experimentales, sin considerar el grupo de entrenamiento espacial, mostraron diferencias significativas en la concentración de serotonina hipocampal [$F(3,23) = 37.414, p < 0.001$] de manera que al realizar las comparaciones pareadas el grupo control tuvo significativamente menos serotonina que el testigo ($p < 0.008$) y el grupo experimental tuvo significativamente menos serotonina que los grupos testigo y control ($p < 0.001$ y $p = 0.021$, respectivamente). La concentración de ácido 5-hidroxi-indol-acético (5HIAA) hipocampal mostró efectos de grupo [$F(3,23) = 8.397, p = 0.001$], y las comparaciones pareadas mostraron un contenido significativamente mayor de 5HIAA en el grupo experimental con respecto al control ($p = 0.040$).

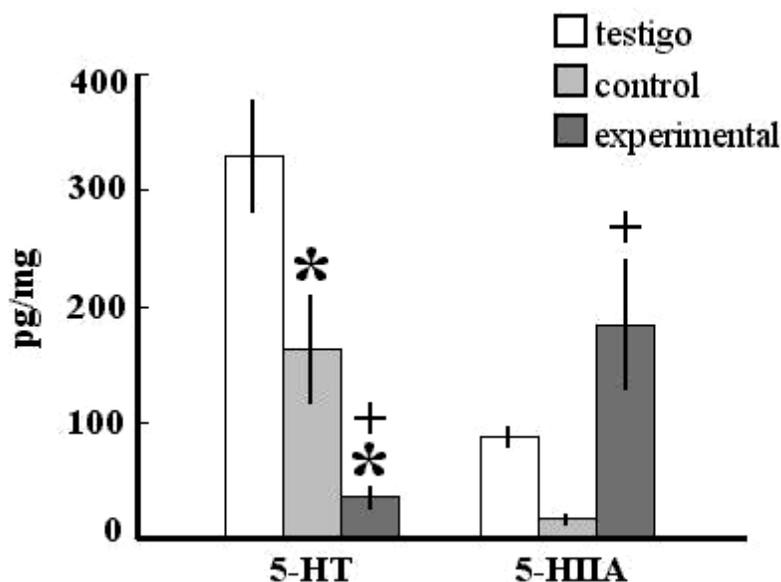


Figura R2. Contenido de serotonina y 5HIAA hipocampales de los grupos testigo, control y experimental. Media \pm error estándar. *, testigo vs. control y experimental; +, control vs experimental. $p \leq 0.004$.

La figura R3 muestra los valores que indican la velocidad de utilización de la serotonina, mediante la razón de cambio de este neurotransmisor, definida como el cociente de la concentración de 5HIAA sobre la concentración de 5-HT para cada grupo. Las comparaciones de la razón de cambio mostraron un efecto significativo del grupo [$F(2,23) = 7.270$, $p = 0.004$] de manera que los animales testigo mostraron una razón de cambio de 0.303 ± 0.047 , mientras que los animales del grupo control tuvieron una razón de cambio de 0.226 ± 0.072 . Por su parte, los animales del grupo experimental mostraron una razón de cambio de 9.33 ± 2.52 , que fue significativamente mayor con respecto a los grupos testigo ($p = 0.012$) y control ($p = 0.012$).

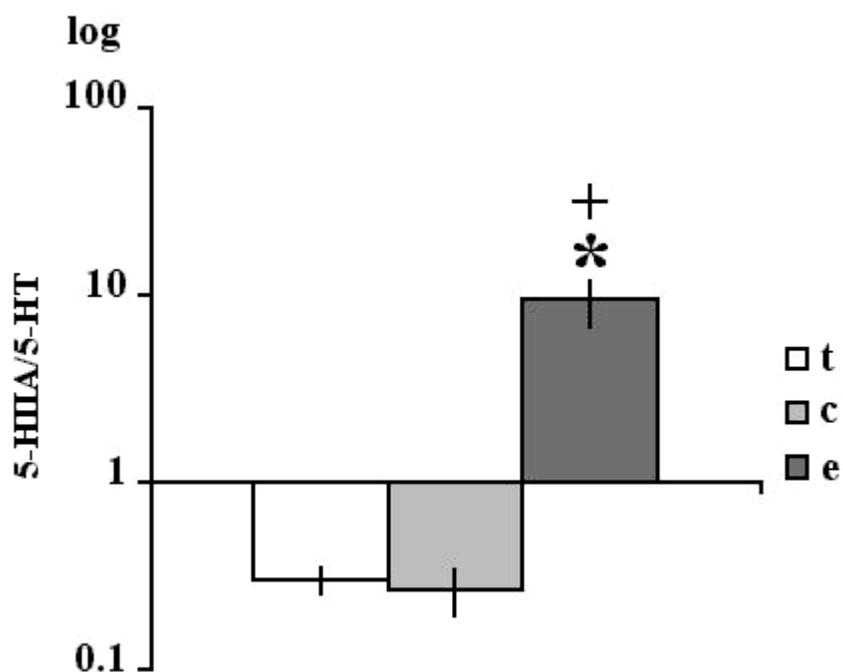


Figura R3. Razón de cambio de la serotonina hipocampal (concentración de serotonina/concentración de 5HIAA, escala logarítmica). Media \pm error estándar. *, Testigo vs. experimental; +, control vs experimental. $p = 0.012$.

APRENDIZAJE DE LUGAR

1. Conducta

Los animales de los tres grupos mostraron un aprendizaje de lugar eficiente. Las rutas de nado de un animal representativo (Figura R4), muestran un desarrollo progresivo de rutas de nado más directas hacia el punto de localización de la plataforma; además la concentración de la búsqueda alrededor del sitio donde estuvo colocada la plataforma es evidente durante el ensayo de transferencia (T).

Los animales del grupo testigo ($n = 13$) redujeron significativamente su latencia de escape durante el entrenamiento ($X^2_r = 36.077$, $p < 0.001$) de tal forma que los días 2, 3, 4, 5 y 6 tuvieron latencias menores con respecto al primero ($p = 0.023$, $p = 0.015$, $p = 0.001$, $p = 0.001$, y $p = 0.001$, respectivamente). De igual manera los animales del grupo control ($n = 10$) mostraron una reducción en su latencia de escape como producto del entrenamiento ($X^2_r = 27.543$, $p < 0.001$) desde el segundo día ($p = 0.009$) y durante el resto de los días de entrenamiento ($p = 0.005$ para los días 3 al 6). El grupo experimental, por su parte, redujo su latencia de escape ($X^2_r = .5.429$, $p < 0.001$) también desde el segundo día de entrenamiento ($p = 0.017$) y hasta el último día ($p = 0.009$ para el día 3 y, $p = 0.005$ para el resto de los días de entrenamiento) (figura R5).

Sin embargo, las comparaciones intergrupales mostraron un efecto del grupo los dos primeros días de entrenamiento ($H = 5.818$, $p = 0.05$ y $H = 7.861$, $p = 0.02$; respectivamente). De este modo las comparaciones pareadas mostraron que la latencia de escape de los animales del grupo experimental fue mayor con respecto al grupo testigo estos dos días ($z = -2.357$, $p = 0.018$ y $z = -2.171$, $p = 0.03$; respectivamente) y con respecto al grupo control solamente el segundo día de entrenamiento ($z = -2.721$, $p = 0.007$) (Figura R5).

Con respecto a la prueba de transferencia, el número de cruces por cuadrante de los tres grupos fue significativamente mayor sobre el cuadrante Este (donde se hallaba colocada la plataforma). El grupo testigo cruzó significativamente más veces en el cuadrante Este [$F(3,32) = 26.173, p < 0.001$] con respecto al Norte, Sur y Oeste ($p < 0.001$); igualmente los animales del grupo control cruzaron significativamente más veces sobre el cuadrante Este [$F(3,32) = 8.395, p < 0.001$] con respecto al Norte ($p = 0.03$), Sur ($p = 0.001$) y Oeste ($p = 0.001$). Por último, los animales del grupo experimental mostraron un mayor número de cruces sobre el cuadrante Este [$F(3,36) = 9.515, p < 0.001$] con respecto al Norte, Sur y Oeste ($P = 0.001$), al igual que los de los grupos testigo y control. No hubo diferencias entre grupos con respecto a éste parámetro [$F(6,100) = 1.197, p = 0.314$] (Figura R6).

Con respecto a la velocidad de nado de los animales entrenados en la prueba de aprendizaje de lugar, los tres grupos mostraron un incremento significativo con el entrenamiento. Los animales del grupo testigo incrementaron su velocidad de nado [$F(5,60) = 6.968, p < 0.001$] los días 3 ($p = 0.008$), 4 ($p = 0.007$), 5 ($p = 0.009$) y 6 ($p = 0.01$) de entrenamiento con respecto al primero. Por su parte, los animales del grupo control incrementaron su velocidad de nado [$F(5,45) = 3.136, p = 0.016$] solamente el cuarto día de entrenamiento ($p = 0.006$) con respecto al primero. Mientras que los animales del grupo experimental incrementaron la velocidad de nado [$F(5,45) = 10.931; p < 0.001$] desde el segundo día ($p = 0.047$) hasta el sexto ($p \leq 0.001$) con respecto al primer día de entrenamiento (Figura R7).

No hubo diferencias intergrupales en la velocidad de nado [$F(5,155) = 1.607, p = 0.161$] (Figura R7).

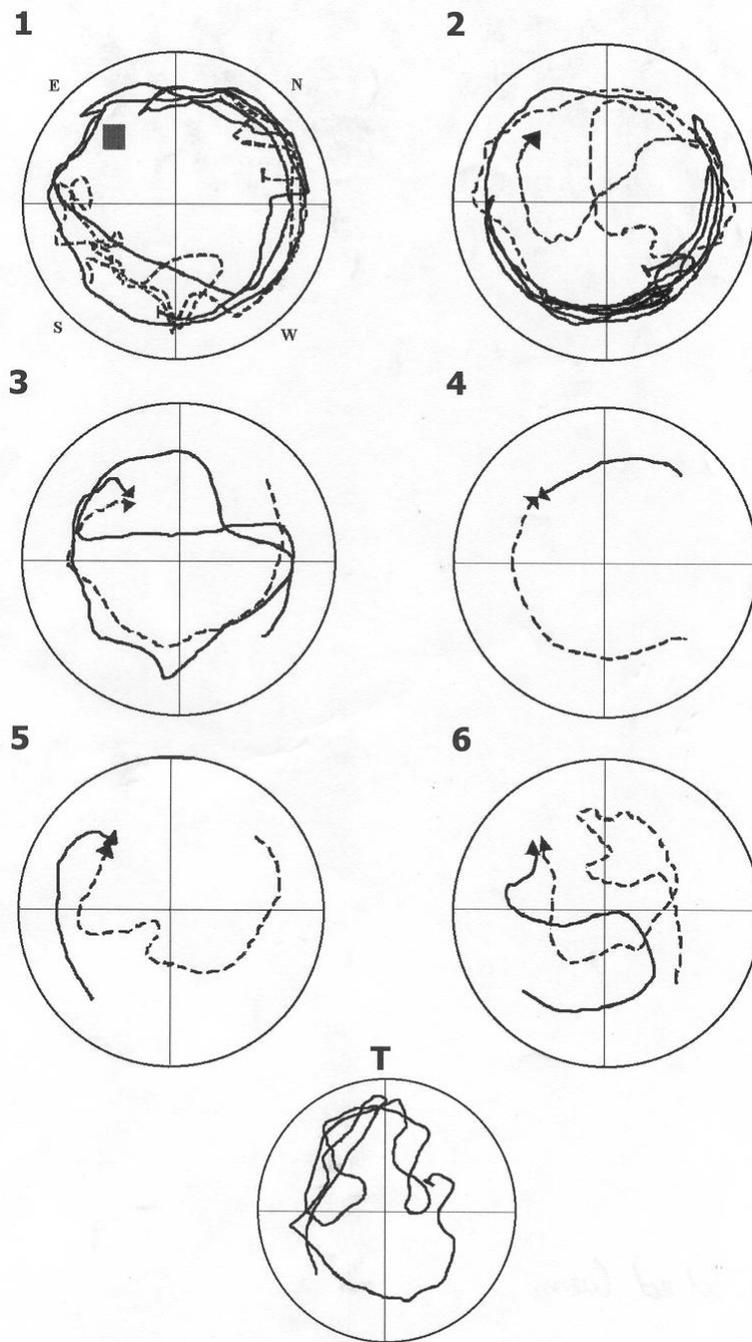


Figura R4. Rutas de nado representativas de un animal del grupo testigo entrenado en la prueba de aprendizaje de lugar durante los 6 días de entrenamiento (1-6). Línea sólida, primer ensayo; línea punteada, cuarto ensayo; T, prueba de transferencia.

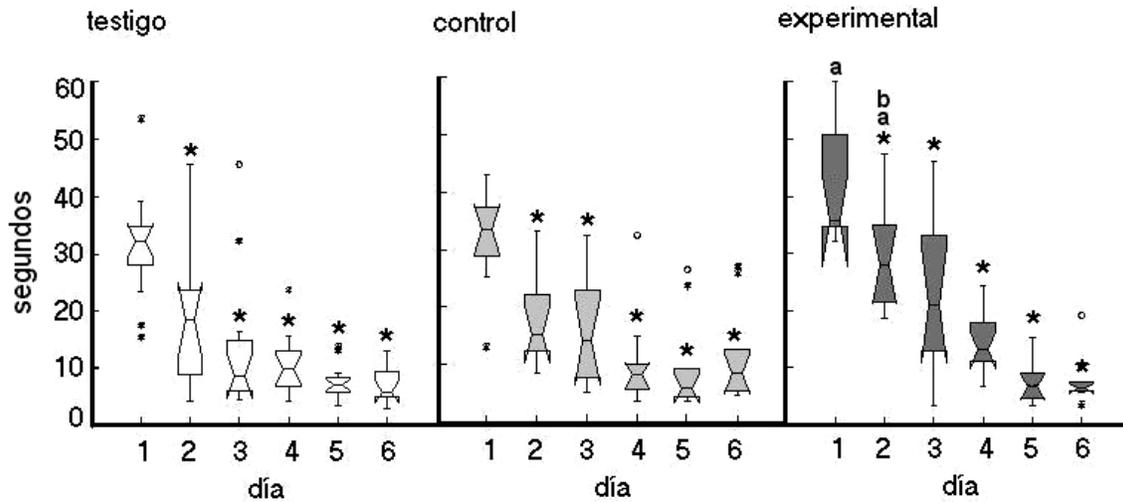


Figura R5. Latencia de escape obtenida por los animales entrenados en aprendizaje de lugar. Mediana \pm error estándar de la mediana. *, día 1 vs. siguientes; a, testigo vs. experimental; b, control vs. experimental. $p \leq 0.023$.

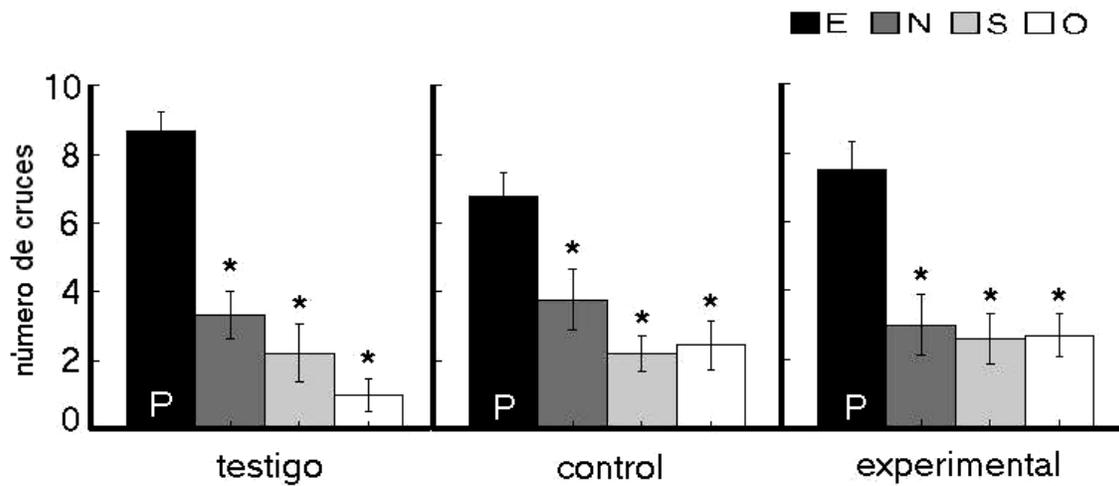


Figura R6. Número de cruces por cuadrante realizados por los animales entrenados en la prueba de aprendizaje de lugar. P, cuadrante donde se hallaba localizada la plataforma durante el entrenamiento. Media \pm error estándar. *, Este (E) vs. Norte (N), Sur (S) y Oeste (O). $p \leq 0.03$.

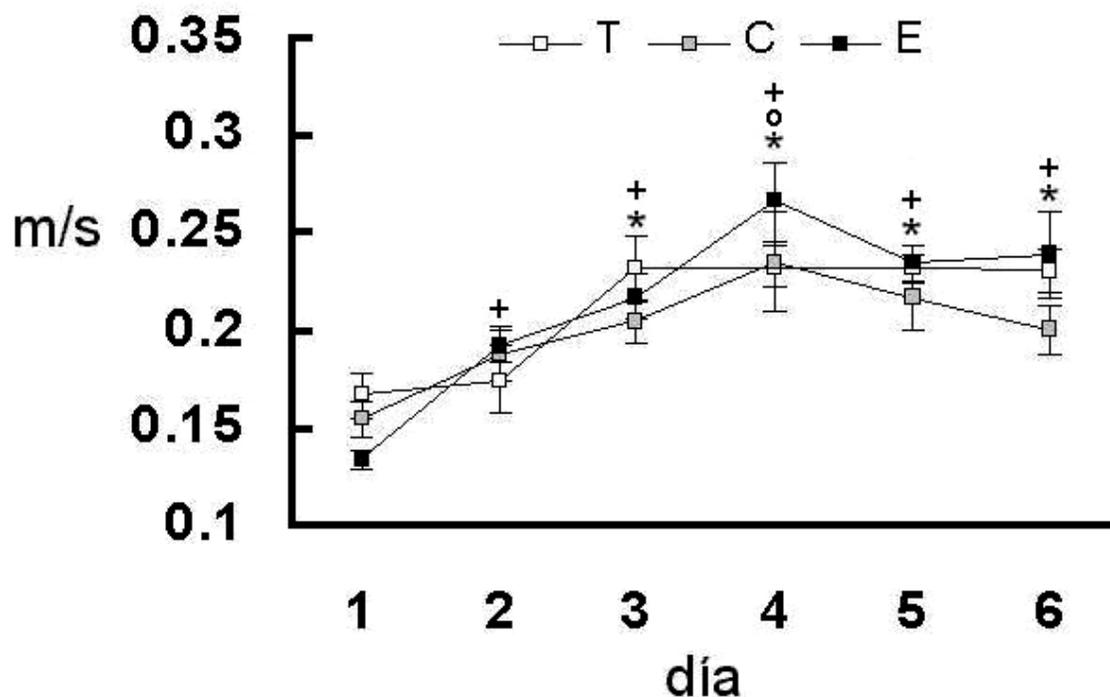


Figura R7. Velocidad de nado desarrollada por los animales entrenados en la prueba de aprendizaje de lugar. Media \pm error estándar. Día 1 vs. siguientes: *, grupo testigo; o, grupo control; +, grupo experimental. $p \leq 0.01$.

2. Electroencefalograma (EEG)

Los registros de EEG hipocampal en el área de CA1 mostraron actividad theta durante los 6 días de entrenamiento en las tres etapas conductuales consideradas en el presente estudio: basal, búsqueda y meta; predominando en éstas dos últimas. Un ejemplo representativo se observa en la figura R8 y corresponde a un animal del grupo testigo.

Se realizaron comparaciones intragrupal de potencia relativa (PR) para los factores día, etapa y sub-banda de frecuencia (baja: 4-6.5 Hz, alta: 6.5-9.5 Hz y máxima: 9.5-12 Hz frecuencia), para cada grupo. En la comparación de los factores banda/etapa los animales de los tres grupos mostraron un diferencias

significativas al considerar estos dos factores [$F(4,636) = 29.504, p < 0.001$; $F(4,477) = 27.797, p < 0.001$; $F(4,477) = 22.672, p < 0.001$, para los grupos testigo, control y experimental respectivamente]. A partir de las comparaciones pareadas con respecto a éste criterio, se observó que los animales de los grupos testigo y control mostraron diferencias significativas en la PR de las tres bandas con una mayor PR para la banda de alta frecuencia, mientras que con respecto a la etapa conductual, durante el registro basal la PR de la banda de baja frecuencia fue la mayor y durante la búsqueda la PR de la banda de alta frecuencia fue la mayor. De esta manera se expresó una separación de bandas bien definida durante las tres etapas de evaluación conductual ($p < 0.001$); mientras que el grupo experimental a diferencia de los grupos testigo y control, no mostró diferencia significativa entre las bandas de baja y alta frecuencia durante el registro basal (Tabla R1).

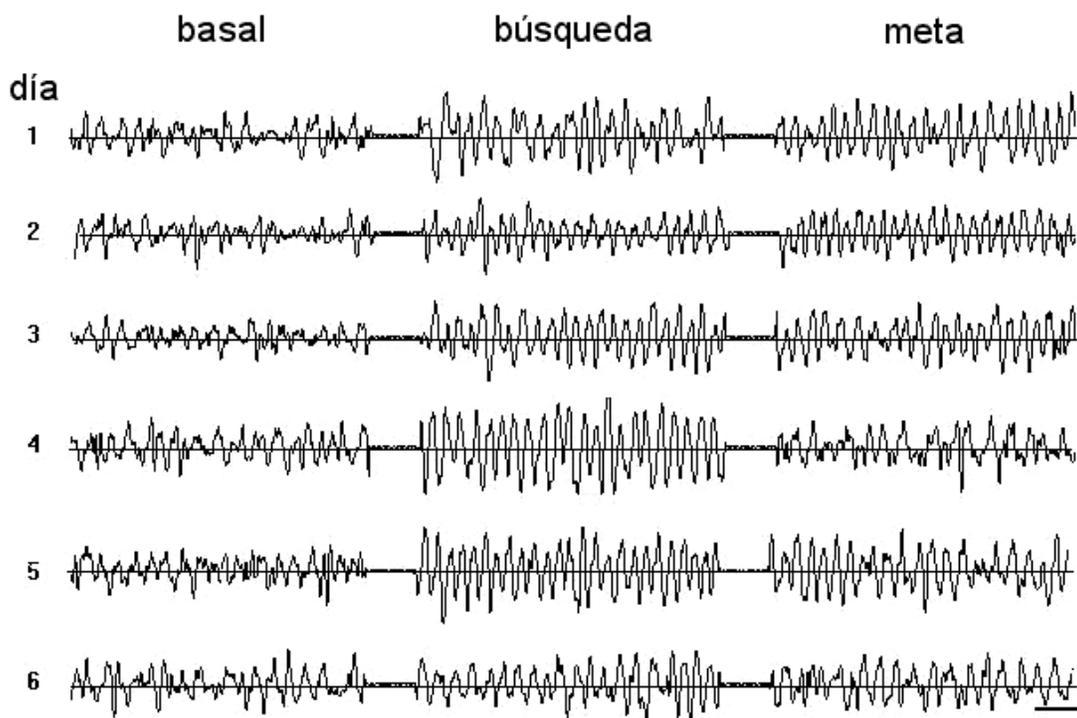


Figura R8. Registros representativos de un animal del grupo testigo entrenado en la prueba de aprendizaje de lugar, durante las tres etapas de estudio y los 6 días de entrenamiento conductual. Calibración: 100 μV , 500 ms.

Para la interacción de los factores día/banda, el grupo testigo mostró diferencias significativas [$F(10,636) = 1.990, p = 0.032$]; de tal forma que al realizar las comparaciones pareadas para la interacción de dichos factores, las tres bandas mostraron PR diferente cada día de entrenamiento de manera que la PR de la banda de alta frecuencia fue mayor que la de las bandas de baja y máxima frecuencia, mientras que la banda de máxima frecuencia también fue menor que la banda de baja frecuencia ($P \leq 0.001$; Figura R9). El grupo control no mostró un efecto significativo para la interacción día/banda [$F(10, 477) = 1.294, p = 0.231$].

TABLA R1. Potencia relativa por etapa y banda, de las ratas entrenadas en la prueba de Aprendizaje de Lugar.

Grupo	Etapa	Baja frecuencia	Alta frecuencia	Máxima frecuencia
Testigo	Basal	38.43 ± 0.595	42.18 ± 0.633*	19.34 ± 0.452**
	Búsqueda	33.58 ± 0.647 ^a	48.15 ± 0.696* ^a	18.19 ± 0.296**
	Meta	38.48 ± 0.610 ^b	44.15 ± 0.603* ^b	17.35 ± 0.246**
Control	Basal	37.82 ± 0.625	41.71 ± 0.638*	20.45 ± 0.441**
	Búsqueda	32.21 ± 0.713 ^a	48.72 ± 0.803* ^a	18.84 ± 0.416**
	Meta	35.33 ± 0.737 ^b	47.01 ± 0.832* ^a	17.31 ± 0.366** ^a
Experimental	Basal	38.33 ± 0.679	39.94 ± 0.665	21.34 ± 0.679**
	Búsqueda	33.85 ± 0.714 ^a	45.62 ± 0.617* ^a	20.85 ± 0.700**
	Meta	38.44 ± 0.393 ^b	42.76 ± 0.464* ^{ab}	18.76 ± 0.280**

Media ± error estándar. *, Baja vs. alta, máxima frecuencia; +, alta vs. máxima frecuencia; a, basal vs. búsqueda, meta; b, búsqueda vs. meta. $P < 0.05$.

Sin embargo, estos animales mostraron una separación de bandas semejante a la del grupo testigo al realizar comparaciones pareadas (Figura R10). Con este mismo criterio de comparación el grupo experimental mostró diferencias significativas entre las bandas cada día de entrenamiento [$F(10,477) = 2.096, p = 0.023$] pero a

diferencia de los grupos testigo y control no mostró una separación de las bandas de baja y alta frecuencia los dos primeros días de entrenamiento, mismos en los que su latencia de escape fue mayor con respecto al grupo testigo. El grupo experimental mostró una separación bien definida de estas dos bandas solamente los días 3 ($p < 0.001$), 5 ($p < 0.001$) y 6 ($p < 0.001$) de entrenamiento (Figura R11).

Por último, para la interacción de los factores día/etapa/banda los animales del grupo testigo mostraron diferencias significativas en la PR [$F(20,636) = 2.007$, $p = 0.006$], mientras que los animales de los grupos control y experimental no mostraron significancia para esta interacción [$F(20,477) = 0.975$, $p = 0.491$ y $F(20,477) = 0.594$, $p = 0.917$, respectivamente]. En las comparaciones pareadas con respecto a éste criterio, el grupo testigo mostró valores similares de PR en la banda de baja frecuencia para las tres etapas conductuales de registro durante el primer día de entrenamiento. La PR en esta banda mostró una tendencia paulatina a la separación de valores entre las etapas de basal y búsqueda que fue significativa el quinto día de entrenamiento, de tal forma que durante la búsqueda la PR en la banda de baja frecuencia fue menor con respecto a la etapa basal ($p = 0.004$). En la banda de alta frecuencia se observó un efecto similar de separación pero en éste caso la PR mostró una tendencia a incrementarse con el entrenamiento durante la etapa de búsqueda, de forma que los días 3 y 5 de prueba la PR fue mayor durante la búsqueda con respecto al registro basal ($p = 0.011$ y $p < 0.001$, respectivamente). No hubo diferencias significativas en la banda de máxima frecuencia (Figura R12).

Por su parte los grupos control y experimental no mostraron diferencias significativas en lo que se refiere a éste criterio (Figuras R13 y R14, respectivamente).

Grupo Testigo

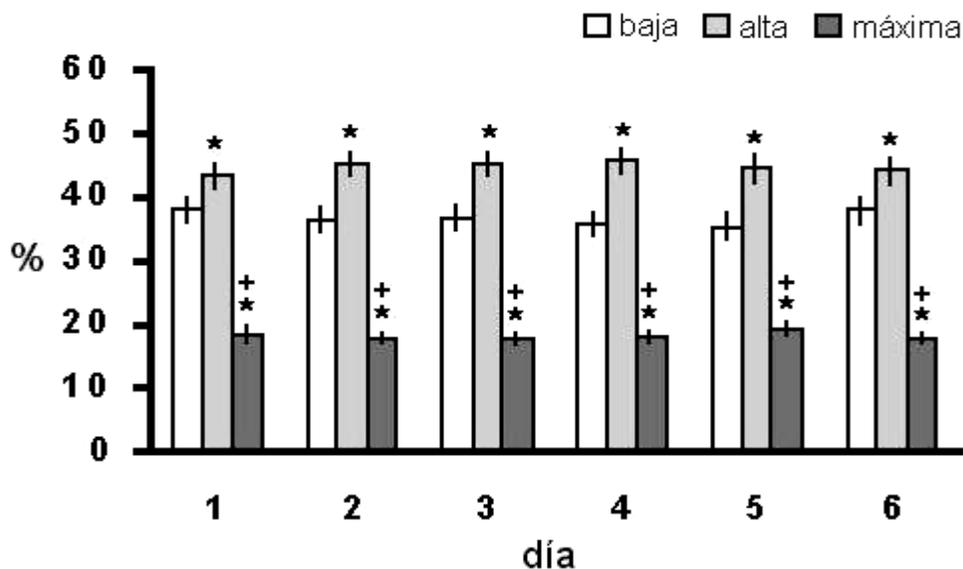


Figura R9. Potencia relativa de los animales del grupo testigo entrenados en la prueba de aprendizaje de lugar. Comparación de la PR entre las bandas de baja, alta y máxima frecuencia cada día de entrenamiento. Media \pm 2 errores estándar. *, baja frecuencia vs. alta y máxima frecuencia; +, alta frecuencia vs. máxima frecuencia. $p \leq 0.001$.

Grupo Control

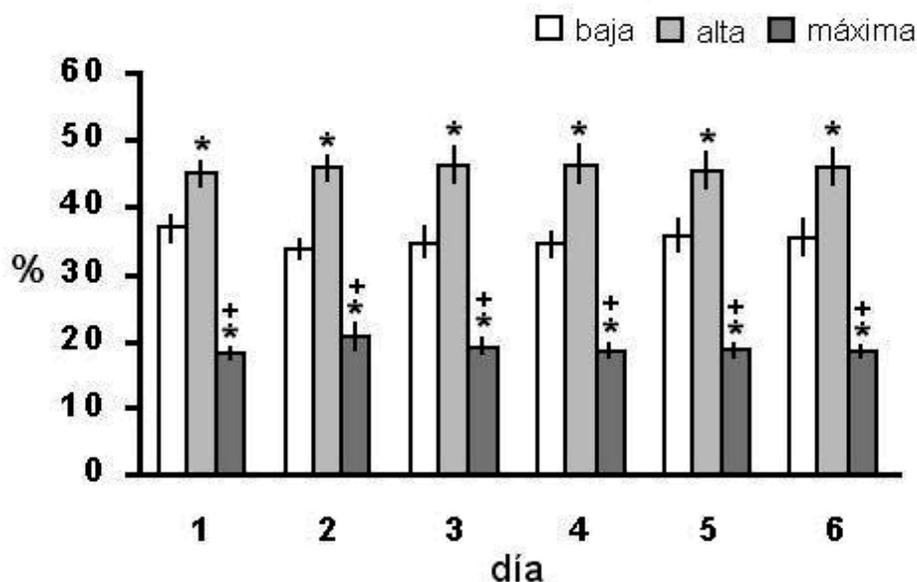


Figura R10. Potencia relativa de los animales del grupo control entrenados en la prueba de aprendizaje de lugar. Comparación de la PR entre las bandas de baja, alta y máxima frecuencia cada día de entrenamiento. ANOVA no significativo. Media \pm 2 errores estándar. *, baja frecuencia vs. alta y máxima frecuencia; +, alta frecuencia vs. máxima frecuencia.

Grupo Experimental

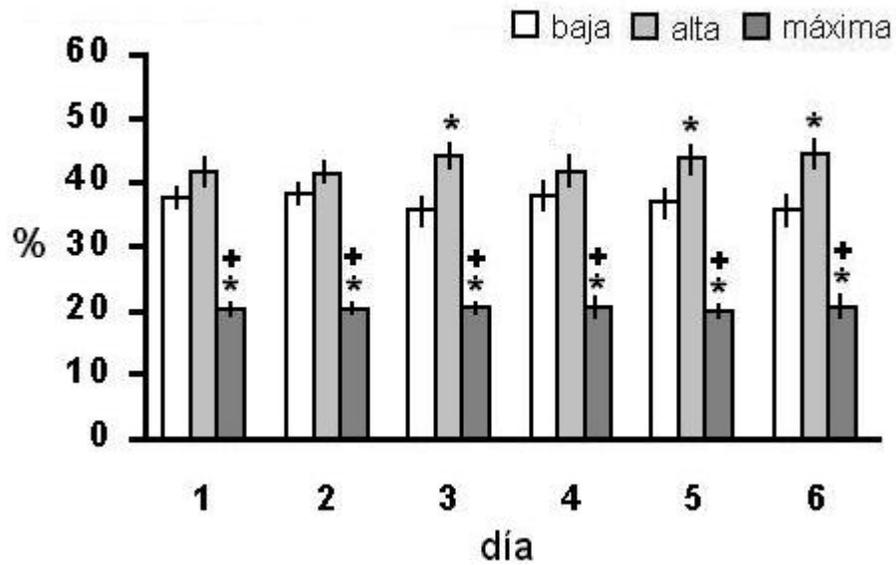


Figura R11. Potencia relativa de los animales del grupo experimental entrenados en la prueba de aprendizaje de lugar. Comparación de la PR entre las bandas de baja, alta y máxima frecuencia cada día de entrenamiento. Media \pm 2 errores estándar. *, baja frecuencia vs. alta y máxima frecuencia; +, alta frecuencia vs. máxima frecuencia. $p < 0.001$.

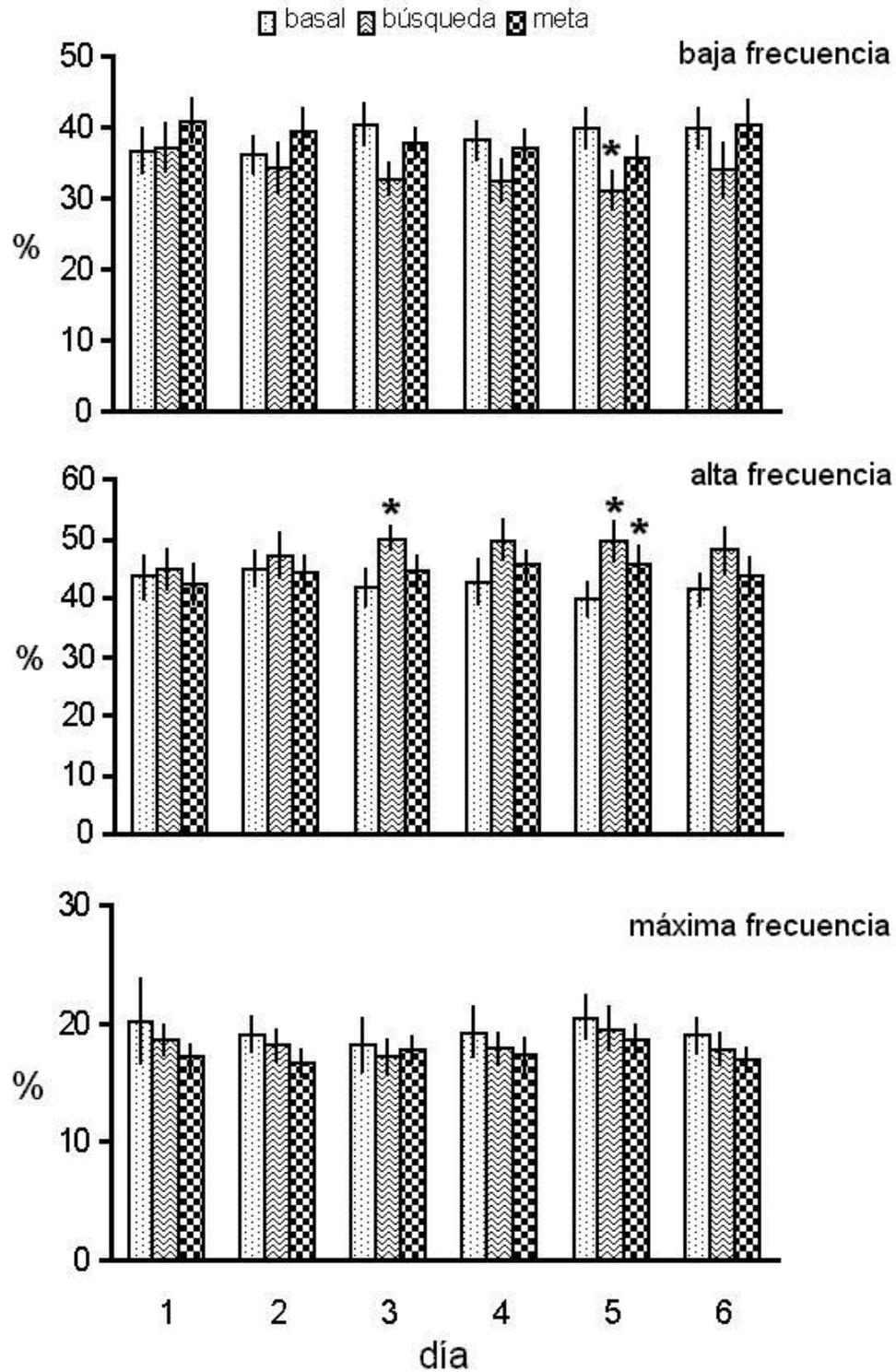


Figura R12. Potencia relativa de los animales del grupo testigo entrenados en la prueba de aprendizaje de lugar. Comparación de la potencia relativa por día, banda y etapa conductual. Media ± 2 errores estándar. *, basal vs. búsqueda. $p \leq 0.011$.

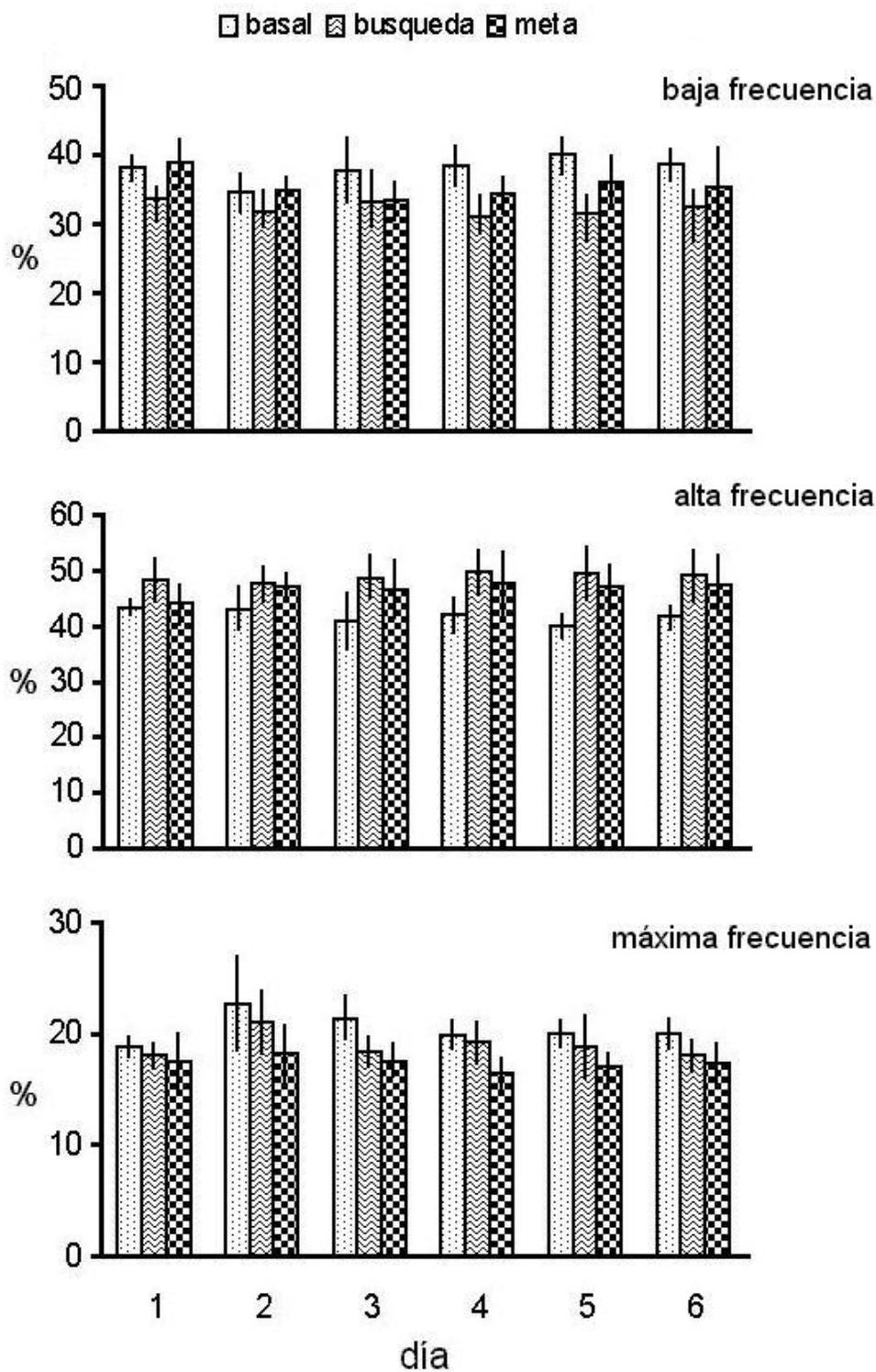


Figura R13. Potencia relativa de los animales del grupo control entrenados en la prueba de aprendizaje de lugar. Comparación de la potencia relativa por día, banda y etapa conductual. Media \pm 2 errores estándar.

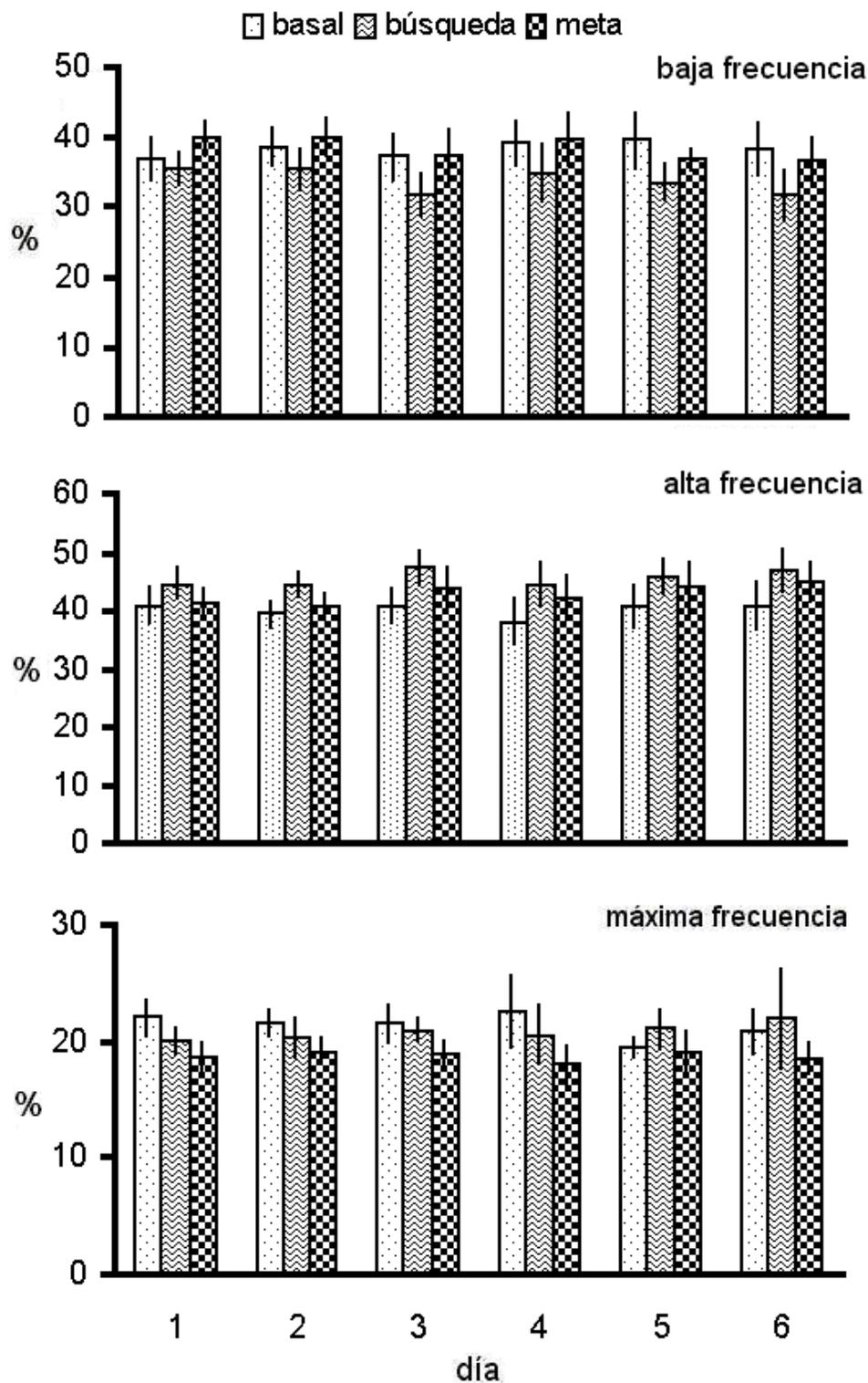


Figura R14. Potencia relativa de los animales del grupo experimental entrenados en la prueba de aprendizaje de lugar. Comparación de la potencia relativa por día, banda y etapa conductual. Media \pm 2 errores estándar.

Dado que la PR de los animales del grupo control mostró un comportamiento similar al observado para el grupo testigo en las comparaciones pareadas (Figura R13) a pesar de que el ANOVA no fue significativo, se analizaron los diferentes factores y se observó que la similitud entre los días de entrenamiento para estos datos restaba significancia al ANOVA. Por este motivo se realizó el promedio de los datos conductuales y de RP por bloques de dos días de entrenamiento (A = 1 + 2, B = 3 + 4 y C = 5 + 6) eliminando la banda de máxima frecuencia del análisis, con la finalidad de acentuar el efecto del entrenamiento sobre el parámetro de la interacción de los factores día/etapa/banda en las bandas de baja y alta frecuencia.

El ANOVA de estos datos mostró un efecto significativo de la interacción de los tres factores en el grupo testigo [$F(4,438) = 6.193, p < 0.001$] y el grupo control [$F(4,333) = 2.482, p = 0.044$], pero no para el grupo experimental [$F(4,333) = 1.384, p = 0.239$]. A partir de ello, las comparaciones pareadas mostraron que los animales del grupo testigo tuvieron una menor PR de baja frecuencia durante la búsqueda con respecto al basal, para los bloques B (días 3 + 4, $p = 0.002$), y C (días 5 + 6, $p < 0.001$), y fue menor durante la búsqueda con respecto al registro de meta para el bloque C (días 5 + 6, $p = 0.043$). En la banda de alta frecuencia se observó que la PR fue mayor durante la búsqueda con respecto a la basal los bloques B (días 3 + 4, $p < 0.001$) y C (días 5 + 6, $p < 0.001$), para el grupo testigo. Por su parte, el grupo control mostró igualmente mayor PR con respecto a la basal durante la búsqueda y además durante la meta los bloques B (3 + 4 $p = 0.002$ y $p = 0.008$, para la búsqueda y meta, respectivamente) y C (5 + 6, $p < 0.001$ y $p = 0.032$, para búsqueda y meta respectivamente), en la banda de alta frecuencia (Figura R15).

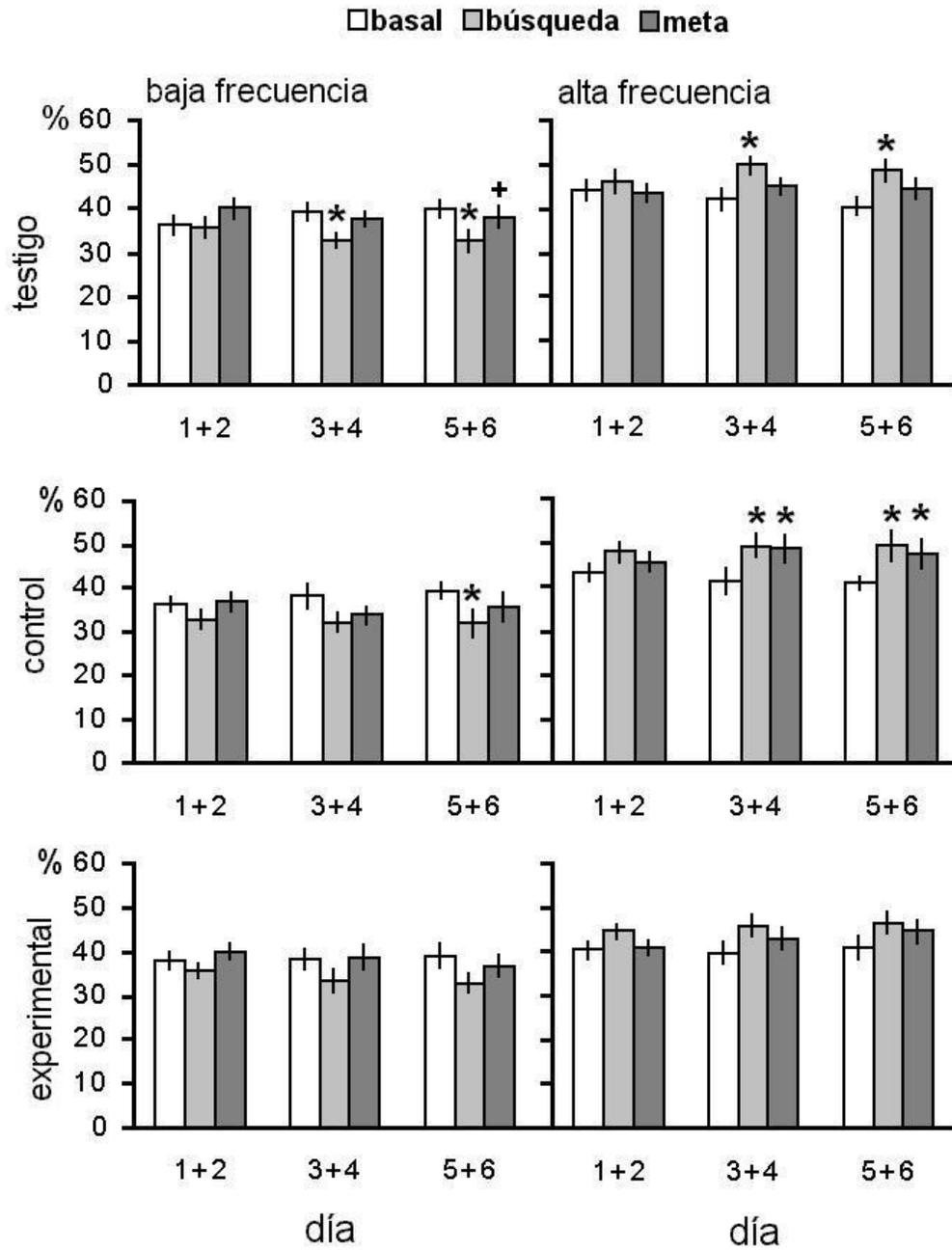


Figura R15. Comparación intragrupal de la potencia relativa acumulada por bloques de dos días de entrenamiento de las bandas de baja y alta frecuencia. Media + 2 errores estándar. *, basal vs. Búsqueda y meta; +, búsqueda vs. Meta. $p \leq 0.032$.

La separación entre la PR de las bandas en cada una de las etapas conductuales y días de entrenamiento es representada en la figura R16. Aunque el ANOVA solo arrojó resultados significativos para el grupo testigo [$F(20,636) = 2.007, p = 0.006$], las comparaciones pareadas fueron realizadas para los tres grupos y la significancia está indicada en color gris para aquellos casos en los que el ANOVA no resultó significativo. El grupo testigo mostró una separación significativa de las bandas de baja y alta frecuencia durante la etapa basal el segundo día de entrenamiento. Durante la etapa de búsqueda los tres grupos mostraron diferencias significativas entre las bandas de baja y alta frecuencia todos los días de entrenamiento aunque ello fue más evidente en el grupo testigo. Durante la etapa de meta el testigo mostró diferencias entre las bandas de baja y alta frecuencia los días 4 y 5 de pruebas mientras que el grupo control mostró diferencias entre las bandas de baja y alta frecuencia los días 2 al 6 de entrenamiento. El grupo experimental no mostró diferencias en ésta etapa entre las bandas de baja y alta frecuencia. Los tres grupos mostraron diferencias entre la bandas de baja y máxima frecuencia y entre la de alta y máxima frecuencia todos los días de estudio en las tres etapas conductuales (Figura R16).

Con la finalidad de evaluar si existía alguna relación entre ésta separación de bandas y la curva de aprendizaje de cada grupo de animales se realizó la comparación intra-grupal entre el registro basal y cada uno de los ensayos por día de entrenamiento. En esta comparación el grupo testigo mostró un efecto significativo del entrenamiento para la interacción de los factores día/banda/ensayo de manera que se produjo un incremento significativo de PR de alta frecuencia con respecto a la basal en el transcurso del entrenamiento [$F(40,1068) = 1.684, p = 0.005$]. De esta manera los registros de PR del grupo testigo mostraron un incremento significativo en la banda de alta frecuencia con respecto a la basal el tercer día de entrenamiento (ensayo 2, $p = 0.027$) mientras que el quinto día de entrenamiento se observó una disminución en la banda de baja frecuencia con respecto al registro basal durante los ensayos 3 y 4 ($p = 0.036$ y $p = 0.007$, respectivamente), y un incremento en la banda de alta frecuencia con respecto al registro basal durante el ensayo 1 ($p = 0.017$), 3 ($p = 0.004$) y 4 ($p = 0.002$). Además el sexto día de entrenamiento se observó una mayor PR en la banda de alta frecuencia durante el ensayo 2 ($p = 0.045$) (Figura R17). En éste mismo criterio de comparación los grupos control y experimental no mostraron un efecto significativo en la interacción de éstos factores [$F(40,801) = 0.859, p = 0.718$ y $F(40,801) = 0.943, p = 0.573$; respectivamente] (Figuras R18 y R19 respectivamente).

Grupo Testigo

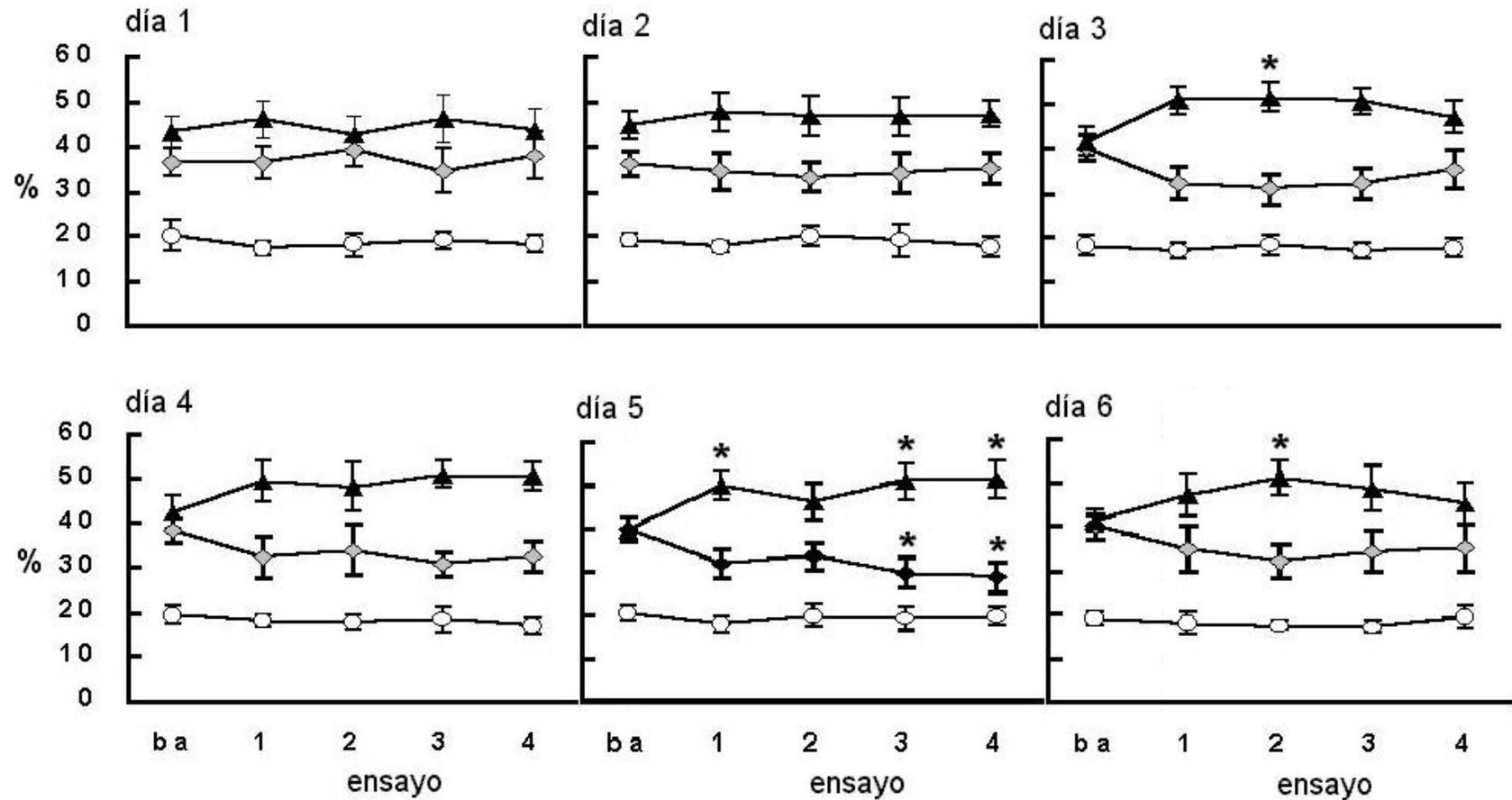


Figura R17. Comparación de la potencia relativa obtenida durante el registro basal y cada uno de los ensayos de búsqueda por día por el grupo testigo entrenado en la prueba de aprendizaje de lugar. Rombos, baja frecuencia; triángulos, alta frecuencia; círculos, máxima frecuencia. Media ± 2 errores estándar. *, basal vs. ensayos. $p \leq 0.045$.

Grupo Control

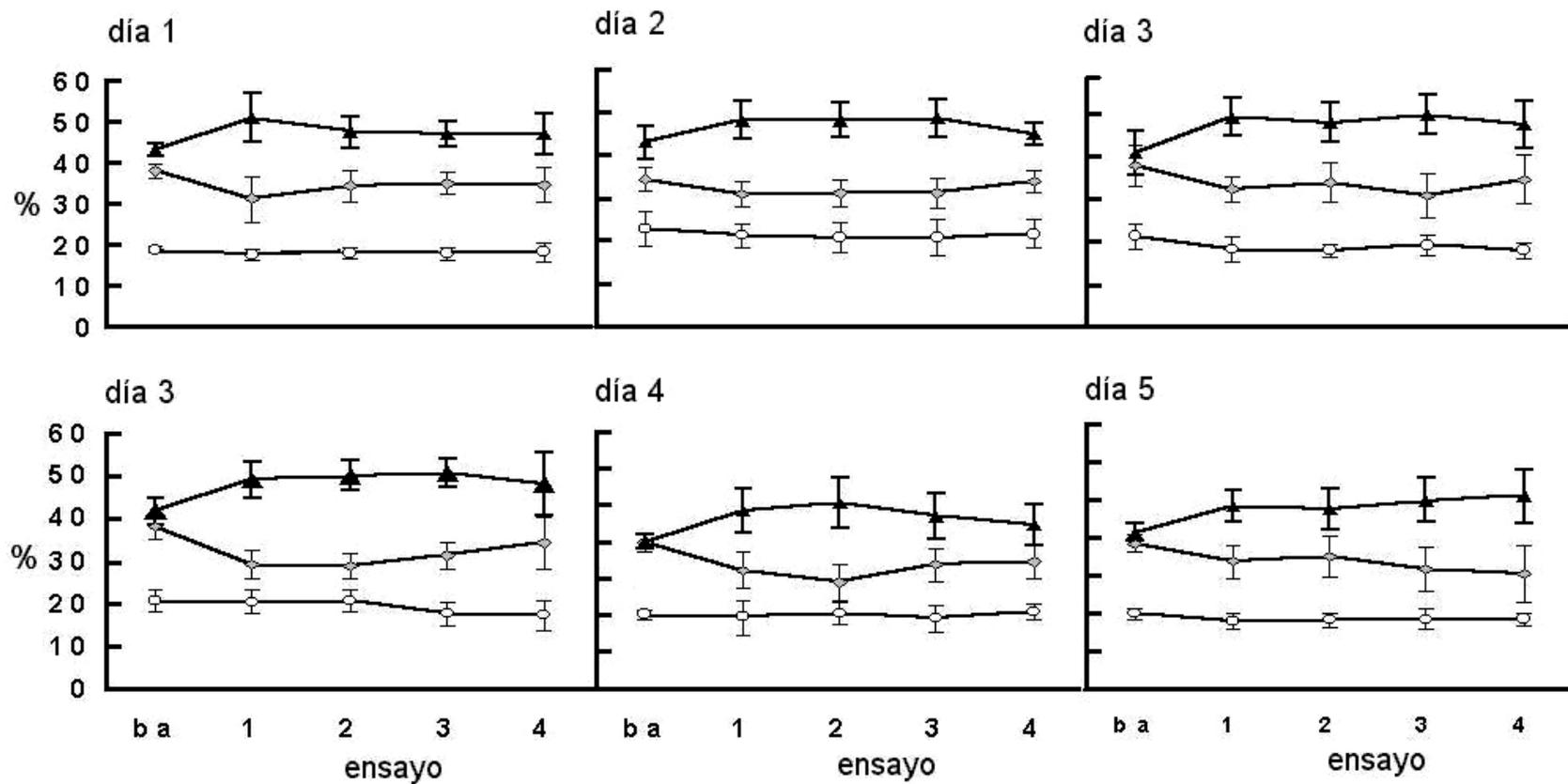


Figura R18. Comparación de la potencia relativa obtenida durante el registro basal y cada uno de los ensayos de búsqueda por día por el grupo control entrenado en la prueba de aprendizaje de lugar. Rombos, baja frecuencia; triángulos, alta frecuencia; círculos; máxima frecuencia. ANOVA no significativo. Media ± 2 errores estándar.

Grupo Experimental

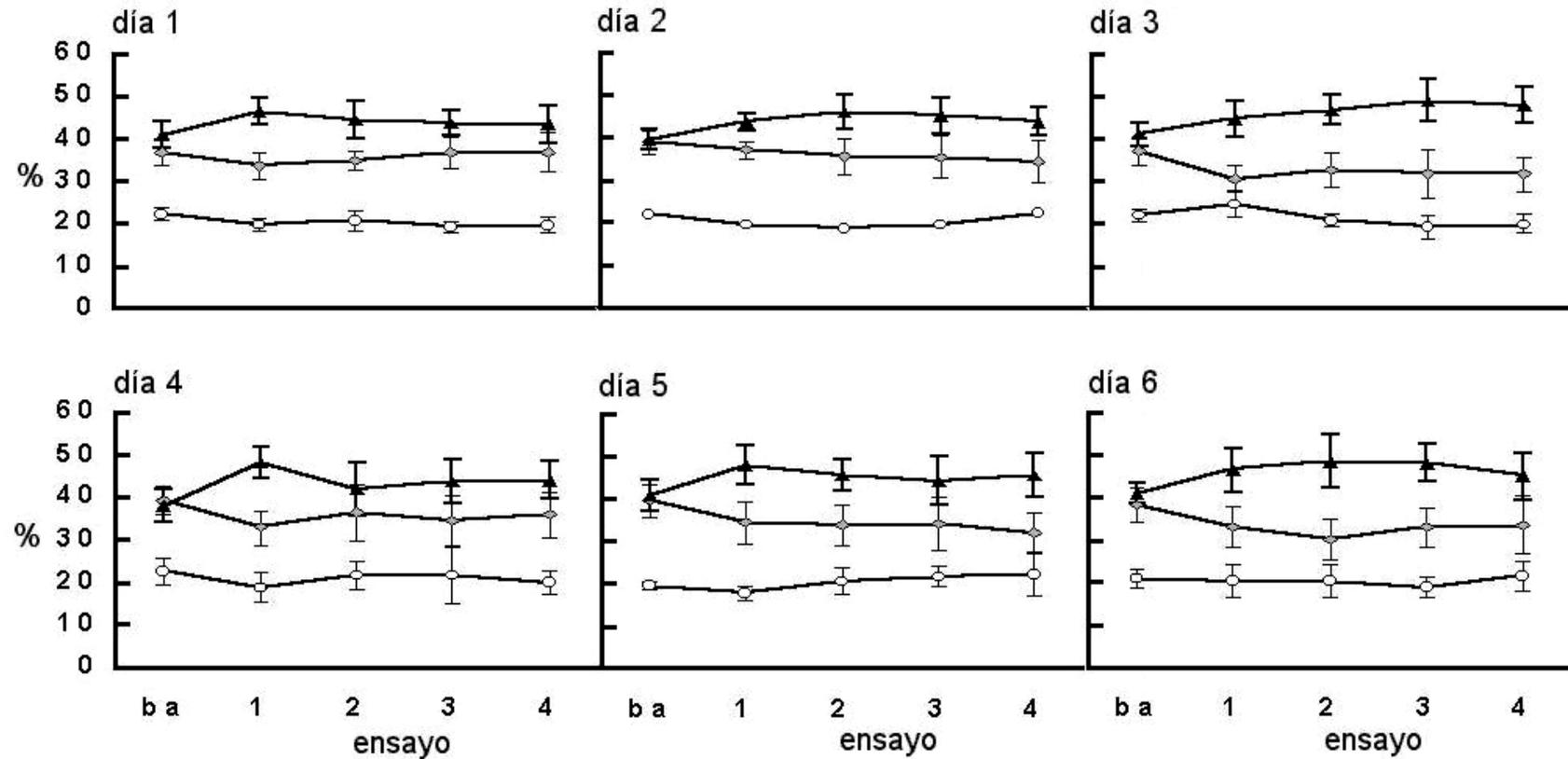


Figura R19. Comparación de la potencia relativa obtenida durante el registro basal y cada uno de los ensayos de búsqueda por día por el grupo experimental entrenado en la prueba de aprendizaje de lugar. Rombos, baja frecuencia; triángulos, alta frecuencia; círculos, máxima frecuencia. ANOVA no significativo. Media \pm 2 errores estándar.

Cuando se realizaron comparaciones intergrupales de la potencia relativa, el ANOVA de medidas repetidas mostró un efecto significativo de la interacción de los factores repetición/grupo/banda [$F(5,1450) = 3.274, p = 0.006$], de manera que las comparaciones pareadas por día, banda y grupo mostraron una diferencia significativa para la banda de baja frecuencia entre los grupos control y experimental el segundo día de entrenamiento de forma que la PR en esta banda fue menor para el grupo experimental ($p = 0.006$). En la banda de alta frecuencia se encontró que los días 2 y 4 de entrenamiento la PR fue menor para el grupo experimental con respecto al testigo ($p = 0.019$ y $p = 0.043$, respectivamente) y control ($p = 0.011$ y $p = 0.05$, respectivamente) (Figura R20). No hubo diferencias intergrupales para la banda de máxima frecuencia (datos no mostrados).

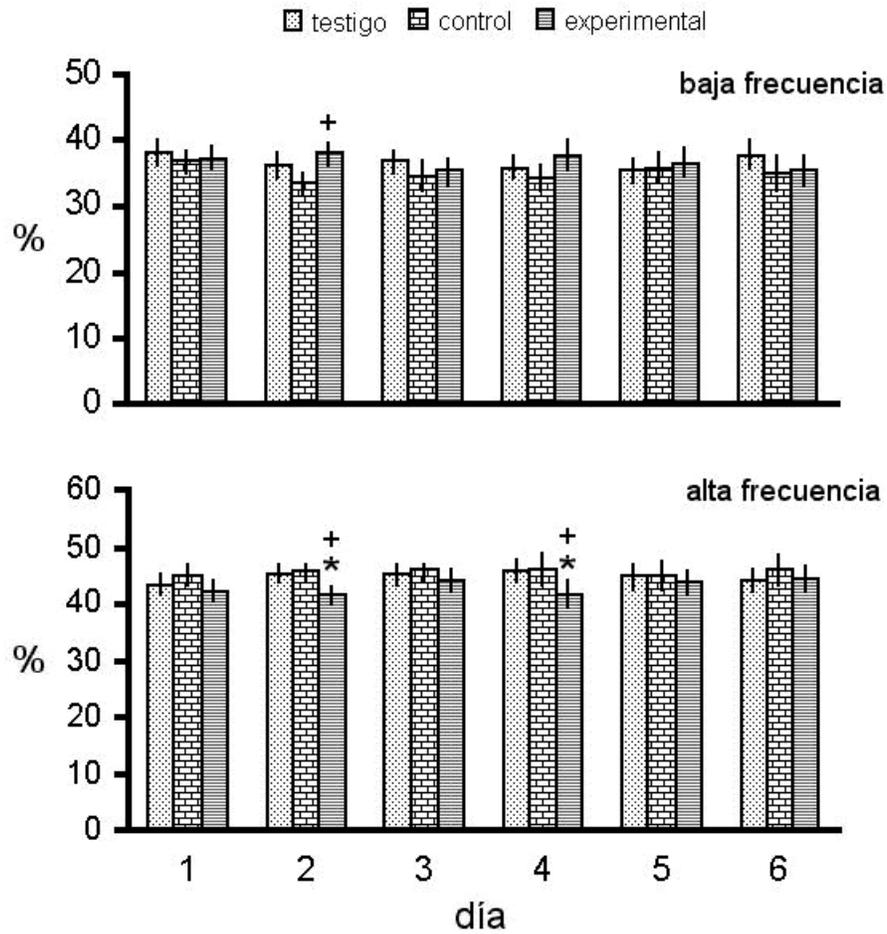


Figura R20. Comparación intergrupar de la potencia relativa obtenida por los animales entrenados en la prueba de aprendizaje de lugar por día, etapa y banda. Media \pm 2 errores estándar. *, testigo vs. experimental; +, control vs. experimental. $p \leq 0.043$.

APRENDIZAJE DE SEÑAL

1. Conducta

Las rutas de nado representativas de un animal del grupo testigo se observan en la figura R21. Los animales realizan rutas cada vez más cortas y directas al transcurso del entrenamiento y la prueba de transferencia no revela una tendencia espacial definida puesto que realizan el nado de manera uniforme por los 4 cuadrantes del laberinto.

Las comparaciones intragrupalas de la latencia de escape de los animales del grupo testigo reveló un efecto significativo del entrenamiento [$X^2_r = 18.169$, $p = 0.003$] de manera que las comparaciones pareadas mostraron una disminución significativa en la latencia de escape de estos animales en los días 3 al 6 de entrenamiento ($p = 0.021$, $p = 0.041$, $p = 0.016$ y $p = 0.004$; respectivamente) con respecto al primero. Por su parte los animales del grupo control mostraron una reducción significativa sobre su latencia de escape [$X^2_r = 25.771$, $p < 0.001$] todos los días de entrenamiento con respecto al primero ($p = 0.028$, $p = 0.004$, $p = 0.005$, $p = 0.005$ y $p = 0.022$; respectivamente). En lo que respecta al grupo experimental, la reducción de su latencia de escape [$X^2_r = 20.229$, $p = 0.001$] con respecto al primer día de entrenamiento ocurrió también todos los días subsecuentes ($p = 0.028$, $p = 0.007$, $p = 0.009$, $p = 0.007$ y $p = 0.005$; respectivamente) (Figura R22).

Las comparaciones intergrupales mostraron una diferencia significativa los días 5 ($H = 13.705$, $p = 0.001$) y 6 ($H = 6.848$, $p = 0.033$) de entrenamiento, de manera que al realizar las comparaciones pareadas se observó que el día 5 las latencias del grupo control fueron mayores con respecto a los grupos testigo y experimental ($z = -2.46$, $p = 0.014$ y $z = -3.78$, $p < 0.001$; respectivamente), mientras que el sexto día las latencias del grupo control fueron mayores con respecto al grupo experimental ($z = -2.57$, $p = 0.01$) solamente (Figura R22).

Las comparaciones intragrupalas del número de cruces por cuadrante mostraron que los tres grupos de animales buscaron igualmente en los 4 cuadrantes de la tina durante el ensayo de prueba [$F(3,40) = 0.690$, $p = 0.564$; $F(3,36) = 0.052$, $p = 0.984$; y $F(3,32) = 0.305$, $p = 0.821$, respectivamente para los grupos testigo, control y experimental]. No hubo diferencias intergrupales en éste parámetro [$F(6,108) = 0.274$, $p = 0.948$] (Figura R23).

Por su parte las comparaciones de la velocidad de nado de estos animales mostraron que no hubo cambios significativos en la velocidad de nado del grupo testigo [$F(5,50) = 2.343$, $p = 0.055$], mientras que el grupo control mostró un efecto significativo en la velocidad de nado [$F(5,45) = 6.344$, $p < 0.001$] de manera que los animales incrementaron su velocidad los días 3, 4 y 5 de entrenamiento ($p = 0.012$, $p = 0.013$ y $p = 0.008$; respectivamente), con respecto al primero. Por su parte el grupo experimental mostró en el análisis de varianza un cambio significativo de la velocidad de nado [$F(5,45) = 5.517$, $p < 0.001$] que se incrementó con respecto al primer día de prueba los días 4 y 5 ($p = 0.011$ y $p = 0.031$, respectivamente) como puede observarse en la figura R24.

No hubo diferencias intergrupales en la velocidad de nado de estos tres grupos de animales [$F(5, 145) = 1.589$, $p = 0.167$].

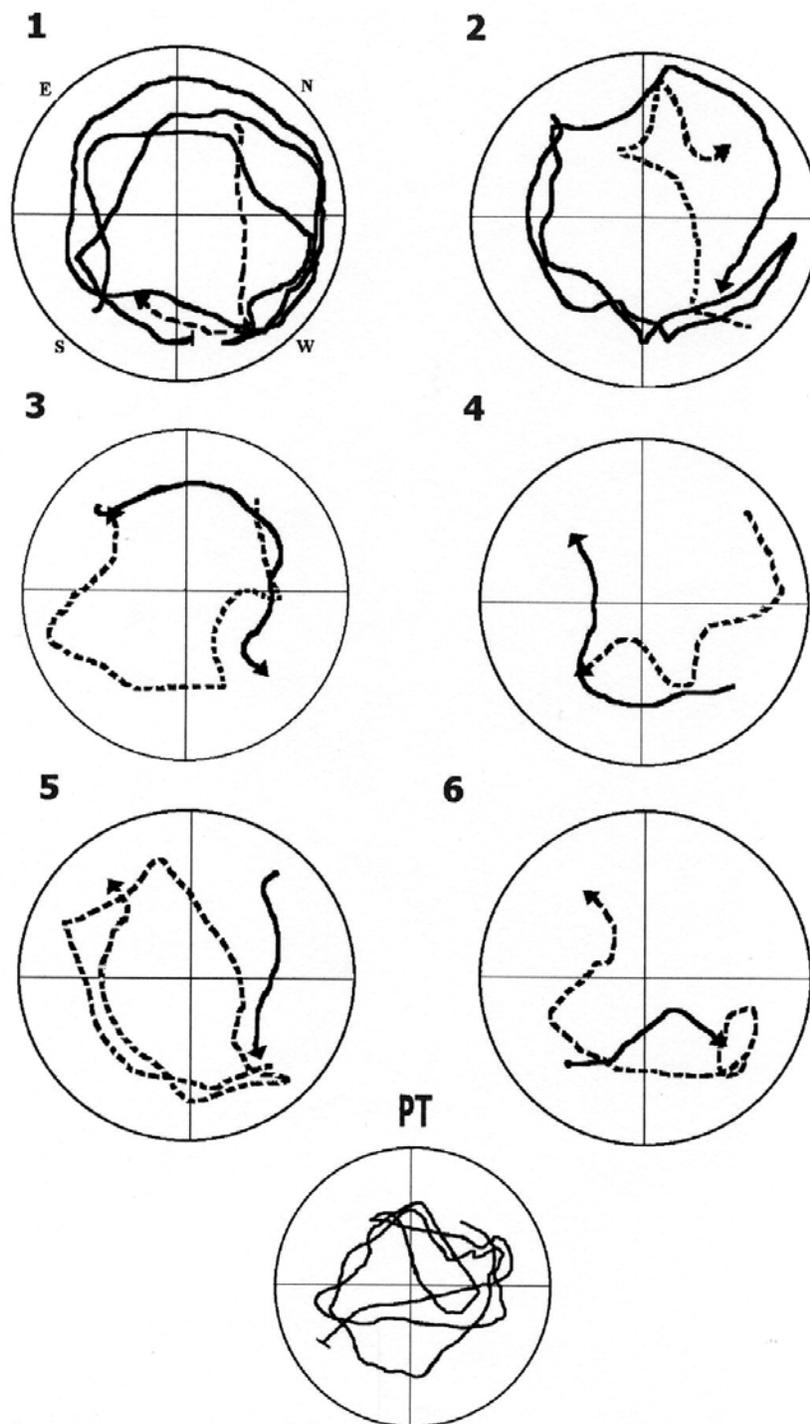


Figura R21. Rutas de nado representativas de un animal del grupo testigo entrenado en la prueba de aprendizaje de señal durante los 6 días de entrenamiento (1-6). Línea sólida, primer ensayo; línea punteada, cuarto ensayo; cabeza de flecha, posición de la plataforma; PT, prueba de transferencia.

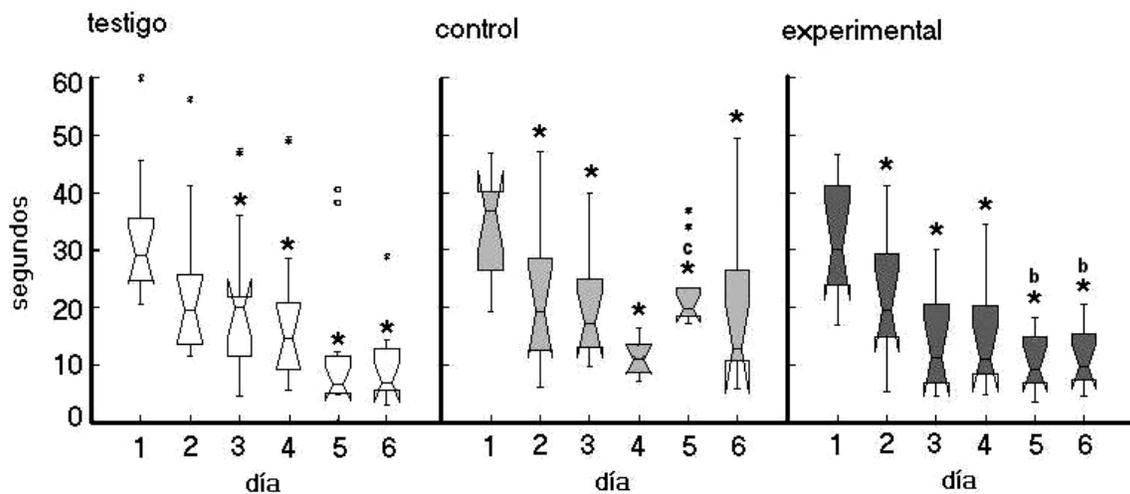


Figura R22. Latencia de escape realizadas por los animales de los grupos testigo, control y experimental, sometidos a entrenamiento de aprendizaje de señales. Mediana y error estándar de la mediana. *, primer día vs. siguientes; c, testigo vs. control; b, control vs. experimental. $p \leq 0.041$.

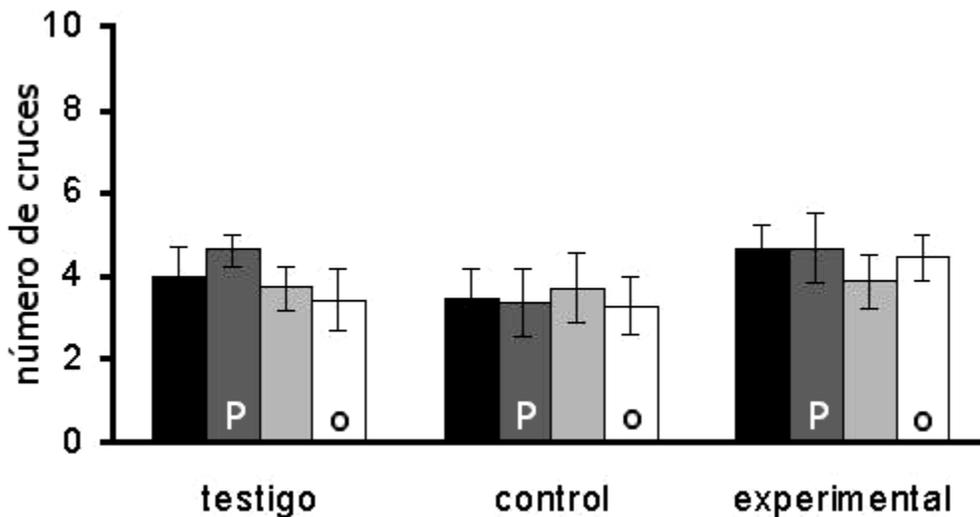


Figura R23. Número de cruces por cuadrante realizados por los animales entrenados en la prueba de aprendizaje de señal. P, cuadrante donde se hallaba localizada la plataforma; o cuadrante opuesto. Media \pm error estándar.

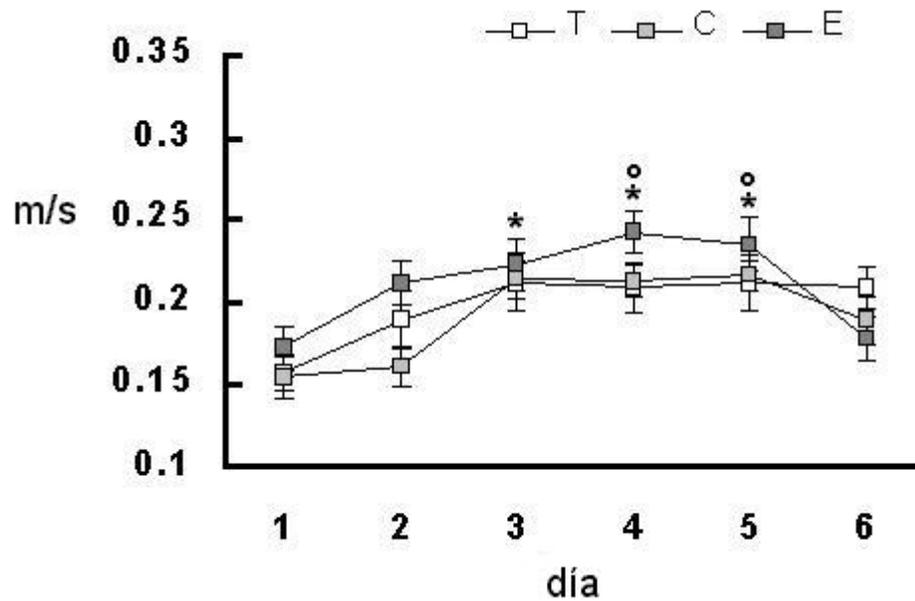


Figura R24. Velocidad de nado desarrollada por los animales de los grupos testigo (T), control (C) y experimental (E) entrenados en la prueba de aprendizaje de señal. Media \pm error estándar. *, grupo control día 1 vs. Sigüientes; 0, grupo experimental día 1 vs. sigüientes. $p \leq 0.031$.

2. Electroencefalograma (EEG)

Los registros de EEG hipocampal en el área de CA1 mostraron actividad theta durante los 6 días de entrenamiento en las tres etapas conductuales consideradas en el estudio. El registro de un animal representativo del grupo testigo se observa en la figura R25.

De igual manera que para el grupo de aprendizaje de lugar, la PR de los animales fue comparada intragrupalmente. Con respecto a la comparación de los factores etapa/banda, los resultados para los tres grupos pueden observarse en la tabla R2. El grupo testigo mostró un efecto significativo de la interacción [$F(4,530) = 6.470$, $p < 0.001$], de manera que en las comparaciones pareadas de la PR entre bandas los animales testigo mostraron una separación de bandas bien definida en

las tres etapas de estudio. Por su parte, los animales del grupo control en esta comparación mostraron un efecto significativo [$F(4, 477) = 22.332, p < 0.001$] del entrenamiento, las comparaciones pareadas revelaron que la separación de las bandas de baja y alta frecuencia no ocurrió en la etapa basal y meta. En cuanto al grupo Experimental también se observó un efecto significativo en esta interacción y las comparaciones pareadas mostraron un comportamiento semejante al grupo testigo (Tabla R2).

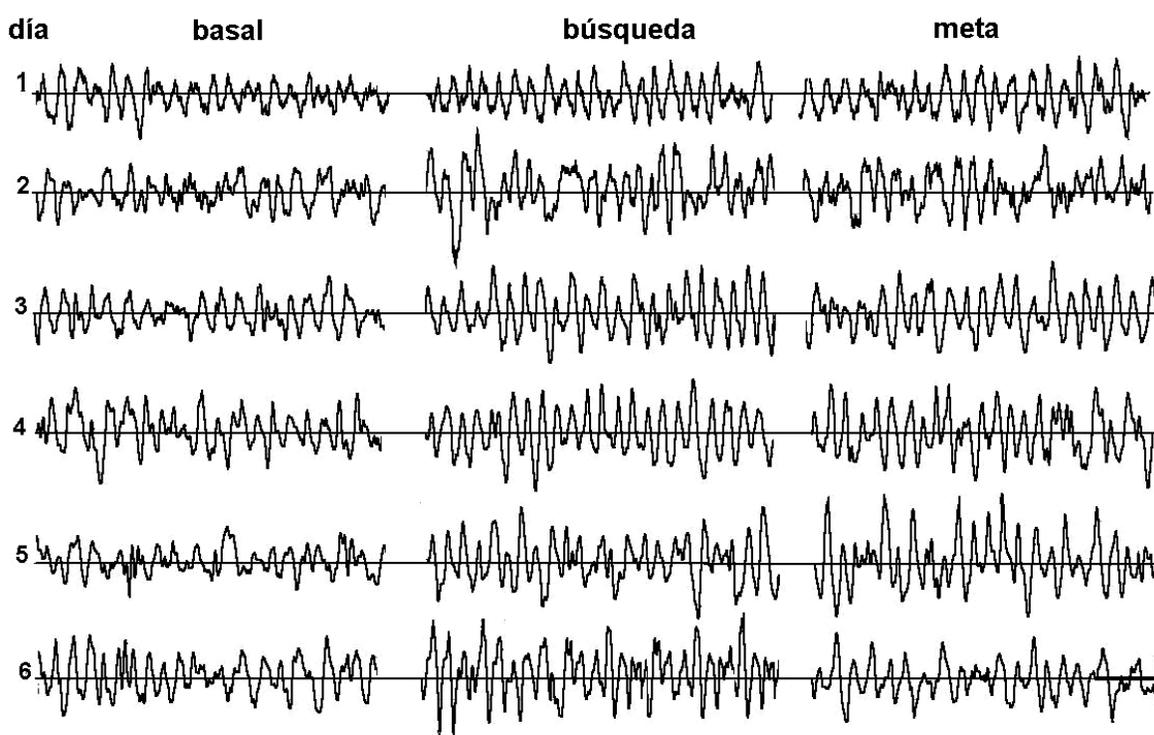


Figura R25. Registros representativos de un animal del grupo testigo entrenado en la prueba de aprendizaje de señal, durante las tres etapas de estudio y los 6 días de entrenamiento conductual. Calibración: 250 μ V, 500 ms.

Para la interacción de los factores día/banda, etapa/banda y día/etapa/banda. En las comparaciones del grupo testigo el análisis reveló que en la interacción de los factores día/banda no existió un efecto significativo del

entrenamiento [$F(10,530) = 0.583, p = 0.863$] (Figura R26), si bien las comparaciones pareadas muestran un comportamiento semejante al del grupo testigo entrenado en aprendizaje de lugar (ver figura R8). En éste mismo criterio de comparación tampoco hubo modificaciones significativas para los grupos control [$F(10,477) = 1.094, p = 0.364$] y experimental [$F(10,477) = 0.371, p = 0.959$]. Interesantemente las comparaciones pareadas de estos grupos revelaron que el grupo control no presentó una separación definida de bandas a través del entrenamiento (Figura R27) mientras que el grupo experimental fue semejante al testigo (Figura R28). Lo anterior concuerda con las diferencias intergrupales en la latencia de escape del grupo control con respecto a los grupos testigo y experimental.

TABLA R2. Potencia relativa por etapa y banda de las ratas entrenadas en la prueba de Aprendizaje de Señal.

Grupo	Etapas	Baja frecuencia	Alta frecuencia	Máxima frecuencia
Testigo	Basal	38.22 ± 0.919	42.92 ± 0.950*	18.83 ± 0.498**
	Búsqueda	35.12 ± 0.817	45.64 ± 0.792*	18.92 ± 0.469**
	Meta	39.08 ± 0.783 ^b	42.81 ± 0.747*	17.73 ± 0.367**
Control	Basal	38.86 ± 0.635	40.01 ± 0.546	21.05 ± 0.421**
	Búsqueda	35.70 ± 0.588 ^a	44.79 ± 0.651* ^a	19.53 ± 0.331**
	Meta	40.48 ± 0.608 ^b	40.54 ± 0.695 ^b	18.6 ± 0.298** ^a
Experimental	Basal	37.61 ± 0.450	41.81 ± 0.518*	20.27 ± 0.271**
	Búsqueda	30.96 ± 0.733 ^a	49.20 ± 0.787* ^a	19.91 ± 0.379**
	Meta	35.37 ± 0.529 ^b	46.53 ± 0.664* ^{ab}	17.98 ± 0.333**

Media ± error estándar. *, Baja vs. alta, máxima frecuencia; +, alta vs. máxima frecuencia; a, basal vs. búsqueda, meta; b, búsqueda vs. meta. $P < 0.05$.

Grupo Testigo

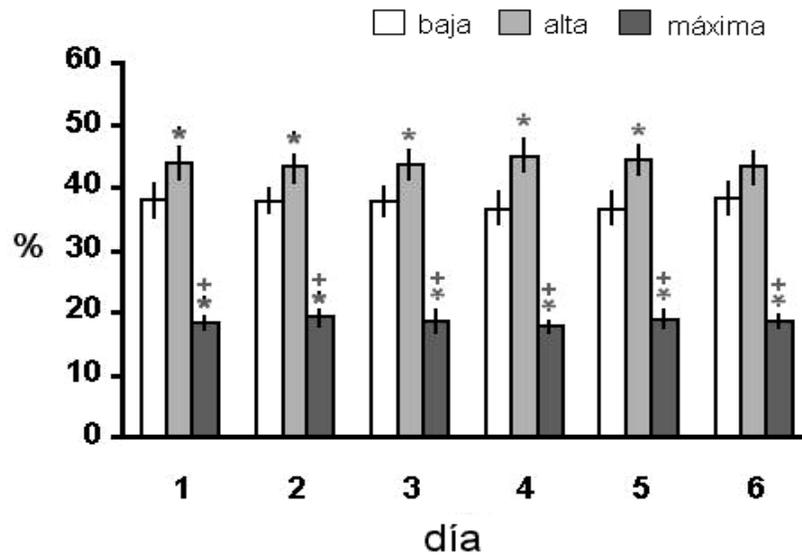


Figura R26. RP de los animales testigo entrenados en la prueba de aprendizaje de señal. Aunque el ANOVA no fue significativo las comparaciones pareadas muestran resultados semejantes a los del grupo testigo entrenado en la prueba de aprendizaje de lugar. Media \pm 2 errores estándar. *, baja vs. alta y máxima frecuencia; +, alta vs. máxima frecuencia.

Grupo Control

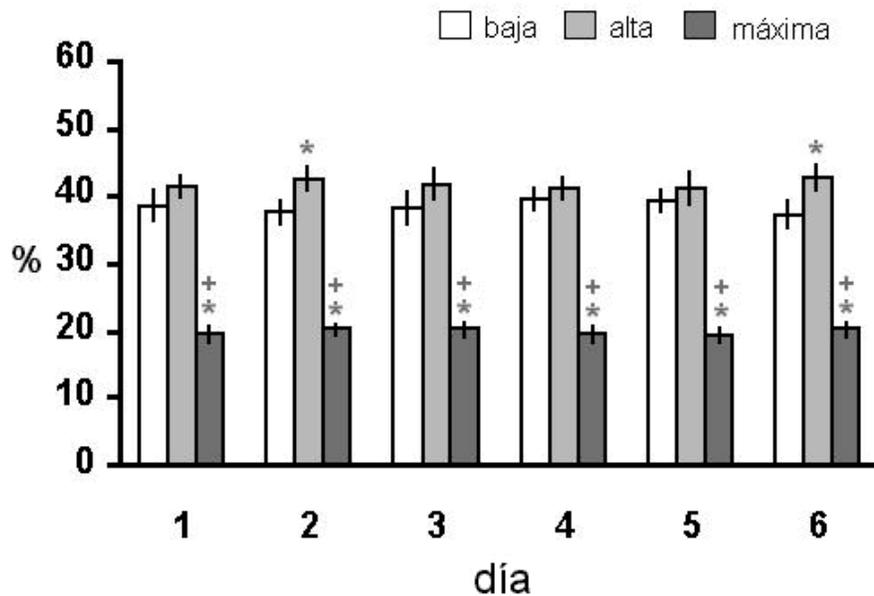


Figura R27. RP de los animales control entrenados en la prueba de aprendizaje de señal. ANOVA no significativo. Note que no hay separación definida entre las bandas de baja y alta frecuencia. Media \pm 2 errores estándar. *, baja vs. alta y máxima frecuencia; +, alta vs. máxima frecuencia.

Grupo Experimental

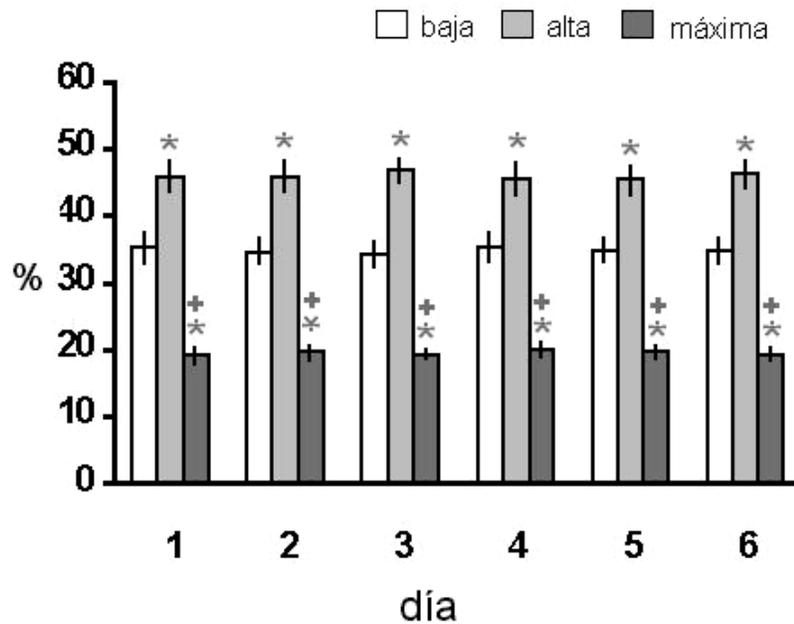


Figura R28. RP de los animales experimentales entrenados en la prueba de aprendizaje de señal. Aunque el ANOVA no fue significativo las comparaciones pareadas muestran resultados semejantes a los del grupo testigo entrenado en la prueba de aprendizaje de lugar. Media \pm 2 errores estándar. *, baja vs. alta y máxima frecuencia; +, alta vs. máxima frecuencia.

En la comparación de la interacción de los factores día/etapa/banda, ninguno de los tres grupos mostró un efecto significativo del entrenamiento [$F(4, 530) = 0.801$, $p = 0.713$; $F(4, 477) = 0.526$, $p = 0.956$; $F(4, 477) = 1.054$, $p = 0.397$; para el grupo testigo, control y experimental, respectivamente], lo que puede observarse en las figuras R29, R30 y R31.

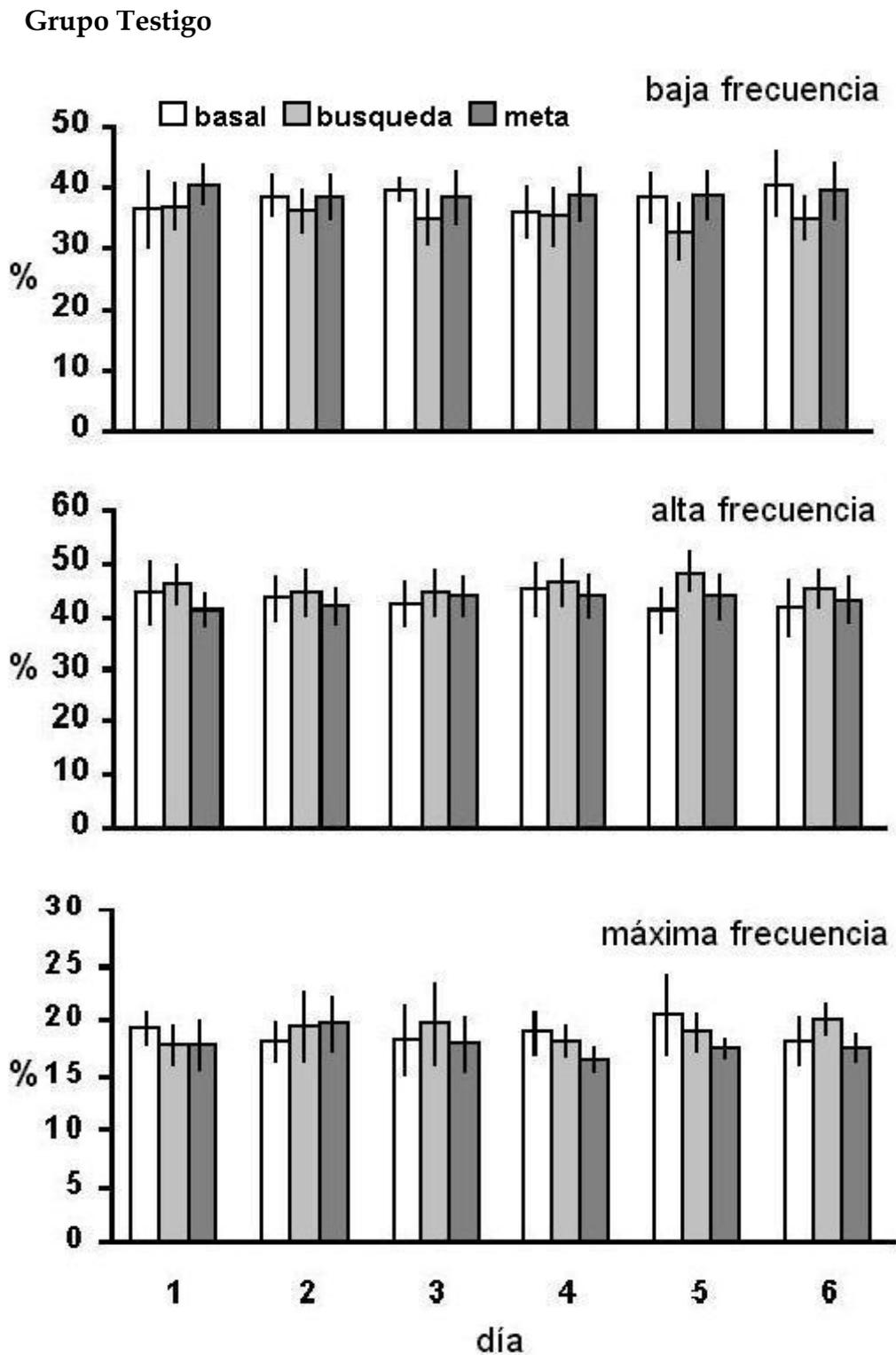


Figura R29. Potencia relativa de los animales del grupo testigo entrenados en la prueba de aprendizaje de señal. Comparación de la potencia relativa por día, banda y etapa conductual. Media \pm 2 errores estándar.

Grupo Control

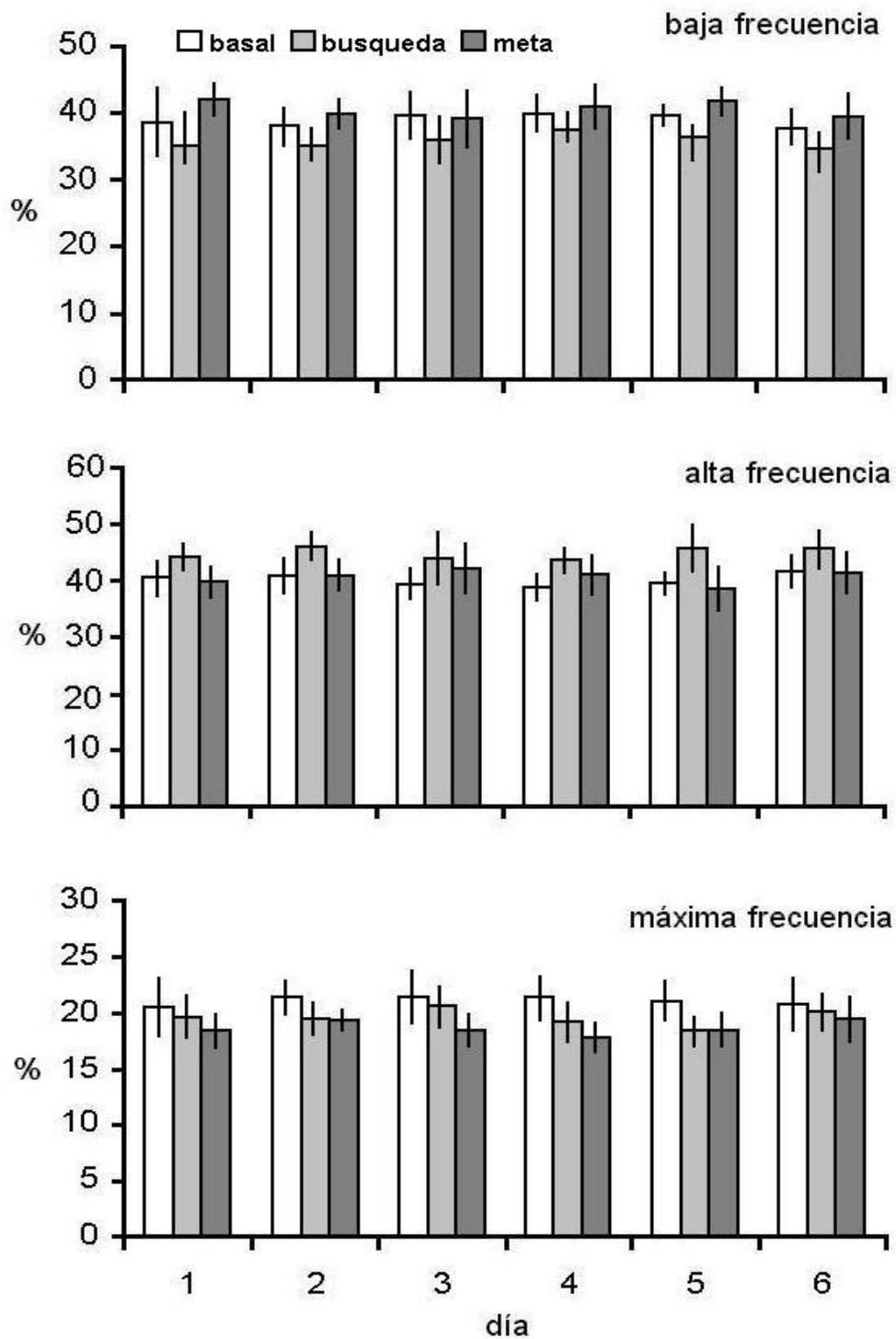


Figura R30. Potencia relativa de los animales del grupo control entrenados en la prueba de aprendizaje de señal. Comparación de la potencia relativa por día, banda y etapa conductual. Media \pm 2 errores estándar.

Grupo Experimental

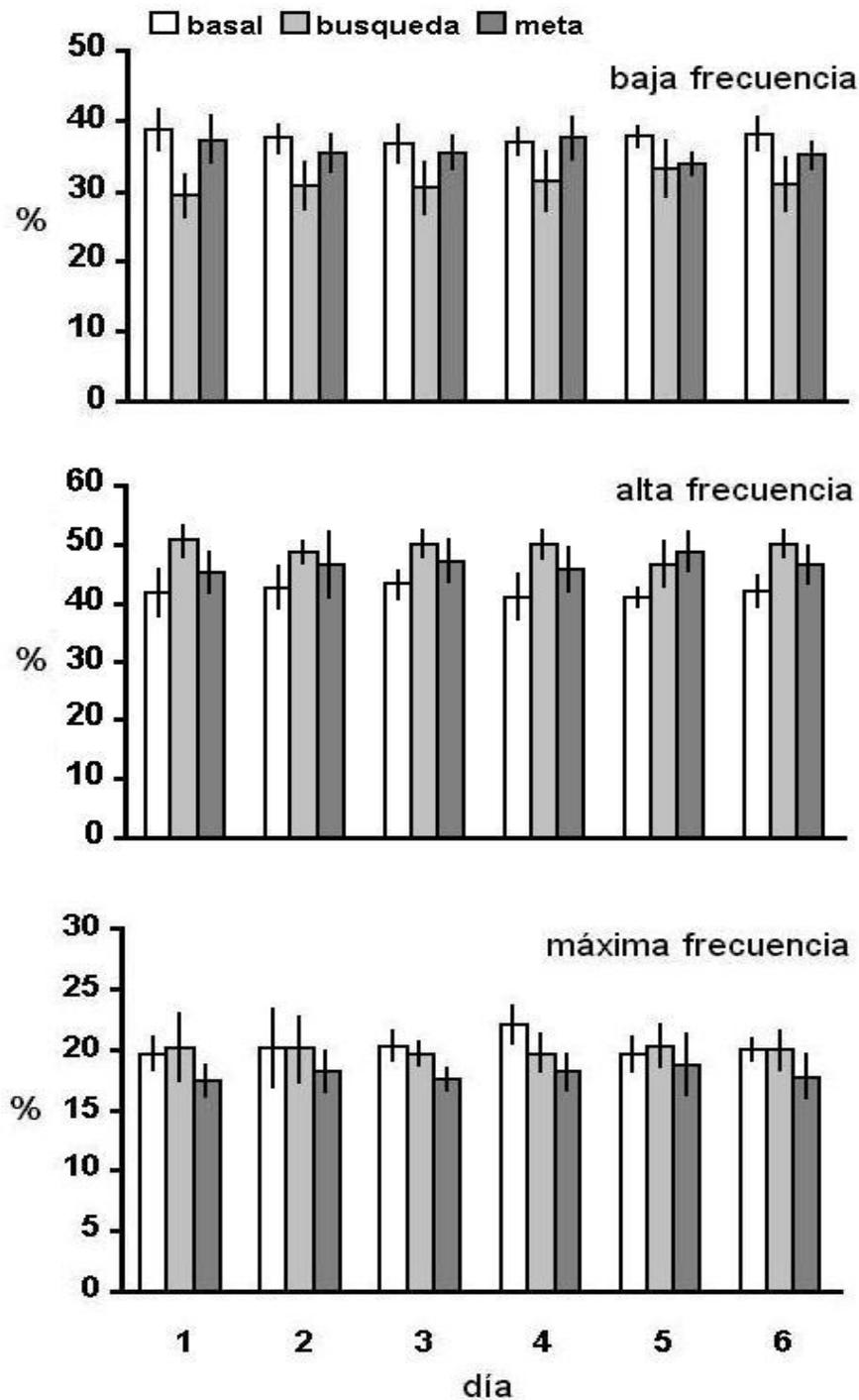


Figura R31. Potencia relativa de los animales del grupo experimental entrenados en la prueba de aprendizaje de señal. Comparación de la potencia relativa por día, banda y etapa conductual. Media ± 2 errores estándar.

En las comparaciones intragrupalas de los puntajes por día y etapa entre bandas, los tres grupos sometidos a la prueba de aprendizaje de señal, no presentaron efectos significativos en ninguno de los tres grupos en ninguna interacción y la separación entre las bandas de baja y alta frecuencia fue mínima en los tres grupos a diferencia de los animales de los grupos entrenados en la prueba de aprendizaje de lugar (Figura R32). De igual manera las comparaciones entre el basal y cada ensayo en cada día de entrenamiento no mostraron efectos significativos para ninguna de las interacciones (Figuras R33, R34, y R35).

Las comparaciones intergrupales de la PR para los animales entrenados en la prueba de aprendizaje de señal arrojaron resultados significativos para la interacción repetición/grupo/banda [$F(6,1638) = 7.540, p < 0.001$], de manera que las comparaciones pareadas mostraron diferencias en la banda de baja frecuencia entre los grupos control y experimental los días 4 y 5 de entrenamiento ($p = 0.025$ y $p = 0.031$, respectivamente) de manera que la PR fue menor para el grupo experimental; mientras que para la banda de alta frecuencia hubo diferencias significativas entre los grupos control y experimental los días 3, 4 y 5 de entrenamiento, de manera que la PR fue mayor para el grupo experimental ($p = 0.018, p = 0.030$ y $p = 0.009$, respectivamente) (Figura R 36). No hubo diferencias intergrupales en la banda de máxima frecuencia (Datos no mostrados).

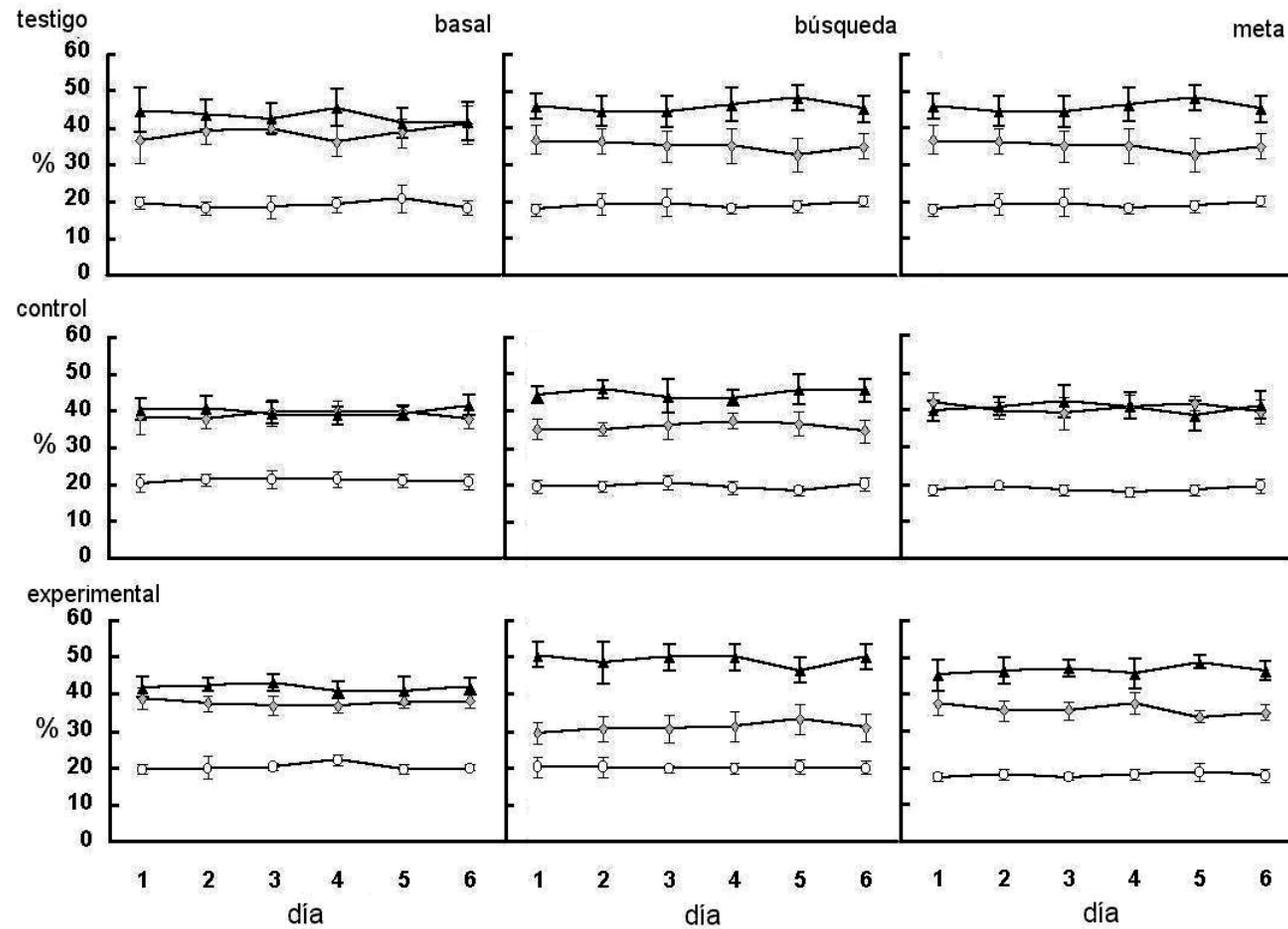


Figura R32. Comparación de la potencia relativa de los animales entrenados en la prueba de aprendizaje de señal por día y por banda para cada etapa conductual. Rombo, baja frecuencia; triángulos, alta frecuencia; círculos, Máxima frecuencia. Media + 2 errores estándar.

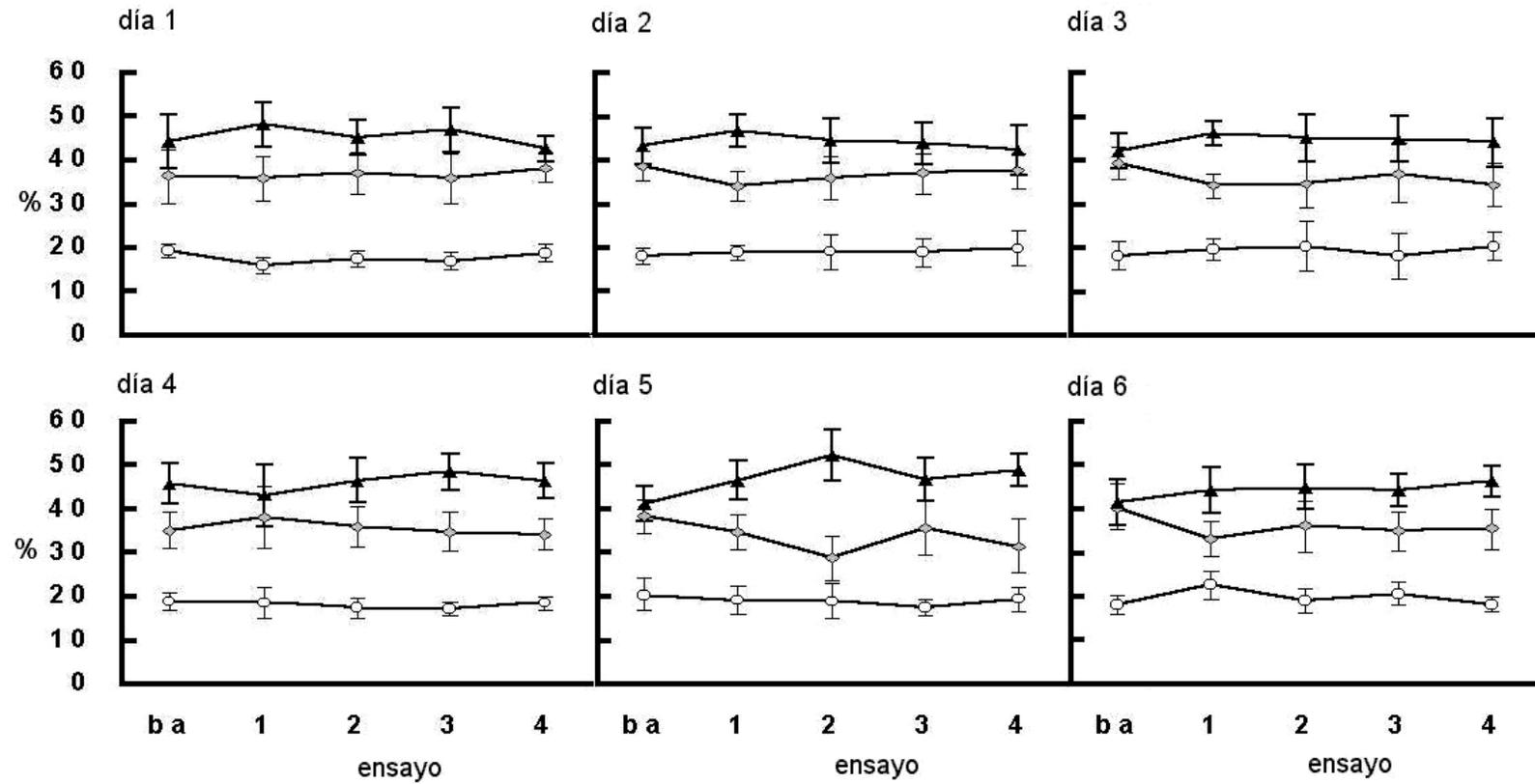


Figura R33. Comparación de la potencia relativa obtenida durante el registro basal y cada uno de los ensayos de búsqueda por día por el grupo testigo entrenado en la prueba de aprendizaje de señal. Rombos, baja frecuencia; triángulos, alta frecuencia; círculos, máxima frecuencia. Media \pm 2 errores estándar.

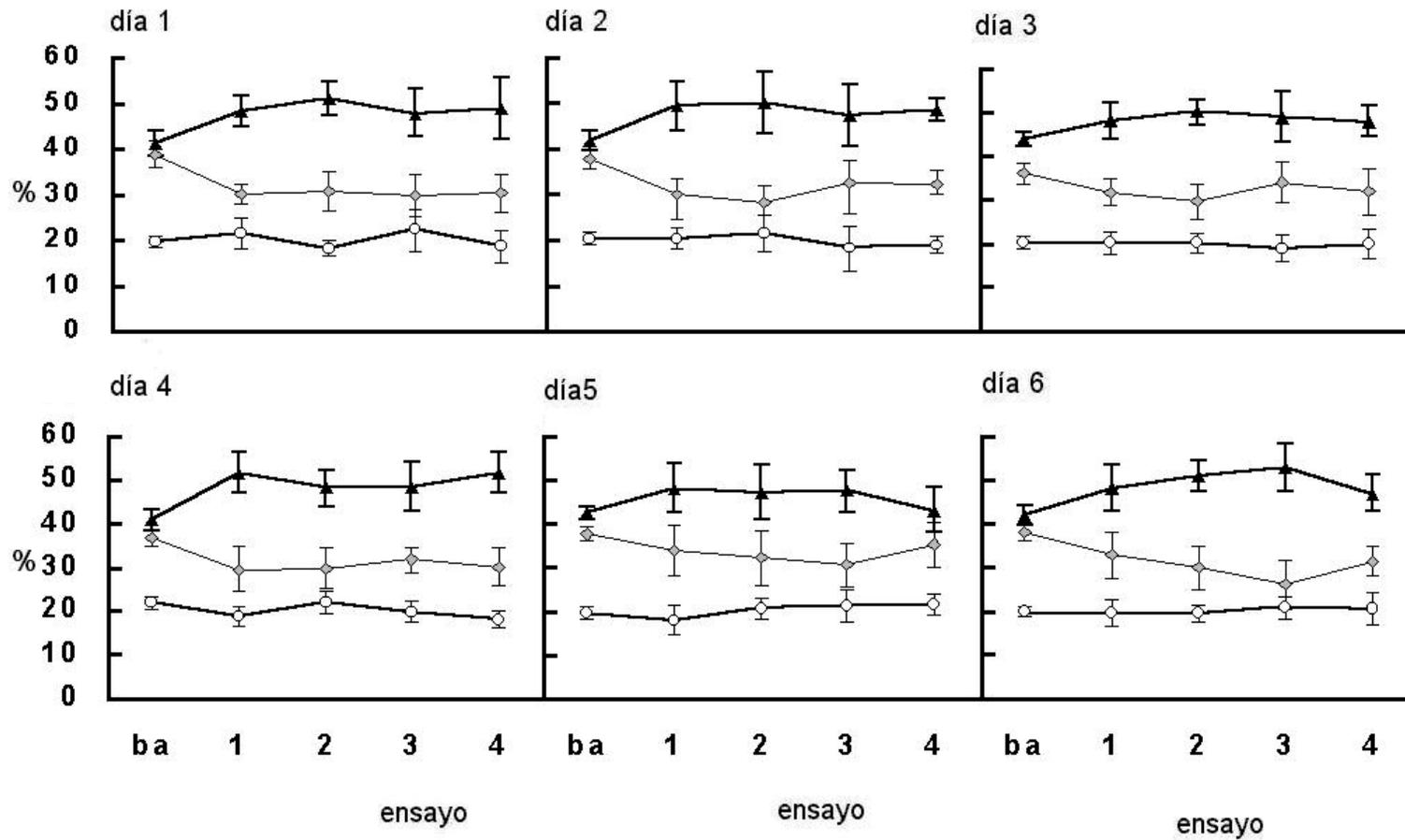


Figura R34. Comparación de la potencia relativa obtenida durante el registro basal y cada uno de los ensayos de búsqueda por día por el grupo control entrenado en la prueba de aprendizaje de señal. Rombos, baja frecuencia; triángulos, alta frecuencia; círculos, máxima frecuencia. Media \pm 2 errores estándar.

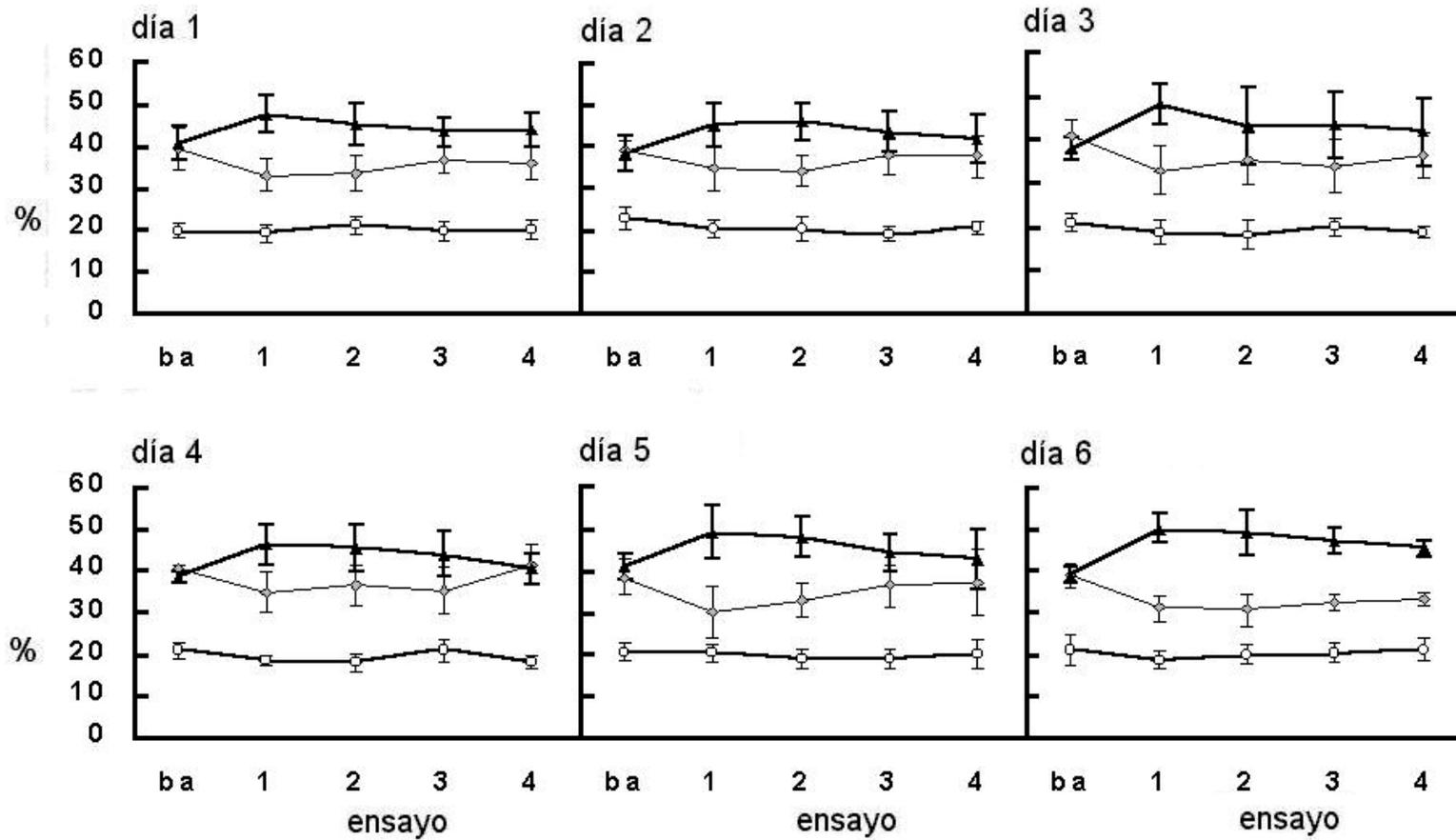


Figura R35. Comparación de la potencia relativa obtenida durante el registro basal y cada uno de los ensayos de búsqueda por día por el grupo experimental entrenado en la prueba de aprendizaje de señal. Rombos, baja frecuencia; triángulos, alta frecuencia; círculos, máxima frecuencia. Media \pm 2 errores estándar.

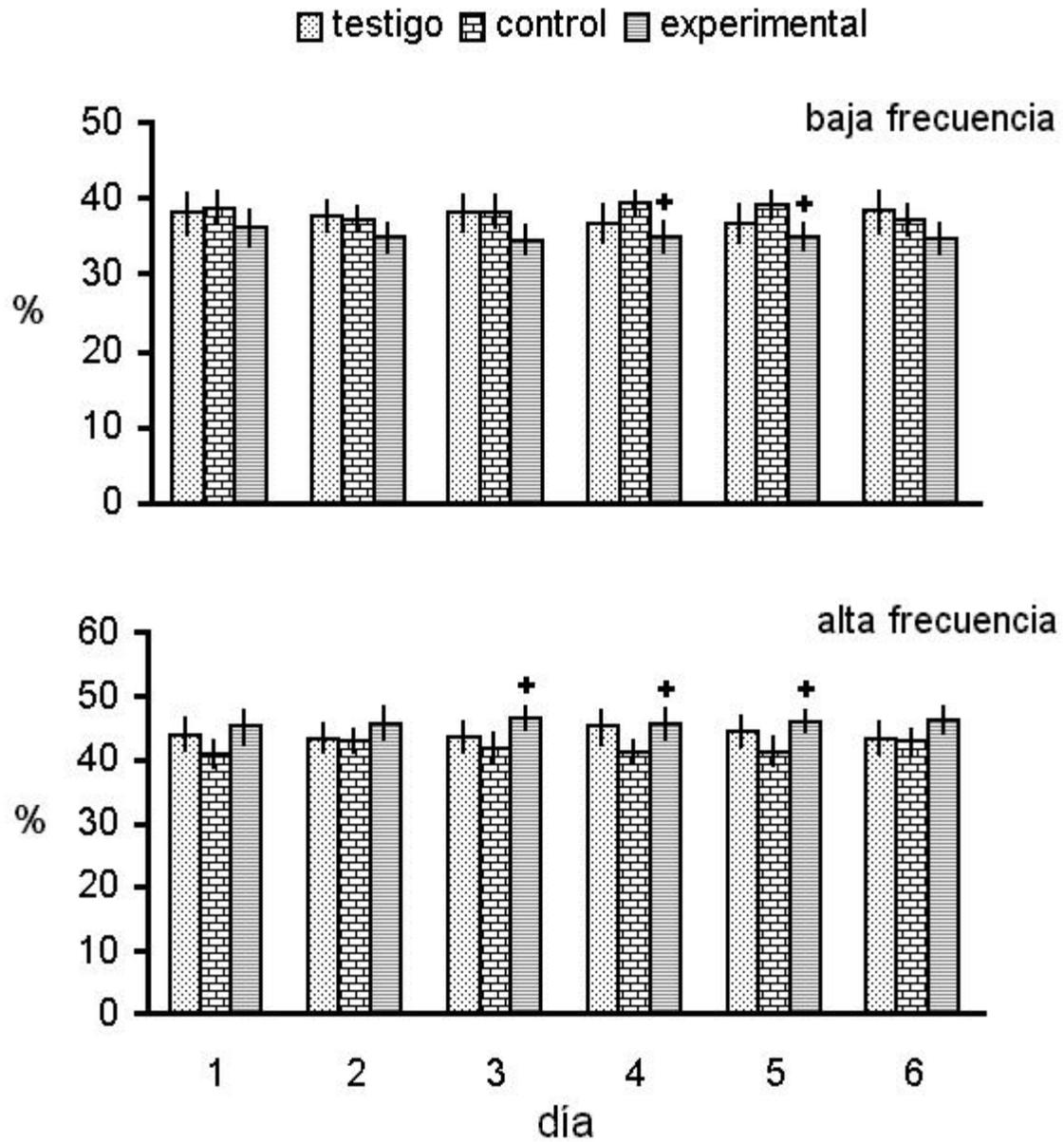


Figura R36. Comparación intergrupala de la potencia relativa obtenida por los animales entrenados en la prueba de aprendizaje de señal por día de entrenamiento. Media \pm 2 errores estándar. +, control vs. experimental. $p \leq 0.031$.

APRENDIZAJE EGOCÉNTRICO

1. Conducta

Las rutas representativas de un animal del grupo testigo entrenado en la prueba de aprendizaje egocéntrico se presentan en la figura R37. La estrategia egocéntrica de localización de la plataforma puede apreciarse en la similitud entre las rutas correctas de la rata con el transcurso del entrenamiento. Igualmente en la prueba de transferencia la búsqueda del animal no se concentró de manera diferencial en ninguno de los cuadrantes de la tina (Figura R37).

Con respecto a la latencia de escape, los animales del grupo testigo ($n = 13$) redujeron su latencia de escape de manera significativa ($X^2_r = 26.231$, $p < 0.001$), desde el segundo y hasta el sexto día de entrenamiento, con respecto al primero ($p = 0.034$, $p = 0.034$, $p = 0.003$, $p = 0.002$ y $p = 0.001$, respectivamente). Por su parte los animales del grupo control ($n = 9$) mostraron una reducción significativa de la latencia de escape ($X^2_r = 16.032$, $p = 0.007$), de modo que fue menor los días 3 al 6 con respecto al primero ($p = 0.021$, $p = 0.021$, $p = 0.025$ y $p = 0.008$, respectivamente). Los animales del grupo experimental ($n = 10$), a diferencia de los dos anteriores, no redujeron significativamente su latencia de escape ($X^2_r = 8.386$, $p = 0.136$) en ningún día de entrenamiento con respecto al primero (Figura R38).

Las comparaciones intergrupales mostraron diferencias significativas entre grupos el sexto día de entrenamiento ($H = 11.136$, $p = 0.004$), de manera que en la latencia de escape del sexto día fue mayor para el grupo experimental con respecto al grupo testigo ($z = -3.164$, $p = 0.001$), y, con respecto al grupo control ($z = -2.451$, $p = 0.014$) (Figura R38).

Por último, las comparaciones intra-grupales del número de cruces por cuadrante no mostraron diferencias significativas para el grupo Testigo [$F(3,44) = 0.992, p = 0.405$] ni para el grupo control [$F(3,28) = 1.944, p = 0.145$], pero si para el grupo experimental [$F(3,28) = 3.116, p = 0.042$]. Para éste último grupo las comparaciones pareadas mostraron que estos animales tuvieron mayor número de cruces en el cuadrante donde la plataforma se hallaba localizada con respecto al cuadrante opuesto a su posición ($p = 0.047$) (Figura R 39). Las comparaciones intergrupales no mostraron diferencias significativas en éste rubro (Figura R39).

En cuanto a la velocidad de nado, los animales del grupo testigo no mostraron un efecto significativo del entrenamiento [$F(5,61) = 0.067, p = 0.997$], mientras que los animales del grupo control mostraron un efecto del entrenamiento [$F(5,40) = 2.539, p = 0.044$]. Sin embargo las comparaciones pareadas no mostraron diferencias significativas entre ninguno de los días de entrenamiento con respecto al primero (Figura R40). Los animales del grupo experimental mostraron un efecto del entrenamiento en su velocidad de nado [$F(5,45) = 3.584, p = 0.008$] aunque al igual que los del grupo control, no mostraron cambios significativos con respecto al primer día de entrenamiento.

Las comparaciones intergrupales de velocidad de nado no arrojaron diferencias significativas [$F(5,150) = 1.151, p = 0.336$] (Figura R40).

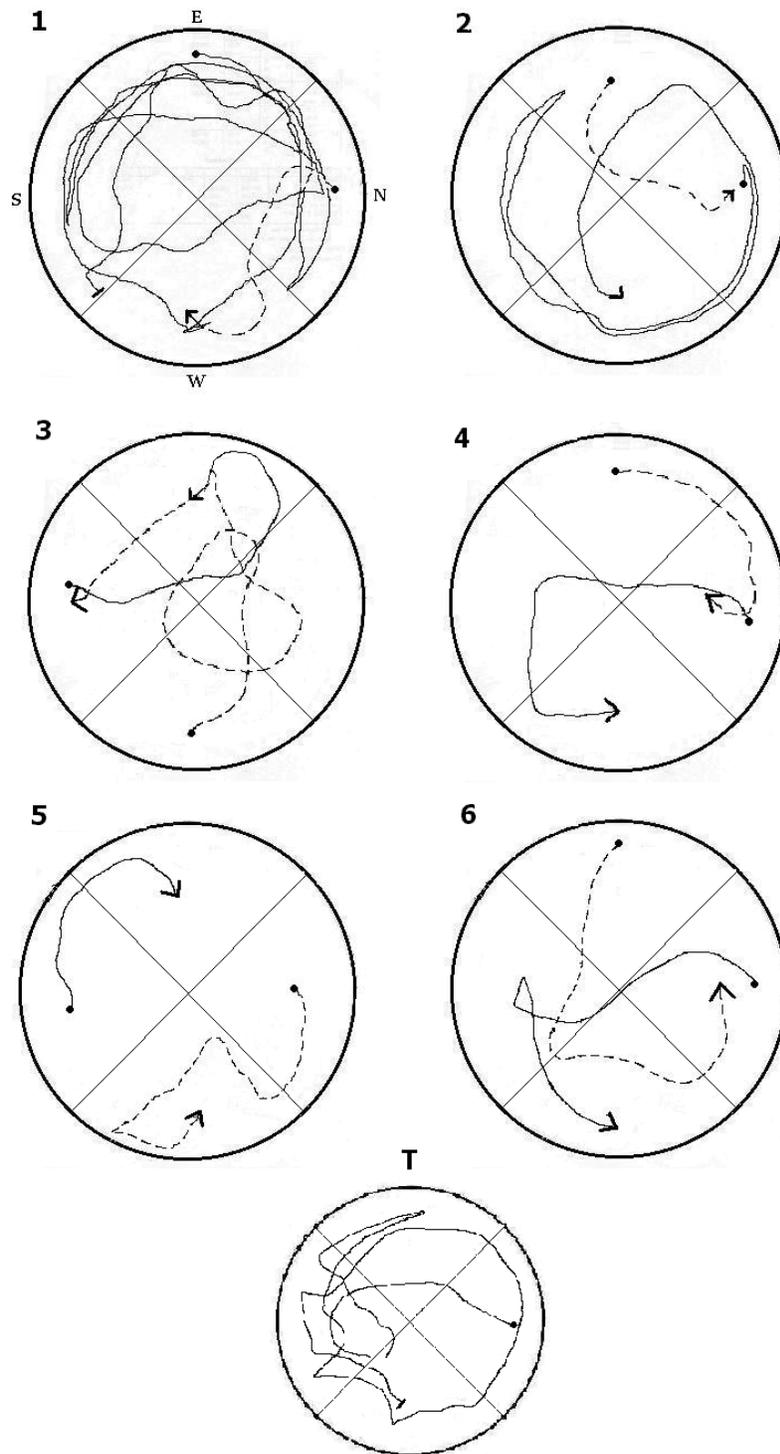
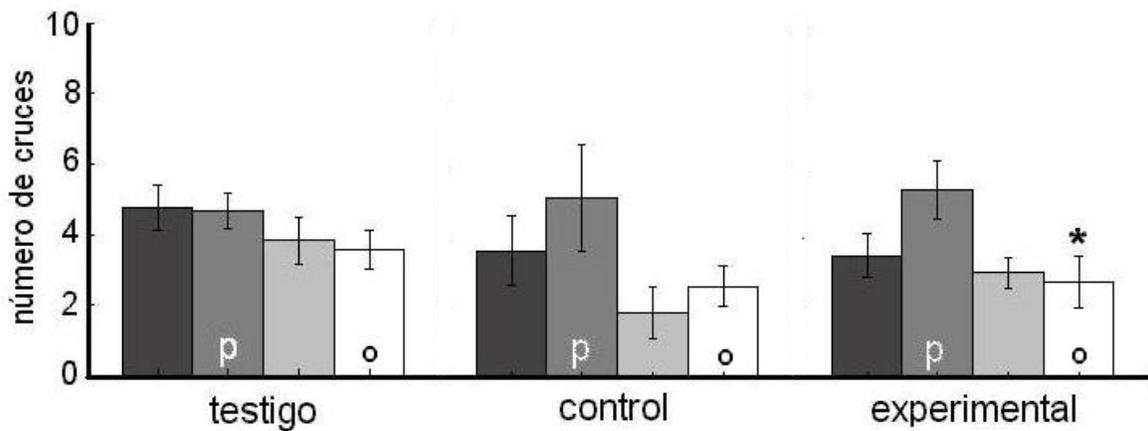
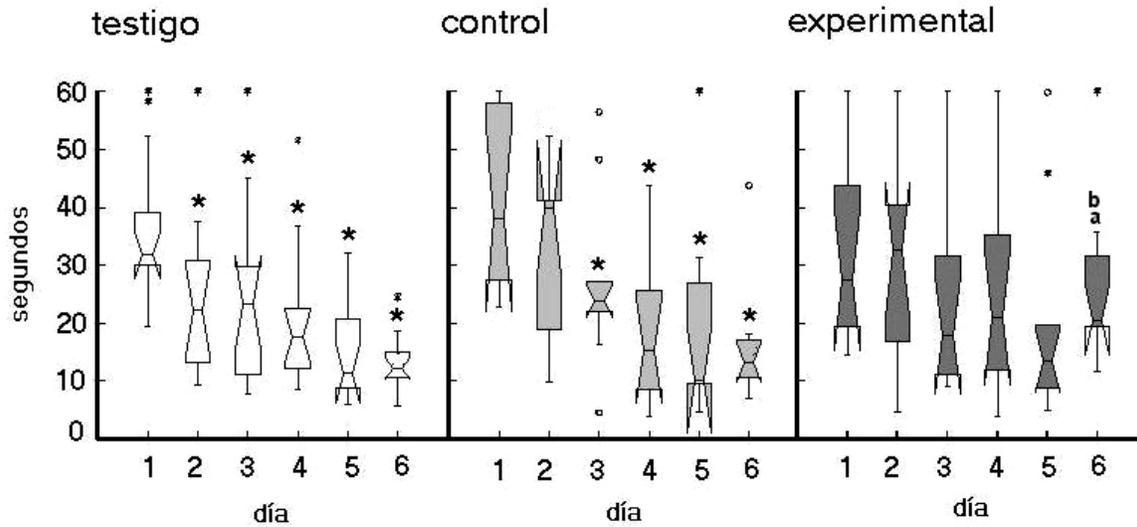


Figura R37. Rutas de nado representativas de un animal del grupo testigo entrenado en la prueba de aprendizaje egocéntrico durante los 6 días de entrenamiento (1-6). Línea sólida, primer ensayo; línea punteada, cuarto ensayo; T, prueba de transferencia.



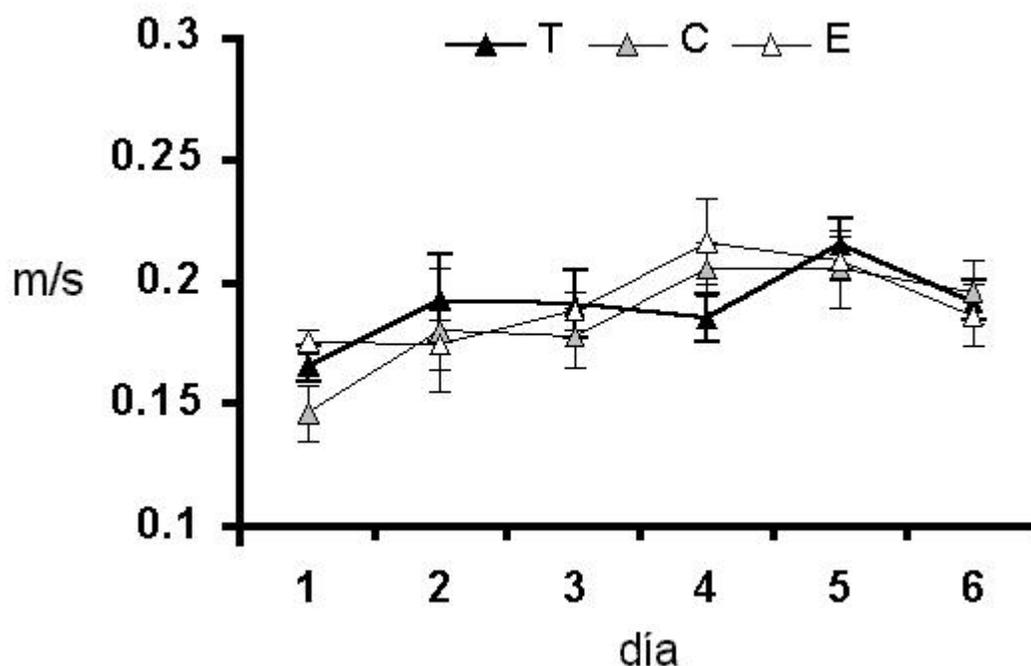


Figura R40. Velocidad de Nado desarrollada por los animales entrenados en la prueba de aprendizaje egocéntrico. Media \pm error estándar.

2. Electroencefalograma (EEG)

En la figura R41 se muestran trazos representativos del EEG de un animal del grupo testigo, obtenidos durante los 6 días de entrenamiento y las tres etapas conductuales consideradas en el estudio. La actividad theta fue evidente en las tres etapas de evaluación conductual con predominancia durante la búsqueda.

Con respecto a la comparación de la interacción banda/etapa los animales de los tres grupos, testigo [F (4,636) = 14.684, $p < 0.001$]; control [F (4,424) = 13.374, $p < 0.001$] y experimental [F (4,447) = 26.496, $p < 0.001$]; presentaron un efecto significativo de la interacción de los dos factores. Los datos de las comparaciones pareadas se muestran en la tabla R3. Los registros de las tres etapas fueron diferentes entre las tres bandas para los tres grupos. En la comparación entre las etapas de una misma frecuencia en general la búsqueda presentó mayor PR de alta

frecuencia con respecto a la PR de la basal y la meta mientras que entre la basal y la meta no hubo diferencias (Tabla R3).

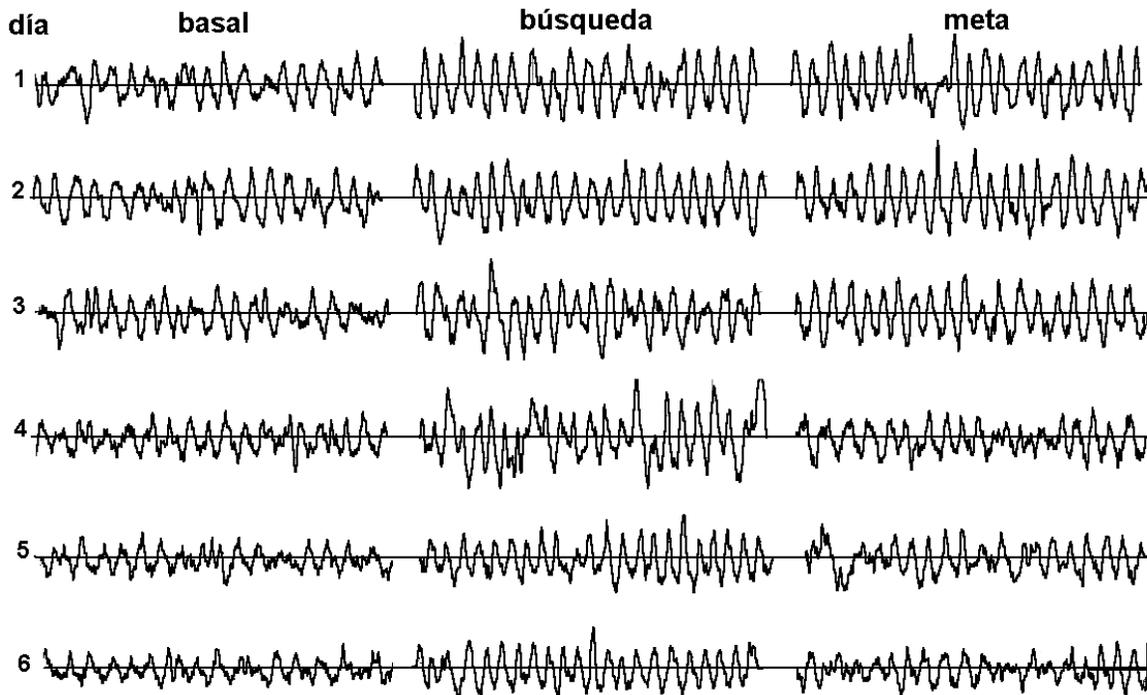


Figura R41. Registros representativos de un animal del grupo testigo entrenado en la prueba de aprendizaje egocéntrico, durante las tres etapas de estudio y los 6 días de entrenamiento conductual. Calibración: 250 μ V, 500ms.

En la comparación de la PR por día de entrenamiento entre las tres bandas, no hubo efecto significativo del entrenamiento para el grupo testigo [$F(10,636) = 0.951$, $p = 0.485$], ni experimental [$F(10,477) = 1.079$, $p = 0.377$], pero si para el grupo control [$F(10,424) = 3.241$, $p < 0.001$]. Sin embargo, las comparaciones pareadas mostraron que la PR de la banda de alta frecuencia fue significativamente mayor con respecto a la PR de la banda de baja frecuencia cada día de entrenamiento para el grupo testigo (Figura R42), mientras que para los animales del grupo control lo fue todos los días excepto el primero (Figura R43). Los animales del grupo experimental mostraron un patrón irregular de separación

entre estas dos bandas donde los días 1, 3, 5 y 6 la PR fue mayor para la banda de alta frecuencia (Figura R44). Con respecto a la banda de máxima frecuencia siempre fue diferente con respecto a las otras dos bandas, en los tres grupos (Figuras R42, R43 y R44).

TABLA R3. Potencia relativa por etapa y banda de las ratas entrenadas en la prueba de Aprendizaje Egocéntrico.

Grupo	Etapa	Baja frecuencia	Alta frecuencia	Máxima frecuencia
Testigo	Basal	38.96 ± 0.661	42.17 ± 0.715*	18.86 ± 0.332**
	Búsqueda	34.76 ± 0.718 ^a	46.86 ± 0.809* ^a	18.37 ± 0.348**
	Meta	38.02 ± 0.642 ^b	44.25 ± 0.603* ^b	17.41 ± 0.277**
Control	Basal	38.77 ± 0.738	41.98 ± 0.743*	19.40 ± 0.500**
	Búsqueda	34.27 ± 0.760 ^a	47.14 ± 0.811* ^a	18.62 ± 0.378**
	Meta	37.76 ± 0.822 ^b	44.04 ± 0.862* ^b	18.05 ± 0.346**
Experimental	Basal	39.49 ± 0.674	39.21 ± 0.621	21.09 ± 0.496**
	Búsqueda	34.88 ± 0.663 ^a	45.37 ± 0.742* ^a	19.67 ± 0.0.278**
	Meta	39.05 ± 0.536 ^b	42.29 ± 0.561* ^{ab}	18.51 ± 0.300** ^a

Media ± error estándar. *, Baja vs. alta, máxima frecuencia; +, alta vs. máxima frecuencia; a, basal vs. búsqueda, meta; b, búsqueda vs. meta. P < 0.05.

Grupo Testigo

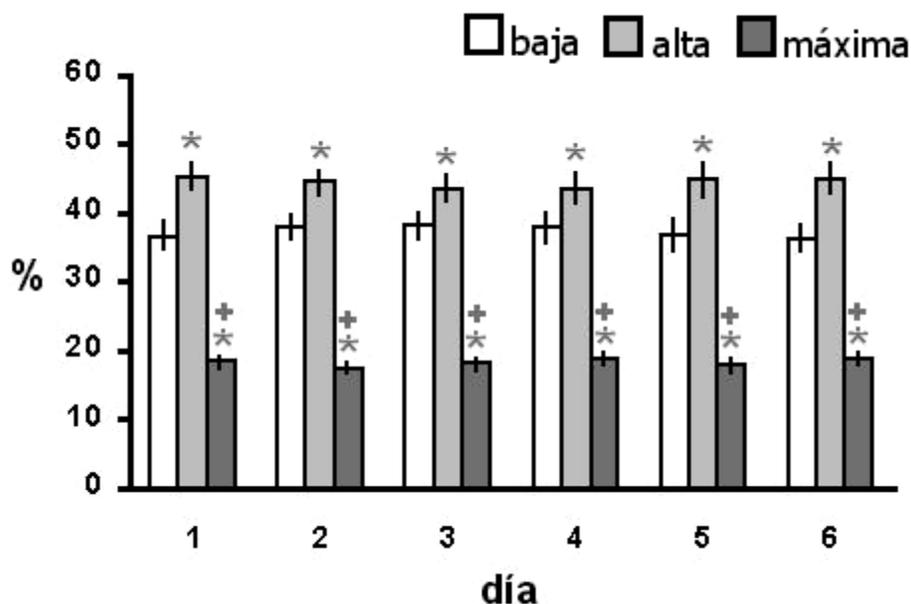


Figura R42. Potencia relativa de los animales del grupo testigo entrenados en la prueba de aprendizaje egocéntrico. Comparación de la PR entre las bandas de baja, alta y máxima frecuencia cada día de entrenamiento. ANOVA no significativo. Media \pm 2 errores estándar. *, baja frecuencia vs. alta y máxima frecuencia; +, alta frecuencia vs. máxima frecuencia.

Grupo Control

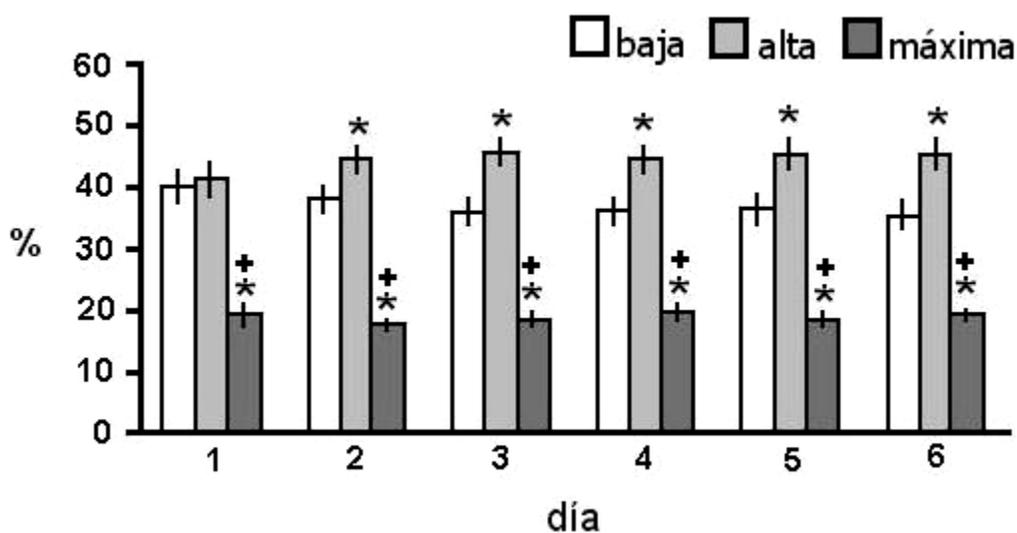


Figura R43. Potencia relativa de los animales del grupo control entrenados en la prueba de aprendizaje egocéntrico. Comparación de la PR entre las bandas de baja, alta y máxima frecuencia cada día de entrenamiento. Media \pm 2 errores estándar. *, baja frecuencia vs. alta y máxima frecuencia; +, alta frecuencia vs. máxima frecuencia. $p < 0.001$.

Grupo Experimental

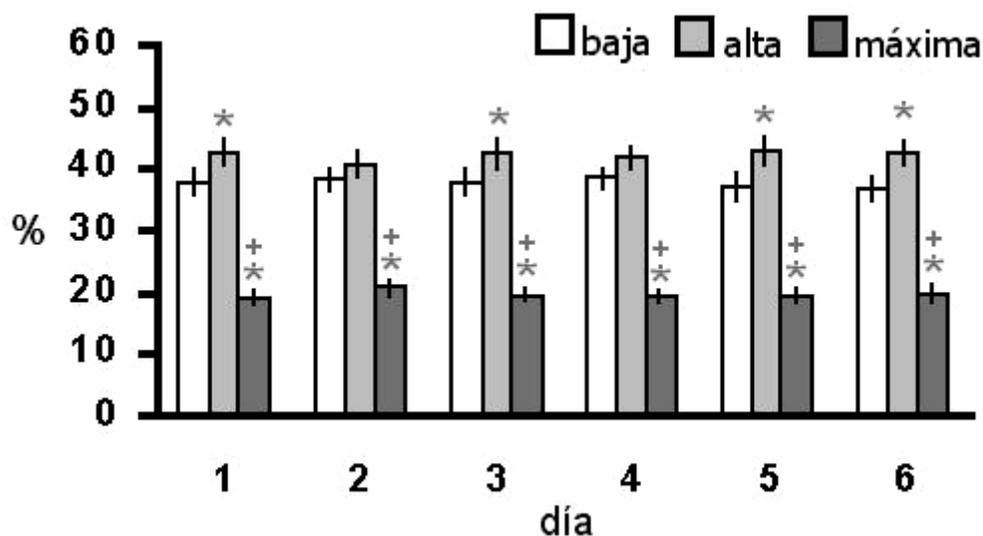


Figura R44. Potencia relativa de los animales del grupo experimental entrenados en la prueba de aprendizaje egocéntrico. Comparación de la PR entre las bandas de baja, alta y máxima frecuencia cada día de entrenamiento. Media \pm 2 errores estándar. ANOVA no significativo. *, baja frecuencia vs. alta y máxima frecuencia; +, alta frecuencia vs. máxima frecuencia.

Con respecto a la comparación de la interacción de los tres factores: día/etapa/banda, no se observaron efectos significativos para ninguno de los grupos [F (20,636) = 0.824, $p = 0.685$; F (20,424) = 0.800, $p = 0.715$; y, F (20,477) = 0.818, $p = 0.693$; respectivamente]. Los valores se muestran en las figuras R45, R46 y R47 para el grupo testigo, control y experimental; respectivamente.

En la figura R48 se han graficado los datos de los tres grupos referentes a la separación de bandas por etapa y día de entrenamiento para cada grupo. No hubo diferencias significativas en éste criterio para ninguno de los grupos de estudio [F (20,636) = 0.824, $p = 0.685$; F (20,424) = 0.800, $p = 0.715$; y, F (20,477) = 0.818, $p = 0.693$; respectivamente]. Las comparaciones por ensayo, esto es entre el basal y cada uno de los ensayos de cada día de prueba, no mostraron diferencias significativas para ninguno de los grupos de estudio [F (40,1068) = 0.953, $p = 0.556$;

F (40,712) = 1.172, p = 0.219 y F (40,801) = 0.483, p = 0.997; respectivamente] como puede observarse en las figuras R49, R50 y R51, respectivamente.

Las comparaciones intergrupales de los valores de potencia para los animales entrenados en la prueba de aprendizaje egocéntrico no mostraron diferencias significativas entre grupos para ningún factor o interacción (Datos no mostrados).

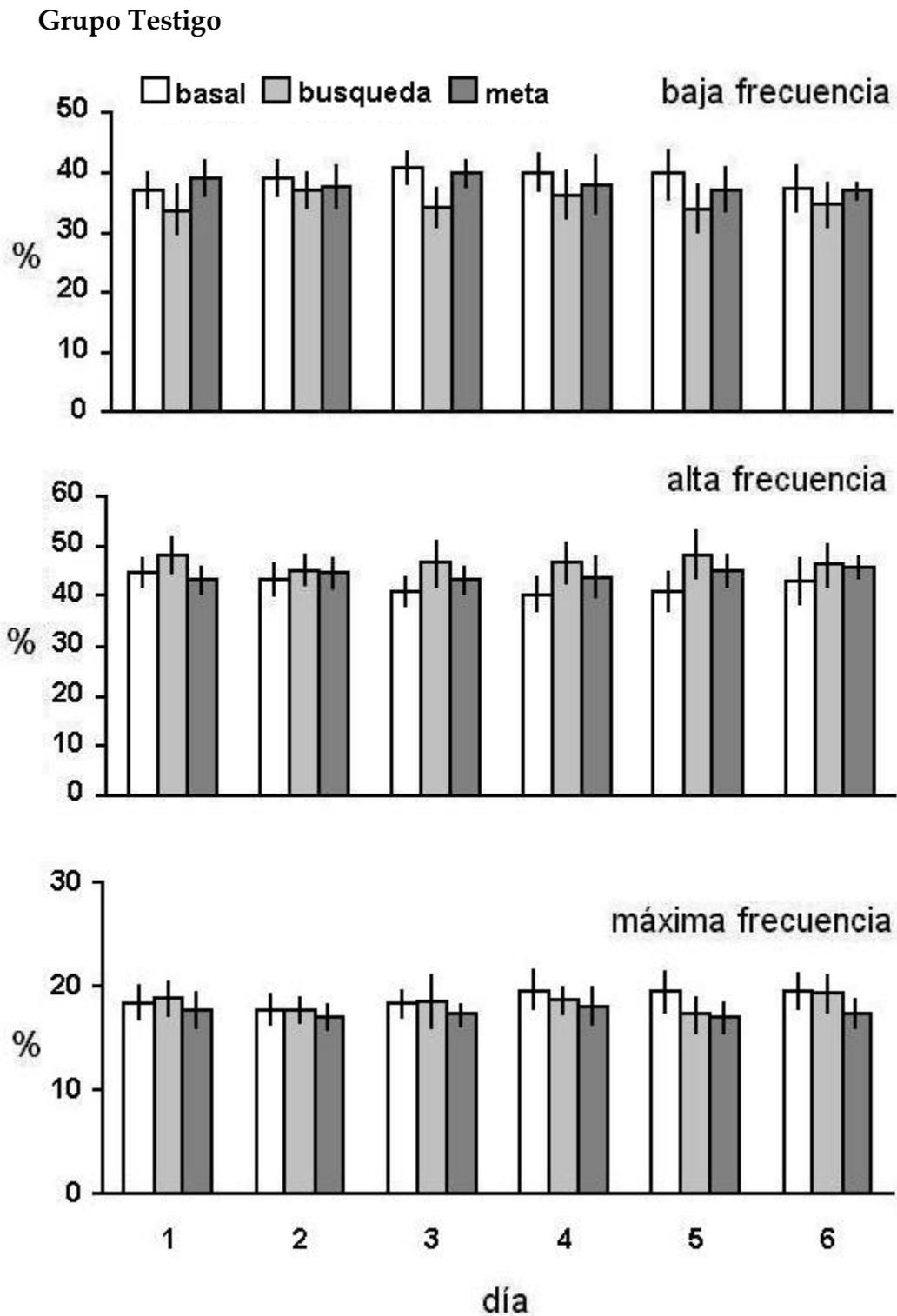


Figura R45. Potencia relativa de los animales del grupo testigo entrenados en la prueba de aprendizaje egocéntrico. Comparación de la potencia relativa por día, banda y etapa conductual. Media \pm 2 errores estándar.

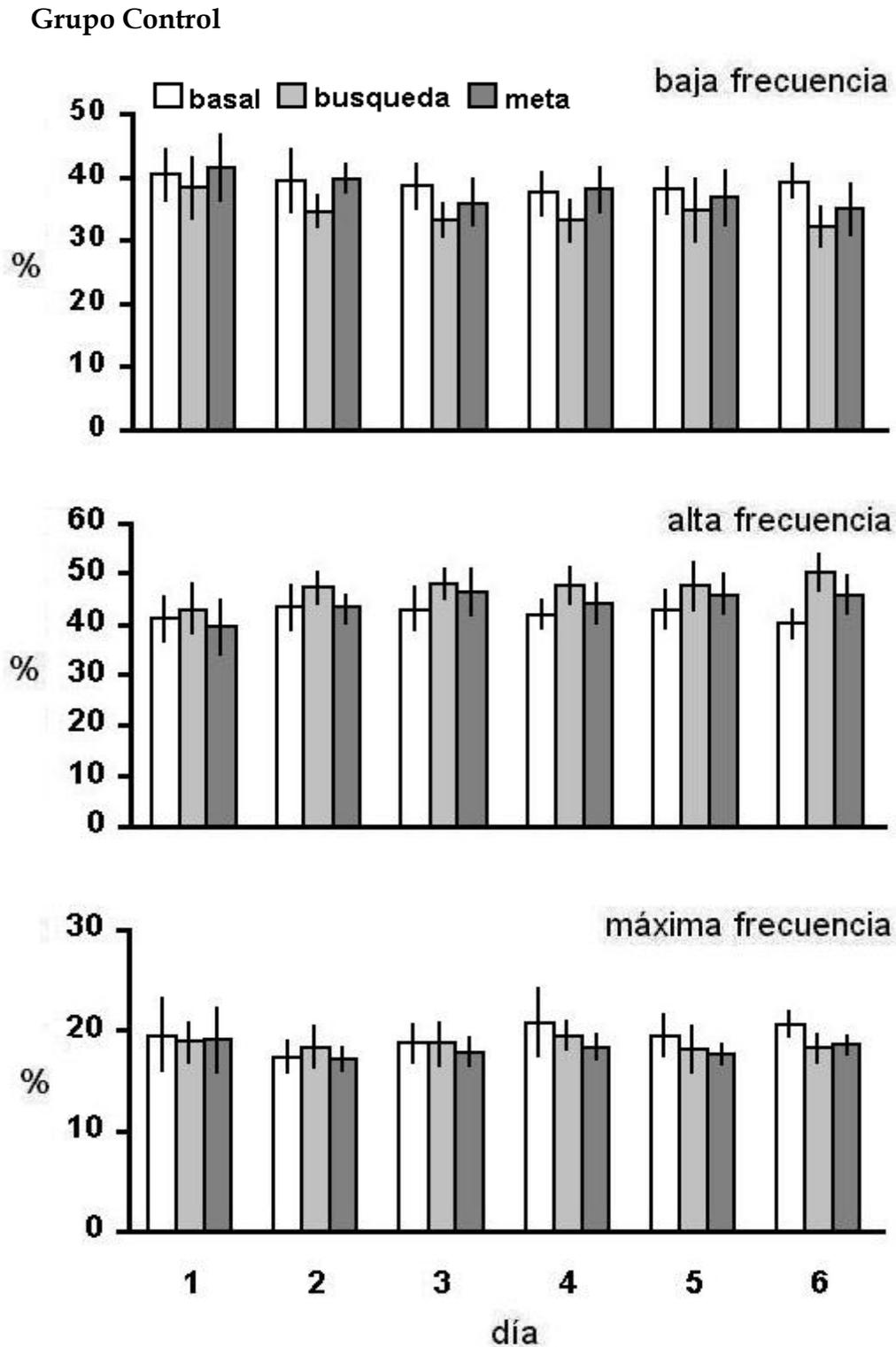


Figura R46. Potencia relativa de los animales del grupo control entrenados en la prueba de aprendizaje egocéntrico. Comparación de la potencia relativa por día, banda y etapa conductual. Media \pm 2 errores estándar.

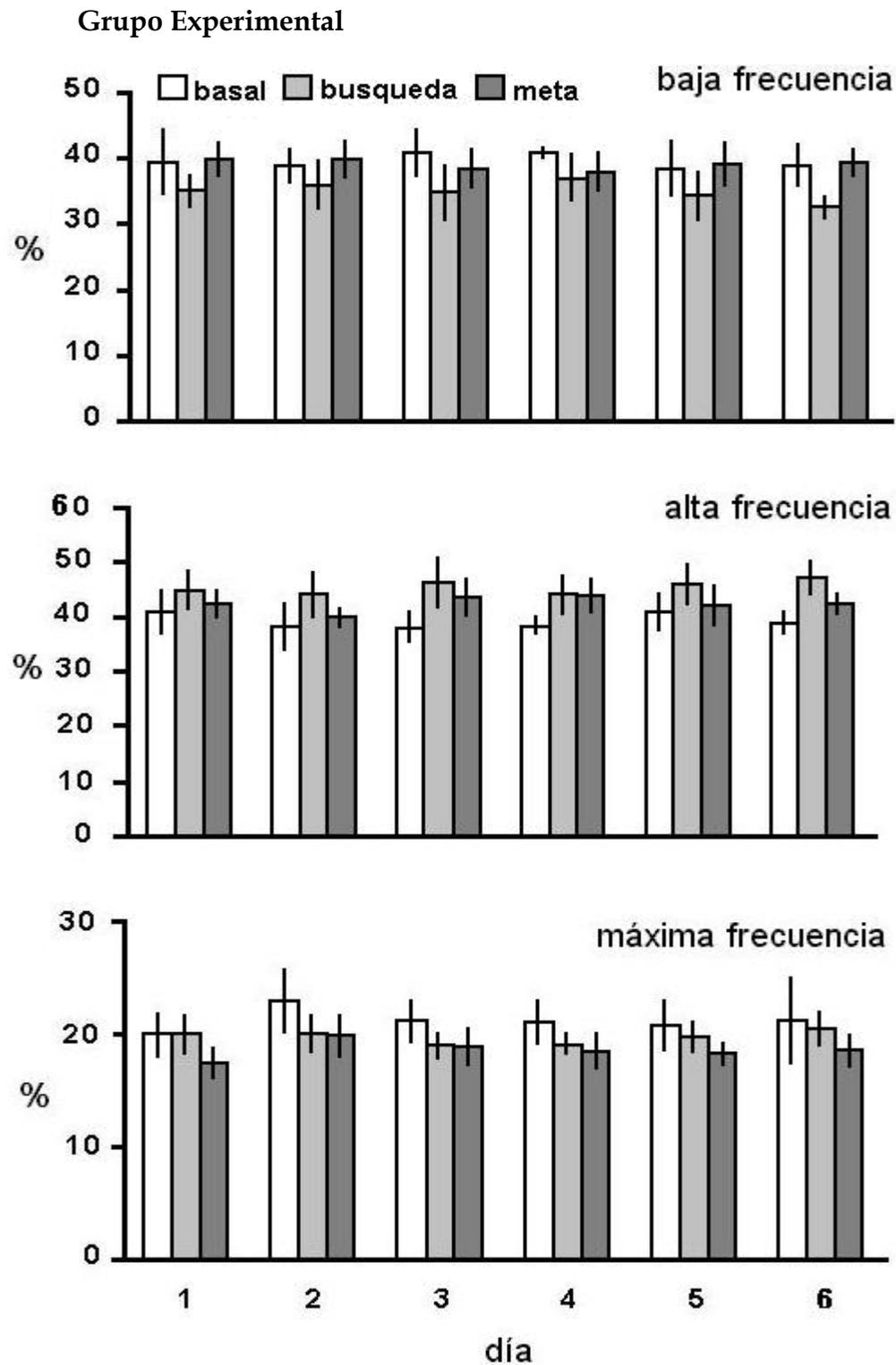


Figura R47. Potencia relativa de los animales del grupo experimental entrenados en la prueba de aprendizaje egocéntrico. Comparación de la potencia relativa por día, banda y etapa conductual. Media ± 2 errores estándar.

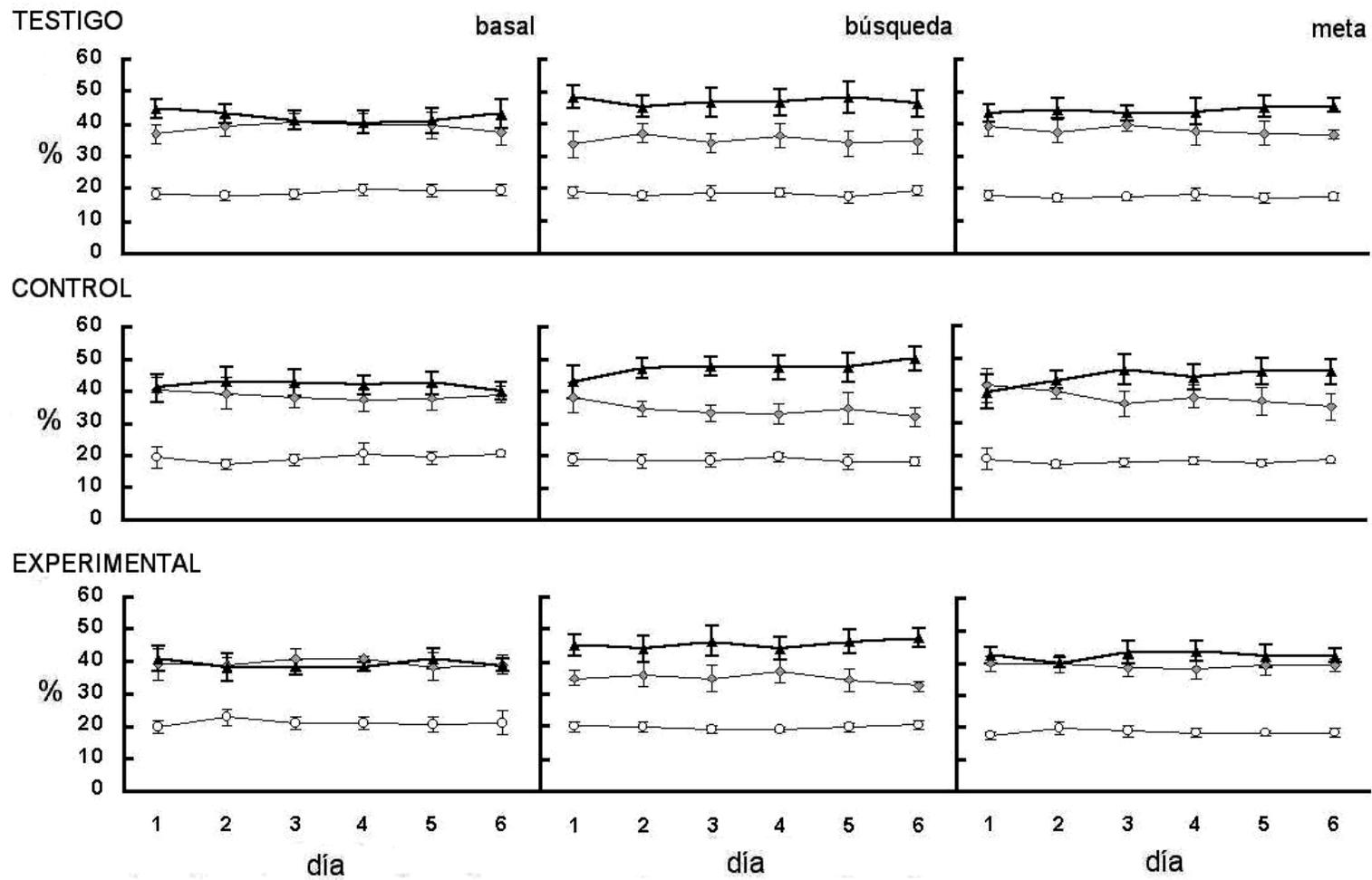


Figura R48. Comparación de la potencia relativa de los tres grupos de animales entrenados en la prueba de aprendizaje egocéntrico por día y banda, para cada etapa conductual. Rombos, baja frecuencia; triángulos, alta frecuencia; círculos, máxima frecuencia. Media \pm 2 errores estándar.

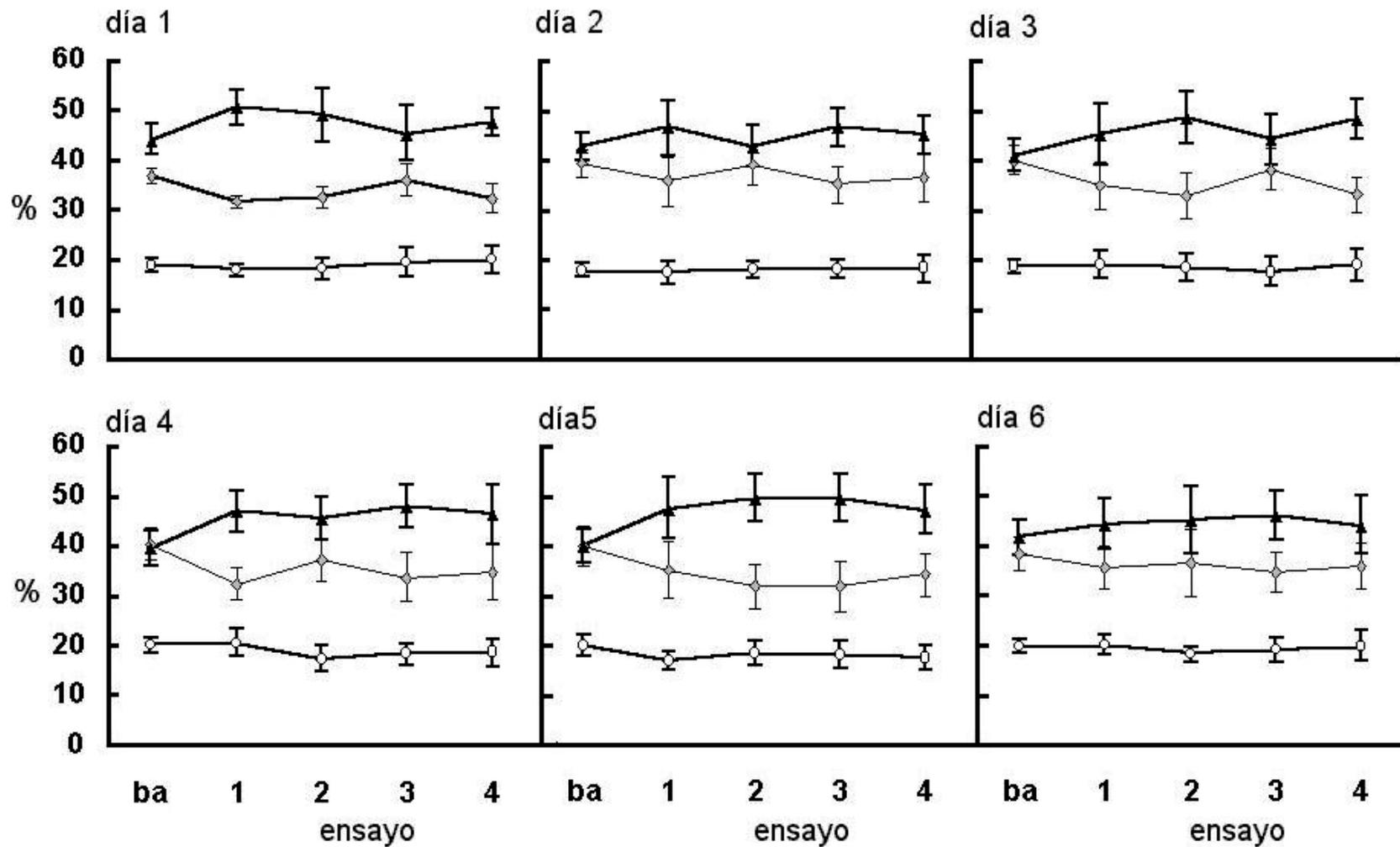


Figura R49. Comparación de la potencia relativa obtenida durante el registro basal y cada uno de los ensayos de búsqueda por día por el grupo testigo entrenado en la prueba de aprendizaje de egocéntrico. Media \pm 2 errores estándar.

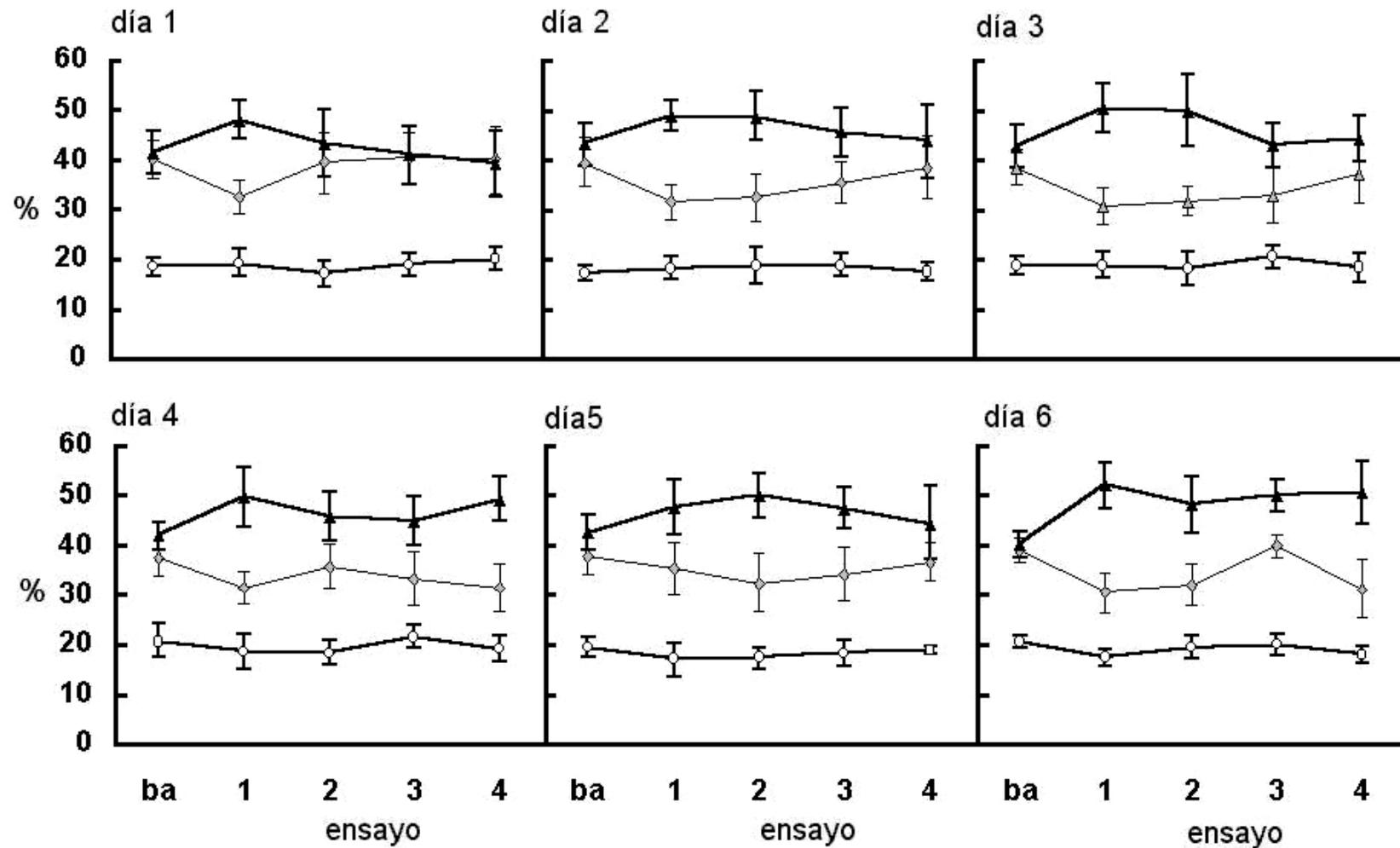


Figura R50. Comparación de la potencia relativa obtenida durante el registro basal y cada uno de los ensayos de búsqueda por día por el grupo control entrenado en la prueba de aprendizaje egocéntrico. Rombos, baja frecuencia; triángulos, alta frecuencia; círculos, máxima frecuencia. Media ± 2 errores estándar.

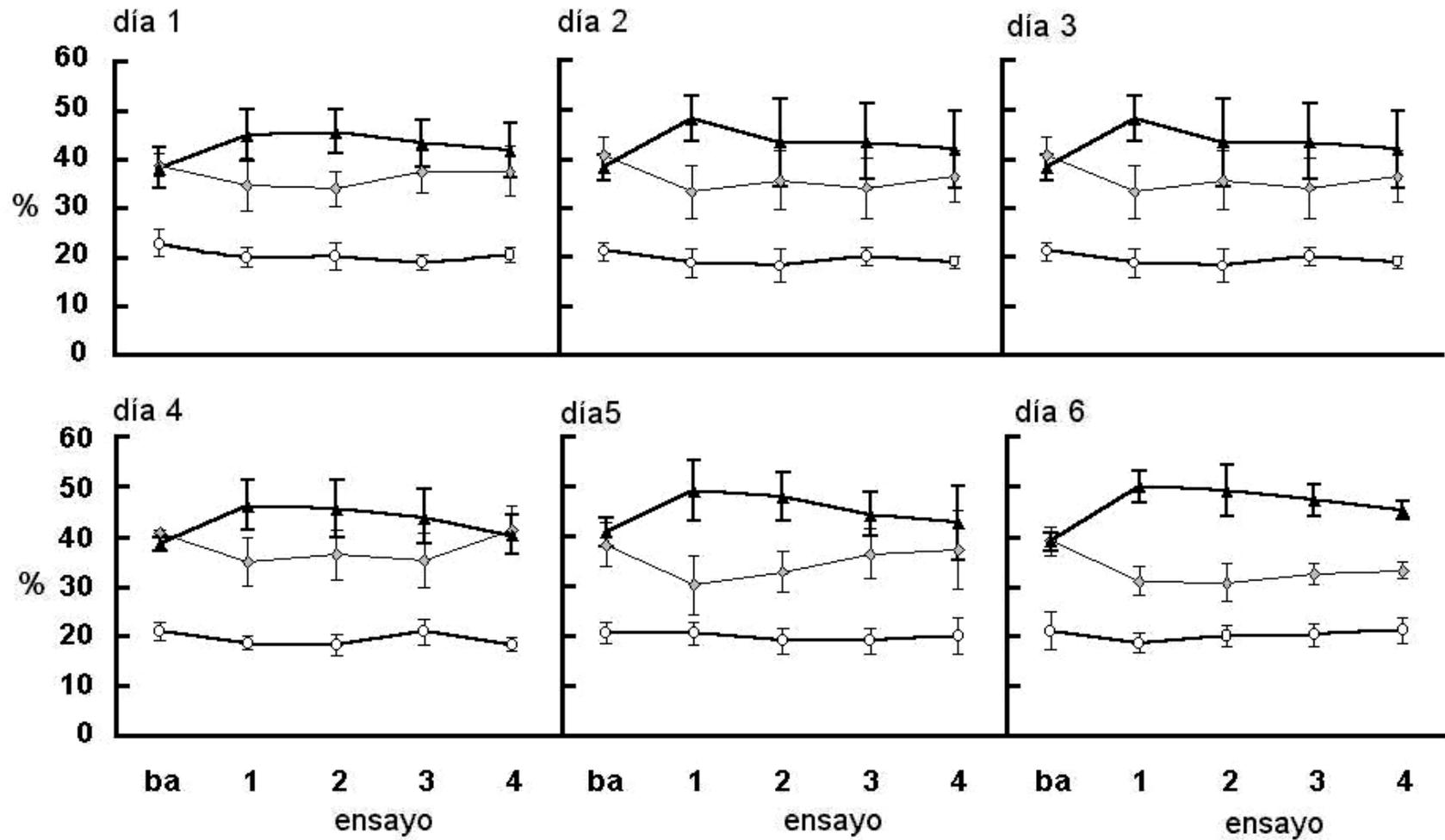


Figura R51. Comparación de la potencia relativa obtenida durante el registro basal y cada uno de los ensayos de búsqueda por día por el grupo experimental entrenado en la prueba de aprendizaje egocéntrico. Rombos, baja frecuencia; triángulos alta frecuencia; círculos máxima frecuencia. Media ± 2 errores estándar.

Morfología

La comparación intergrupal de la densidad de espinas dendríticas mostró diferencias significativas para los factores grupo y dendrita [$F(2,45) = 11.605$, $p < 0.001$ y $F(2,45) = 3.843$, $p = 0.029$; respectivamente], pero no para la interacción entre ellos [$F(4,45) = 0.32$, $p = 0.863$]. Las comparaciones pareadas mostraron que los animales del grupo testigo tuvieron mayor densidad de espinas con respecto tanto al grupo control ($p = 0.019$) como con respecto al grupo experimental ($p < 0.001$); mientras que no hubo diferencias significativas entre los grupos control y experimental (Figura R52).

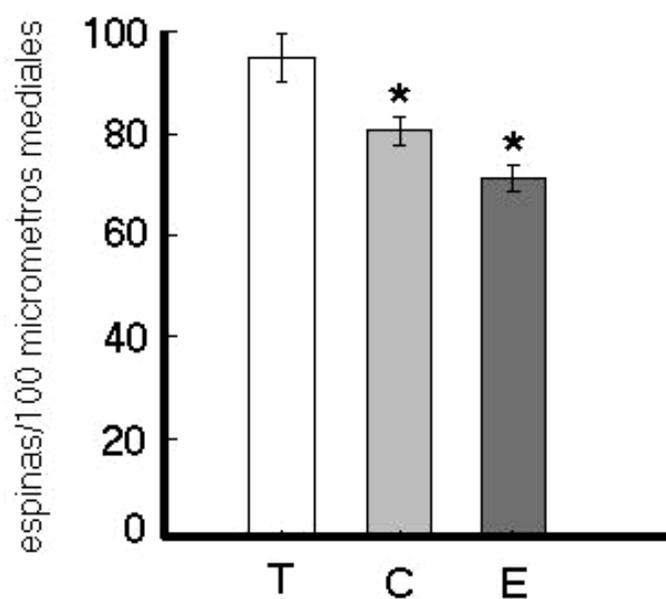


Figura R52. Densidad de espinas dendríticas (número de espinas en 100 micrómetros mediales de las dendritas apical, oblicua, y basal). Media \pm error estándar. *, testigo vs. control y experimental. $p \leq 0.001$.

Con respecto al tipo de espina dendrítica las comparaciones mostraron un efecto significativo de la interacción de los factores grupo/espina [$F(8, 225) = 5.104$, p

< 0.001], aunque no para la interacción grupo/dendrita/espina [$F(16,225) = 0.410$, $p = 0.979$]. Las comparaciones pareadas mostraron que tanto el grupo control como el experimental tuvieron mayor número de espinas gordas en comparación con el grupo testigo ($p < 0.001$) y al grupo control ($p = 0.001$). De esta manera los animales testigo tuvieron significativamente mayor proporción de espinas en hongo con respecto a las gordas mientras que los grupos control y experimental no mostraron diferencias entre la proporción de espinas gorda y en hongo (Figura R53).

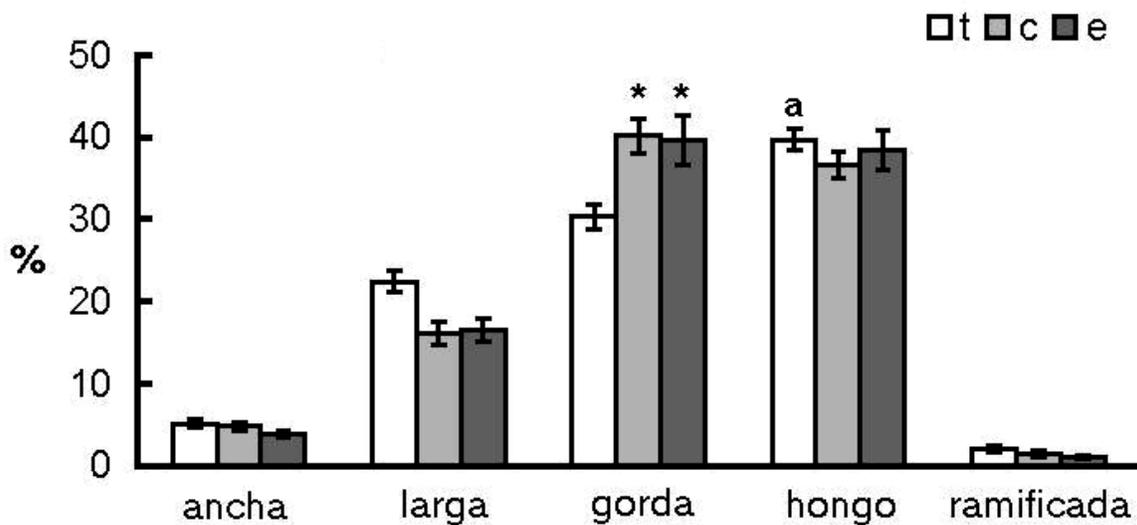


Figura R53. Proporción de espinas dendríticas en 100 espinas mediales de la dendrita apical, una dendrita basal y una oblicua. Media \pm error estándar. *, testigo vs. control y experimental; a, gorda vs hongo. $p \leq 0.001$.

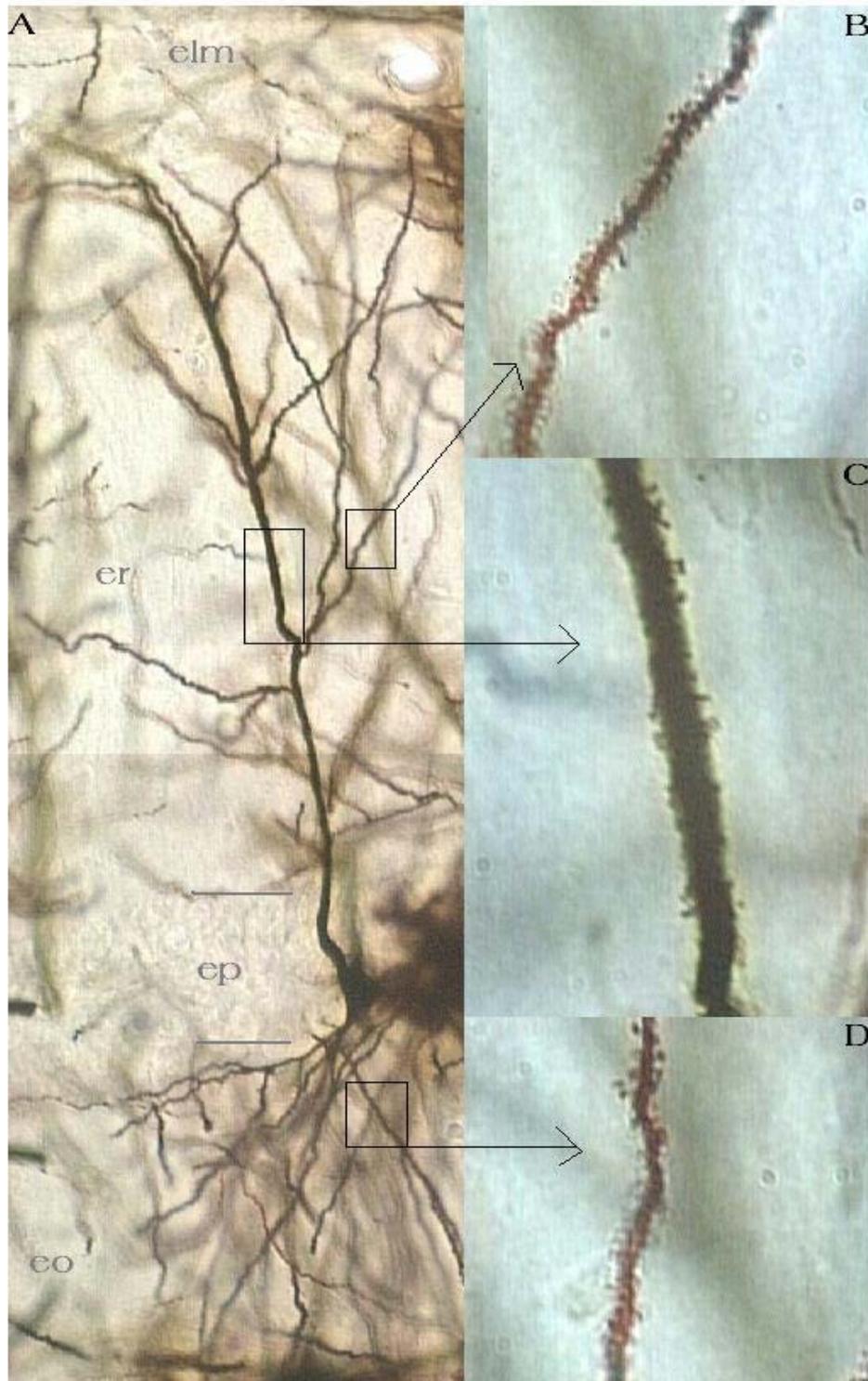


Figura R 54. Fotomicrografía de una neurona piramidal de CA1 del hipocampo, de un animal testigo. Ejemplo de los segmentos considerados para el estudio cuantitativo de densidad de espinas y proporción del tipo de espinas. A, neurona completa; B, dendrita oblicua; C, dendrita apical. Amplificación: A, 40 X; B, C y D, 100X..

DISCUSIÓN

Histología

Las micrografías representativas de un animal implantado y uno lesionado se presentan en la figura R1. Solo los animales con el electrodo colocado en la posición correcta fueron incluidos en el estudio.

Neuroquímica

Los animales del grupo Experimental mostraron una reducción del 90 % de la serotonina hipocampal aunada a un incremento del recambio de serotonina de aproximadamente 30 veces con respecto al grupo testigo, por lo que el efecto resultante de la manipulación farmacológica sobre el grupo experimental fue el de una exacerbación de la actividad de la serotonina hipocampal. Sin embargo, el grupo control mostró una disminución moderada de serotonina hipocampal por lo que este grupo representó el efecto de disminución de actividad serotoninérgica que no se produjo en el grupo experimental.

La medición de catecolaminas por cromatografía líquida de alta resolución mostró que el grupo control -el cual recibió la aplicación de ácido ascórbico al 2% en solución salina- presentó una disminución del 50 % de serotonina con respecto al grupo testigo (Ver figura R2). No existen reportes acerca del efecto de la aplicación de ácido ascórbico sobre neuronas y axones serotoninérgicos. El ácido ascórbico es ampliamente usado como antioxidante y en nuestro caso se utilizó para evitar la oxidación de la 5,7-DHT antes de su aplicación; sin embargo existen reportes de que el ascorbato (forma ionizada del ácido ascórbico) induce estrés oxidativo lo que le confiere la capacidad de conducir a la apoptosis (Song, y cols., 2001) y que puede agravar el daño isquémico por su efecto como inductor de lipoperoxidación (Hillered, y cols., 1988). Por otro lado, la liberación extracelular

del ascorbato está estrechamente relacionada con la de neurotransmisores excitadores y se ha reportado que al menos en el estriado la aplicación de ácido ascórbico produce la liberación masiva de glutamato (Yusa, 2001). En este sentido, en estudios desarrollados en nuestro laboratorio observamos que la aplicación intraestriatal de ácido ascórbico produjo una disminución significativa en el contenido de serotonina con respecto a animales testigo aunque, no de igual magnitud a la observada tras la aplicación de 5-7DHT (en preparación). Así, la disminución de serotonina hipocampal observada en los animales control pudo deberse a un efecto excitotóxico del ácido ascórbico aplicado como solución vehículo.

Con respecto a la lesión de las vías aferentes serotoninérgicas realizamos la inyección estereotáxica del neurotóxico selectivo para neuronas serotoninérgicas 5,7-DHT (4 μ g disueltos en 0.4 μ l de solución salina con ácido ascórbico al 2%) según metodología reportada por Murtha y colaboradores en cuyo trabajo lograron una reducción de la concentración de serotonina del 60 % en el hipocampo dorsal y del 70 % en el hipocampo ventral (Murtha y Pappas, 1994). En nuestro caso los animales del grupo experimental mostraron un abatimiento de serotonina del 90% en el hipocampo dorsal. En la comparación del 5HIAA, principal metabolito de la serotonina no hubo diferencias entre grupos. Sin embargo al realizar la estimación del recambio de serotonina hipocampal -velocidad de utilización de la serotonina indicado por la razón $[5HIAA]/[5-HT]$ (Mercugliano, y cols., 1996)-, el grupo experimental mostró un recambio mayor con respecto tanto al grupo testigo como al control (Ver figura R3). De ésta manera si bien hubo una disminución casi total del contenido de serotonina hipocampal en el grupo experimental, su velocidad de utilización se incrementó alrededor de 30 veces con respecto al grupo testigo y alrededor de 40 veces con respecto al grupo control, mientras que no hubo diferencias entre los grupos testigo y control. Estos resultados indican que aunque el contenido de serotonina fue disminuido como resultado de la lesión farmacológica con la 5,7-DHT, hubo; una mucho mayor velocidad de utilización de

serotonina por las neuronas hipocampales de este grupo de animales, de forma que la función serotoninérgica se vio exacerbada hasta alcanzar niveles aún mayores, incluso que el grupo testigo; puesto que el contenido de 5HIA no fue diferente entre los dos grupos. De ésta manera, la maniobra farmacológica si bien disminuyó el contenido de serotonina hipocampal, también exacerbó su actividad de manera que el resultado fue un incremento de la actividad serotoninérgica en el hipocampo. En otras palabras, el incremento en el recambio de serotonina indica que a pesar de la disminución del contenido de serotonina hipocampal, las neuronas que permanecieron luego de la lesión fueron capaces de incrementar su liberación de transmisor y las neuronas hipocampales incrementaron su velocidad de utilización del mismo, ninguno de éstos mecanismos compensatorios fue observado tras la disminución menos severa de serotonina del grupo control. En éste sentido, aquellos reportes donde se obtuvieron disminuciones del contenido de serotonina en hipocampo dorsal desde entre el 60 y 80% con éste mismo procedimiento de lesión (aún mayor que en el caso de nuestro grupo control), no reportaron cambios en la velocidad de utilización de la serotonina (Murtha y Pappas, 1994; Altman, y cols., 1990).

Conducta

La disminución de serotonina produjo un desempeño deficiente en los animales entrenados en la prueba de aprendizaje de señal, mientras que el incremento de la función serotoninérgica produjo deficiencias moderadas en la prueba de aprendizaje de lugar y eliminó totalmente el aprendizaje egocéntrico.

De acuerdo con los resultados neuroquímicos, los resultados conductuales mostraron alteraciones en el aprendizaje semejantes a las esperadas tras un incremento en la función serotoninérgica en lo que respecta a la prueba de aprendizaje de lugar.

Es aceptado ampliamente que el aprendizaje de lugar es un proceso dependiente del hipocampo, y que ésta región cerebral es la que organiza de manera predominante la codificación del espacio en forma de mapas constituidos por la configuración de señales ambientales (Poucet, 1993; MacNamara y Skelton, 1993). La estructuración de estos mapas permite a las ratas localizar la plataforma sumergida en base a la configuración de señales espaciales, de manera que gradualmente van estableciendo vías de nado directas hacia la plataforma sin importar el cuadrante de inicio del ensayo; este desarrollo de las rutas puede ser observado en la figura R4. Una vez que la plataforma es removida de su lugar, durante la prueba de transferencia, se puede observar que las ratas concentran su búsqueda en el cuadrante donde estuvo localizada la plataforma (ver figura R4 y R6). Este hecho es el indicador principal de que las ratas hicieron uso de la estrategia de mapeo cognoscitivo dependiente de la función hipocampal (MacNamara y Skelton, 1993; Jarrad, 1993).

Los animales de los tres grupos entrenados en la prueba de aprendizaje de lugar mostraron curvas de aprendizaje similares, de modo que todos redujeron significativamente la latencia de escape desde el segundo día de entrenamiento (Ver figura R5). Además, los tres grupos mostraron el desarrollo de una preferencia espacial por el cuadrante en que estuvo colocada la plataforma durante el ensayo de transferencia (Ver figura R6). Sin embargo, las comparaciones intergrupales mostraron que los animales experimentales tuvieron latencias más largas los primeros dos días de entrenamiento con respecto al grupo testigo y el segundo día con respecto al grupo control (Ver figura R5). Se ha reportado reiteradamente que el abatimiento de serotonina tanto cerebral como hipocampal no altera el desempeño de los roedores en la prueba estándar del laberinto acuático de Morris (Nilsson, y cols., 1988; Richter-Levin, y cols., 1993; Volpe, y cols., 1992; Riekkinen, y cols., 1990). Por ejemplo, se ha visto que la administración del antagonista 5-HT₃ WAY100289 no produce alteraciones en la prueba estándar de aprendizaje de lugar (Fletcher y Korth, 1993); así mismo el abatimiento de las

concentraciones de serotonina cerebral mediante la administración de 5,7-DHT tampoco produce efecto alguno sobre el desempeño de las ratas en el laberinto acuático ni en el radial (Richter-Levin y Segal, 1989; Murtha y Pappas, 1994; Volpe, y cols., 1992). Cuando la serotonina hipocampal es disminuida selectivamente en el hipocampo, de igual manera se ha encontrado que no tiene efecto sobre el desempeño en el laberinto acuático (Richter-Levin y Segal, 1989; Murtha y Pappas, 1994). Lo anterior concuerda con los datos observados en el grupo control, el cual a pesar de tener una reducción significativa en el contenido de serotonina no muestra alteraciones en su desempeño conductual con respecto al grupo testigo.

A pesar de que la curva de aprendizaje del grupo experimental fue semejante a las de los grupos testigo y control, estos animales desplegaron latencias mayores los primeros dos días de entrenamiento con respecto al grupo testigo y el segundo día con respecto al grupo control. En los diversos estudios en que se realiza la manipulación del sistema serotoninérgico, se ha observado que solamente el incremento de las concentraciones de serotonina o la aplicación de agonistas serotoninérgicos producen deficiencias en las pruebas de aprendizaje espacial (Carli, y cols., 1995; Riekkinen, y cols., 1990; Buhot, y cols., 1995; Riekkinen, y cols., 1991). En éste sentido se ha reportado que la administración del agonista serotoninérgico 8-OH-DPAT que actúa sobre receptores 5-HT_{1A}, produce deficiencias en la prueba estándar de aprendizaje de lugar en laberinto de Morris (Riekkinen, y cols., 1991). Además, la administración de inhibidores de la recaptura de serotonina produce deficiencias en diferentes evaluaciones cognitivas incluyendo el aprendizaje espacial dependiente del hipocampo (Carli, y cols., 1995; Buhot, y cols., 1995; Riekkinen, y cols., 1991). De ésta manera, los animales del grupo experimental fueron ineficientes durante la etapa inicial del aprendizaje espacial lo que concuerda con una mayor actividad serotoninérgica como lo sustentan los datos neuroquímicos. Así, un incremento en la función serotoninérgica inducido por el abatimiento del 90% de la concentración hipocampal produjo una adquisición inicial deficiente en los animales entrenados

en la prueba de aprendizaje de lugar. Sin embargo, en el transcurso del entrenamiento los animales alcanzaron un desempeño similar al de los animales testigo y fueron capaces de establecer una preferencia espacial.

En resumen, la disminución de la serotonina hipocampal no produjo efectos sobre el aprendizaje de lugar mientras que el incremento de la función serotoninérgica produjo una deficiencia moderada al inicio del aprendizaje, pero un ulterior desempeño normal.

El segundo tipo de estrategia evaluado en el presente trabajo, el aprendizaje de señal, ha sido relacionado con la función de un sistema de memoria que incluye al cuerpo estriado (McDonald y White, 1993; McDonald y White, 1994), el cual trabaja en estrecha relación con la corteza frontal (Packard y McGaugh, 1996; Kesner, y cols., 1996). Se ha reportado que solamente cuando se realiza la lesión simultánea de los sistemas de neurotransmisión colinérgico y serotoninérgico se observan deficiencias en la navegación en el laberinto acuático de Morris que incluyen al aprendizaje de señales (Richter-Levin y Segal, 1989, Vanderwolf, 1987). Por otro lado también se ha reportado que la aplicación de agonistas serotoninérgicos en dosis muy altas interfiere con la capacidad de aprendizaje señalizado (Riekkinen, y cols., 1991); incluso se ha postulado la existencia de una dicotomía en la cual el aprendizaje de lugar sería dependiente de transmisión colinérgica y el aprendizaje de señal sería dependiente de la transmisión serotonina (Nilsson, y cols., 1988; Olton, y cols., 1979). Por otro lado, no existen reportes acerca de las consecuencias de la disminución experimental de la serotonina cerebral o hipocampal sobre la capacidad de aprendizaje señalizado; sin embargo dado que éste tipo de aprendizaje se ha encontrado relacionado con un sistema de memoria independiente del hipocampo (el ya mencionado sistema estriado-cortical) no se esperaría que el abatimiento de serotonina hipocampal produjera alteraciones en ésta capacidad de establecimiento de asociaciones estímulo-respuesta.

Nuestros resultados mostraron que los tres grupos de animales redujeron exitosamente sus latencias de escape durante el entrenamiento y aunque los animales del grupo testigo lo hicieron desde el tercer día mientras que los animales de los grupos control y experimental lo hicieron desde el segundo día, no hubo diferencias intergrupales en estos días de entrenamiento. Sin embargo, el grupo control mostró un máximo desempeño el día 4 de entrenamiento luego del cual sus latencias incrementaron su variabilidad y fueron mayores con respecto al grupo testigo el día 5 y con respecto al grupo experimental los días 5 y 6 (Ver figura R22). Como evidencia ulterior de que los tres grupos de animales desarrollaron una estrategia no espacial (no hipocampal) de resolución de ésta prueba, la comparación de número de intersecciones en cada cuadrante durante a prueba de transferencia muestra que ninguno de ellos desarrolló una tendencia espacial y que resolvieron la prueba sin el establecimiento de mapas cognoscitivos (Ver Figura R23).

De esta manera, la disminución de serotonina cerebral sin modificaciones en la velocidad de utilización (grupo control) produjo un desempeño deficiente los últimos días de entrenamiento. Estos resultados no están de acuerdo con los reportes que indican por un lado que el aprendizaje de señal es independiente del sistema hipocampal (McDonald y White, 1995, 1994) y por el otro con los reportes de que el aprendizaje de señales solamente es alterado por la disminución de serotonina en condiciones de lesión del sistema colinérgico (Richter-Levin y Segal, 1989; Riekkinen, y cols., 1991). Sin embargo, y aunque éste tipo de pruebas pueden ser realizadas por los animales sin la participación del hipocampo (McDonald y White, 1993) se han encontrado relaciones entre la actividad hipocampal y el establecimiento de la adquisición instrumental de información en pruebas de condicionamiento operante (Givens y Olton, 1994). Este tipo de pruebas son operacionalmente semejantes a las asociaciones estímulo respuesta requeridas para resolver el aprendizaje señalizado en el laberinto de Morris. De este modo, si bien ha sido demostrado que el estriado es capaz de procesar la información en forma

de asociaciones estímulo-respuesta independientemente del hipocampo, no se ha descartado la posibilidad de que el hipocampo pueda manejar ésta información de manera paralela. De acuerdo con esto se ha reportado que alguna información parece ser adquirida de manera paralela por más de un sistema de memoria (McDonald y White, 1993; Oliveira, y cols., 1997) lo que podría explicar la aparente participación del hipocampo en la prueba de aprendizaje de señales ya que la adquisición paralela de información puede tener efectos cooperativos y/o competitivos (McDonald y White, 1993; White y McDonald, 2002). De acuerdo con ello, se ha observado que las lesiones del hipocampo producen la facilitación de la conducta de las ratas en pruebas de “ganar y quedarse” (win-stay) que son organizadas a nivel del estriado. Por lo anterior los autores han sugerido que la información procesada por ambos sistemas tiene una interacción competitiva (White y McDonald, 2002). En este sentido nuestros resultados parecen indicar que existe una modulación serotoninérgica a nivel hipocampal en la consolidación de la tarea cuya organización principal ocurriría a nivel estriatal. Ha sido reportado que la disminución de la concentración de serotonina cerebral incrementa las conductas recompensadas, mientras que el incremento de la misma produce disminuciones en la expresión de dichas conductas (Fletcher, 1999). Nuestros resultados muestran que este efecto no se mantiene cuando la serotonina es modificada a nivel hipocampal, ya que de hecho estos animales con disminución de serotonina mostraron deficiencias en la prueba de aprendizaje de señal. Esto refuerza la idea de que el sitio primario de influencia serotoninérgica sobre la modulación de esta estrategia se localiza fuera del hipocampo, pero incluye a la interacción entre el estriado y el hipocampo en la modulación de la misma.

A diferencia de los reportes de la literatura, nuestro grupo experimental que presentó un incremento de la actividad serotoninérgica suficiente para interferir con la adquisición de información espacial por parte del hipocampo, no mostró deficiencias en el aprendizaje de señal. Esto puede tener dos explicaciones: Primero, el incremento de la función serotoninérgica no fue lo suficientemente

grande como para afectar al aprendizaje de señales. A este respecto, se ha reportado que la administración del agonista serotoninérgico 8-OH-DPAT que actúa sobre receptores 5-HT_{1A}, produce deficiencias en la prueba estándar de aprendizaje de lugar en laberinto de Morris en la rata, mientras que no altera el aprendizaje de señales, y que; en dosis aún mayores es capaz de alterar de manera adversa el aprendizaje de señales en dicho paradigma (Carli, y cols., 1995). En éste mismo sentido la aplicación de alproclate -un bloqueador de la recaptura de serotonina- produce deficiencias en el aprendizaje señalizado solamente después de la aplicación de dosis muy altas (20 mg/kg) (Riekkinen, y cols., 1991). Estos resultados concuerdan con los observados en el presente trabajo en el grupo experimental, en el que el incremento de la actividad serotoninérgica hipocampal fue suficiente para producir deficiencias moderadas en el aprendizaje de lugar pero no en el aprendizaje de señal.

La segunda posibilidad es que el incremento de serotonina deba ocurrir a nivel cerebral y no hipocampal para producir dicho efecto adverso. Este segundo punto de vista implica que el sitio primario de organización de la capacidad de aprendizaje de señales es extrahipocampal -como se ha mostrado experimentalmente- y es posible que ocurra a nivel estriatal (White y McDonald, 2002). Así, la observación de efectos adversos sobre la codificación del aprendizaje de señales tras el incremento de la actividad serotoninérgica ocurriría solamente cuando abarca el sitio de organización primordial de dicha capacidad (estriado) y la falta de efectos adversos observados en el grupo experimental en nuestro trabajo (en el que la función serotoninérgica fue exacerbada en el hipocampo) pudo deberse a que dicha función no fue incrementada en el estriado.

Para contribuir al conocimiento de los mecanismos involucrados en dichas disyuntivas se proponen la realización de estudios experimentales en los que se realice la evaluación del aprendizaje de señales tras la manipulación de la concentración de serotonina estriatal, así como de la interacción hipocampo-estriado en la organización del aprendizaje de señales.

La tercera estrategia de aprendizaje estudiada, el aprendizaje egocéntrico, también ha sido relacionada con la función del sistema de memoria que incluye al cuerpo estriado (Brasted, y cols., 1997). Existen además reportes recientes que involucran al cerebelo en el procesamiento de información egocéntrica (más específicamente de procedimiento) durante la resolución por parte de los animales de pruebas espaciales que involucran secuencias de respuestas motoras (Hikosaka, y cols., 1998; Pascual-Leone, y cols., 1993; Molinari, y cols., 1997). Con respecto a la serotonina se ha reportado que la disminución de su concentración tanto cerebral como hipocampal produce la facilitación de pruebas conductuales con componentes predominantemente egocéntricos.

Desde trabajos tempranos, Altman y colaboradores (1990) realizaron pruebas conductuales luego de abatir la concentración de serotonina cerebral e hipocampal, en ratas; y observaron un mejor desempeño de los animales en pruebas de aprendizaje con “fuertes componentes egocéntricos”, tales como el aprendizaje de una ruta correcta en el laberinto de Stone. Este laberinto consiste en 14 T's en secuencia donde el animal debe aprender una secuencia correcta de giros izquierda-derecha (Altman, y cols., 1990; Altman, y cols., 1989). Además se ha reportado la facilitación de la adquisición de la información en pruebas de memoria de corto plazo evaluada en el laberinto de Biel de piso firme tras el abatimiento de serotonina prefronto-cortical (Pérez-Vega, y cols., 2000). En esta prueba el animal debe aprender una ruta correcta entre varias T en secuencia hasta localizar un reforzador que se encuentra en un brazo final más largo que los demás. Sin embargo, en ambos trabajos los autores hicieron estas evaluaciones en presencia de señales ambientales de las cuales los animales podían hacer uso; de manera que no se trató de una evaluación específica de aprendizaje egocéntrico. En nuestro laboratorio evaluamos específicamente la capacidad de aprendizaje egocéntrico a ratas de 40 y 60 días de edad en el laberinto acuático de Morris tras el abatimiento de serotonina cerebral mediante la administración intracisternal de 5-7DHT a los 21 días de edad. En estos experimentos cuantificamos la adquisición de

información egocéntrica en el corto plazo y observamos una facilitación a los 60 días de edad en los animales con disminución de la serotonina cerebral (Olvera-Cortés, y cols., 2001). Así mismo, en el presente trabajo evaluamos el efecto de la disminución de la concentración de serotonina hipocampal específicamente sobre el aprendizaje egocéntrico espacial. Nuestros resultados muestran que los animales del grupo testigo redujeron significativamente su latencia de escape desde el segundo día de entrenamiento mientras que los animales del grupo control lo hicieron hasta el tercer día de entrenamiento. Por su parte los animales del grupo experimental no redujeron significativamente su latencia de escape ningún día de entrenamiento con respecto al primero (Ver figura R38). Lo que es más, éstos animales mostraron una búsqueda mayor en el cuadrante donde se encontraba la plataforma con respecto al cuadrante opuesto durante la prueba de transferencia, lo que indica que los animales establecieron una incipiente tendencia espacial (Ver figura R 39).

En el caso del grupo control en el cual se redujo moderadamente el contenido de serotonina hipocampal no observamos el efecto facilitador reportado en la literatura sino que incluso estos animales tardaron un día más que los animales testigo en reducir significativamente su latencia de escape (sin mostrar diferencias intergrupales), aunque su desempeño final fue semejante al de los animales testigo. Así, nuestros resultados no concuerdan con reportes previos donde se registró una facilitación sobre tareas con componentes egocéntricos luego de la disminución de la concentración de serotonina hipocampal (Altman, y cols., 1990; Altman, y cols., 1989; Pérez-Vega, y cols., 2000; Olvera-Cortés, y cols., 2001). Existen dos posibilidades que pueden explicar esta discrepancia: Primero, en el presente trabajo evaluamos la memoria espacial egocéntrica de largo plazo. Así, posiblemente los efectos facilitadores de la eliminación de la función serotoninérgica sobre pruebas egocéntricas se manifieste solamente en la codificación en el corto plazo a través de mecanismos trans-sinápticos que modificarían la función prefrontal como en el caso de los reportes en el laberinto

de Biel y en la prueba de aprendizaje egocéntrico de corto plazo realizada en nuestro laboratorio. Sin embargo en la prueba de Stone, la cual fue realizada para memoria de largo plazo, igualmente se reportó facilitación tras el abatimiento de serotonina hipocampal (Altman, y cols., 1990). Esto da lugar a la segunda explicación posible: dado que nuestro estudio es el único en el que los animales no contaban con señales espaciales alocéntricas para la resolución de la prueba, es posible que lo observado por los trabajos ya mencionados no se trate de una facilitación del aprendizaje egocéntrico sino que en las pruebas en las que se observa este efecto, las ratas tenían la posibilidad de hacer uso de señales espaciales, y que lo que ocurre es que posiblemente lo hagan más eficientemente tras la eliminación del sistema serotoninérgico a partir del procesamiento hipocampal (alocentrico) sin interferencia. Así, dado que en nuestro experimento los animales no tenían señales alocéntricas a las cuales recurrir (a excepción de la pared de la tina), no se presentó tal facilitación. Por otro lado, el que no se presentará la facilitación no significa que exista una deficiencia en el sistema egocéntrico de codificación de la información puesto que estos animales fueron perfectamente capaces de adquirir el aprendizaje muy posiblemente recurriendo a la codificación visual de la pared de la tina y la distancia con respecto a la plataforma puesto que en su prueba de transferencia y al igual que los animales testigo, no presentaron tendencias espaciales. Así, la disminución moderada de serotonina hipocampal no produjo una facilitación en el aprendizaje egocéntrico cuando éste fue evaluado en condiciones de aislamiento de señales alocéntricas y lo que es más los animales fueron capaces de establecer el aprendizaje egocéntrico de manera normal.

El grupo experimental por otro lado, presentó una incapacidad completa para realizar el aprendizaje egocéntrico. Como ya ha sido mencionado antes, este grupo mostró un incremento en la actividad serotoninérgica hipocampal. No existen reportes previos acerca de las consecuencias de incrementar la función serotoninérgica cerebral ni hipocampal sobre la capacidad de aprendizaje

egocéntrico. Nuestros resultados indican que al igual que con el aprendizaje de lugar, el incremento de serotonina hipocampal afectó adversamente esta capacidad pero en grado superlativo (Ver figura R38). De hecho estos animales no resolvieron el laberinto por medio de estrategias egocéntricas e incluso mostraron una débil pero significativa tendencia espacial en su prueba de transferencia (Ver figura R39) y sus latencias finales fueron significativamente mayores con respecto al grupo testigo y control (Ver figura R38).

Esto sugiere que la navegación egocéntrica fue interrumpida tras el incremento de la función serotoninérgica hipocampal y que los animales resolvieron la tarea tratando de utilizar el mapeo cognoscitivo, el cual constituye la solución menos eficiente (como lo demuestran nuestros resultados). Consecuentemente, las ratas no lograron la disminución significativa de latencia. Ya que la información visual disponible no les permitió el establecimiento exitoso de mapas, las ratas se limitaron a desplegar el nado sobre una amplia zona del laberinto que incluiría la plataforma, sin poder hacer la ubicación precisa de la misma que se lograría solo a través del procesamiento de la información egocéntrica disponible.

Si bien hasta la fecha es poco lo que se conoce acerca de la codificación egocéntrica del espacio, se ha propuesto que estructuras cerebrales como el estriado y el cerebelo podrían tener un papel preponderante en su organización (Hikosaka, y cols., 1998; Pascual-Leone, y cols., 1993; Molinari, y cols., 1997). No existen datos acerca de la participación hipocampal en la adquisición de éste tipo de información aunque se ha propuesto que la información egocéntrica podría ser estructurada en forma de mapas (Moghadam y Bures, 1996); y dado que el establecimiento de mapas espaciales lleva implícita la incorporación de información egocéntrica como parte de los mismos (Poucet, 1993). Tampoco se ha establecido si el aprendizaje egocéntrico puede ser realizado eficientemente en condiciones de lesión del hipocampo, ni si existen interacciones entre el hipocampo

y aquellos sistemas que se han propuesto como organizadores principales de ésta capacidad.

Por otro lado, se ha observado una estrecha relación entre la función serotoninérgica y el aprendizaje egocéntrico tanto tras la manipulación de la serotonina cerebral como tras la manipulación de la serotonina hipocampal (Altman, y cols., 1991; Altman, y cols., 1989; Pérez-Vega, y cols., 2000; Olvera-Cortés, y cols., 2001). Por tanto, el factor crucial en la navegación egocéntrica lo constituye el sistema serotoninérgico. Una explicación posible es que el sistema serotoninérgico constituya un modulador principal del o los sistemas de memoria encargados de la adquisición y procesamiento de información egocéntrica, y que su manipulación a diferentes niveles interfiera, por un lado con el procesamiento *per se* de dicha información y por el otro, con la integración egocéntrico/alocéntrico en la navegación de lugar. Desde ésta perspectiva, la manipulación de la serotonina cerebral interferiría con la organización primordial de la información espacial a nivel estriatal, mientras que la manipulación de la serotonina hipocampal interferiría con la integración de información alocéntrica-egocéntrica en la resolución de problemas espaciales.

Bajo éste punto de vista, en aquellas pruebas en las que estos tipos de estrategia son evaluadas independientemente una de otra, existe la posibilidad de que cada sistema realice de manera eficiente su función primordial, y solo cuando la interacción de ambos sistemas está implicada se observarían alteraciones en la resolución normal de una tarea. Así, solamente se ha observado facilitación “egocéntrica” cuando los animales son evaluados en pruebas con componentes egocéntricos pero mientras tienen la posibilidad de utilizar señales espaciales alocéntrica alternativamente. Mientras que, cuando esta posibilidad se restringe como en el caso de nuestro grupo control, no se observó tal facilitación, y la capacidad de aprendizaje egocéntrico se mantuvo intacta. Por otro lado el incrementar la función serotoninérgica hipocampal, como en el grupo experimental, impidió por completo el aprendizaje egocéntrico y la integración de

información egocéntrica en forma de mapas, y orilló al animal a recurrir a estrategias de mapeo allocéntrico que además de ser la solución menos adecuada al problema también son afectadas negativamente por el incremento de serotonina. Sin embargo esto último puede ser recapitulado bajo la perspectiva de la hipótesis mencionada, no como una alteración del aprendizaje de lugar sino como una alteración en la integración de la información egocéntrica en mapas, más que una deficiencia de aprendizaje de lugar: ya que los animales lograron establecerlo al nivel de los testigos. Esto enfatizaría el papel de la serotonina en la organización del aprendizaje egocéntrico a diferentes niveles (figura D1).

En resumen las deficiencias conductuales observadas en los tres grupos de animales entrenados obedecieron al siguiente comportamiento:

El abatimiento moderado de la serotonina hipocámpal no produjo efectos en el aprendizaje de lugar, produjo deficiencias moderadas en la consolidación del aprendizaje de señal y no produjo alteraciones en el aprendizaje egocéntrico; si bien tampoco produjo la facilitación sobre éste tipo de aprendizaje reportada en la literatura.

Por su parte, el incremento de la función serotoninérgica hipocámpal alteró la etapa inicial de adquisición en el aprendizaje de lugar, no alteró el aprendizaje de señales y evitó completamente el aprendizaje egocéntrico.

Nuestros resultados sugieren fuertemente la participación de la serotonina en:

- La organización de la información egocéntrica y una posible modulación cooperativa de la integración de información egocéntrica en mapas (durante la fase inicial del aprendizaje de lugar).
- La modulación cooperativa sobre el establecimiento de asociaciones estímulo-respuesta.

EVIDENCIA EXPERIMENTAL	Aprendizaje de lugar	Aprendizaje de señal	Aprendizaje egocéntrico
5-HT ↓ ACh ↓ cerebral	---	---	???
5-HT ↓ cerebral	===	===	+++ ^A
5-HT ↑ cerebral	---	--- en dosis muy altas	???
5-HT agonistas cerebral	--- 5-HT1B === 5-HT1A	???	???
5-HT ↓ hipocampal	===	???	+++ ^A
5-HT ↑ hipocampal	???	???	???
NUESTROS RESULTADOS			
5-HT ↓ hipocampal	===	===	===
5-HT ↑ hipocampal	B ---	===	BC ---

=, sin cambio
 +, facilitación
 -, deficiencia
 ==, desempeño inicial-medio-final

A Liberación hipocampal de la influencia egocéntrica
B Interacción alocéntrico/egocéntrico
C Desorganización del aprendizaje egocéntrico

En presencia de señales alocéntricas
 Sin señales alocéntricas

Figura D1. Resumen de los resultados conductuales reportados previamente y los obtenidos en el presente trabajo así como de la interpretación de los mismos (ver texto para explicación).

Con base en los resultados mismos y a la luz de la evidencia experimental previa, recopilamos lo siguiente: La disociación de sistemas de memoria propuesta por McDonald y colaboradores obedece al principio de inactivar la participación de cada uno de los sistemas y evaluar la repercusión conductual en pruebas que disocian cada una de las respuestas estratégicas posibles en la resolución de la tarea. A partir de sus resultados los autores proponen una disociación de la función hipocampal en el procesamiento de la información

espacial en mapas con respecto a un sistema de memoria encargado del procesamiento de las asociaciones estímulo-respuesta centrado en la función estriatal. Independientemente de que cada uno de estos sistemas funciona de manera paralela e independiente los autores proponen relaciones cooperativas y/o competitivas en el funcionamiento de ambos que estarían determinadas ulteriormente por la información de que el sujeto dispone en el ambiente. Con respecto al aprendizaje egocéntrico espacial existen muy pocos reportes sobre su posible regulación y naturaleza y no existen indicios acerca de su participación paralela en la codificación del espacio o de su interacción con el sistema hipocampal a pesar de que se ha postulado que es organizada a nivel estriatal como el aprendizaje de señales. Tampoco existen indicios de interacciones entre el aprendizaje de señales y el egocéntrico dado que comparten al estriado como área principal de organización.

Proponemos que:

- Mientas que el aprendizaje de lugar y el de señal pueden ser adquiridos paralela e independientemente por ambos sistemas, existe una relación cooperativa entre hipocampo y estriado, regido por la función serotoninérgica en la regulación del aprendizaje de señales.
- El aprendizaje egocéntrico requiere de la colaboración de ambos sistemas aparentemente mediante la modulación serotoninérgica de la integración de información egocéntrica en mapas a nivel hipocampal. Esta integración sería necesaria ya que se requiere una representación mental del espacio geométrico para moverse en el medio con base al propio movimiento, por lo menos hasta que se automatiza la ejecución de la respuesta, lo cual ocurriría con la participación cerebelar (Figura D2).

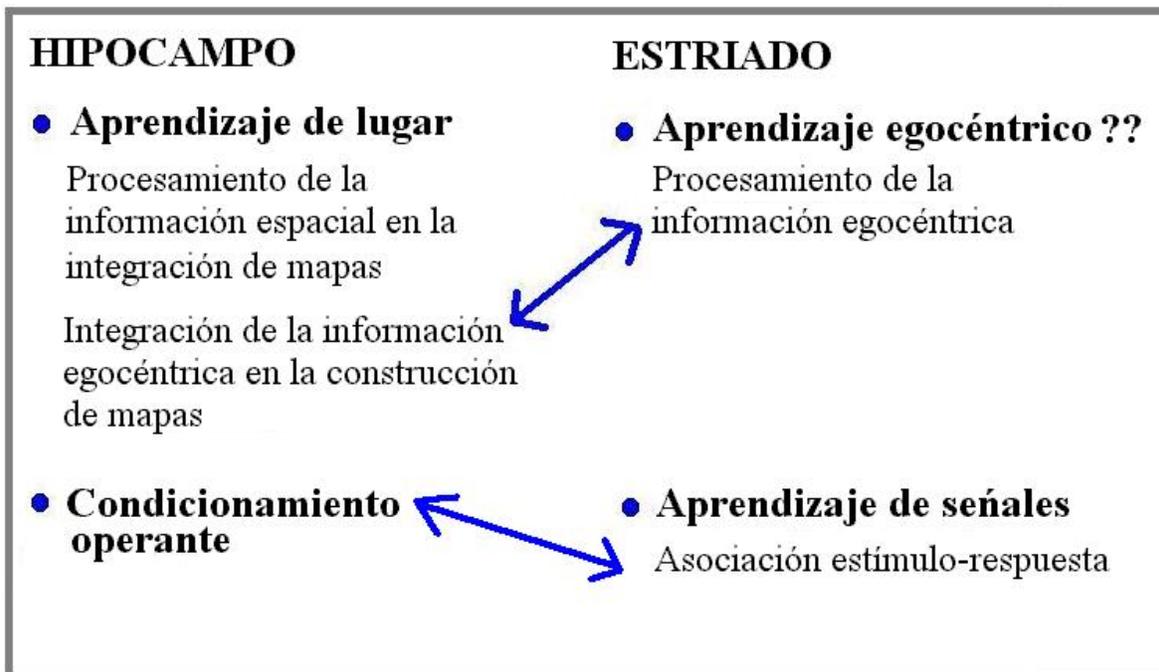


Figura D2. Interacción de los sistemas de memoria según las diferentes estrategias espaciales de resolución de la tarea: El estriado y el hipocampo interactúan estrechamente en la organización del aprendizaje egocéntrico.

Es poco probable que las diferencias intergrupales observadas en los diferentes tipos de entrenamiento espacial aplicado se deban a alteraciones de funciones que intervienen en el proceso de adquisición de información más que en la adquisición misma. Tales funciones son: alteraciones de la actividad exploratoria, alteraciones en el despliegue de estrategias exploratorias (las estrategias exploratorias que inicialmente se requieren para la adquisición de información espacial), alteraciones en el nivel de ansiedad que estos animales presentan, y; alteraciones en la locomoción. Se ha reportado que la serotonina participa en el control de la actividad locomotora y en la regulación de los estados de ansiedad (Fibiger y Campbell, 1971; Gerson y Baldessarini, 1980; Jacobs, y cols., 1977). El abatimiento del 90 al 97 % de serotonina cerebral produce incremento en la actividad locomotora evaluada en pruebas de campo abierto (Vanderwolf, y cols., 1989); sin embargo existen reportes de que el abatimiento de serotonina

cerebral mediante la lesión del núcleo del rafé produce la disminución de la actividad locomotora en un 57 % solamente en condiciones de alteración del sistema noradrenergico de neurotransmisión (Nilsson, y cols., 1988). Sin embargo, en nuestros resultados no observamos diferencias en la distancia recorrida (datos no mostrados) ni en la velocidad de nado (Ver figuras R7, R24 y R40) entre los tres grupos entrenados en aprendizaje de lugar, de señal o egocéntrico; lo que sugiere que la actividad locomotora en principio fue semejante entre los grupos y por el otro lado, que la disminución serotoninérgica ocurrió selectivamente al hipocampo en los grupos control y experimental, mismos que no mostraron un patrón semejante de desempeño en ninguna de las evaluaciones conductuales. Además utilizamos desipramina para proteger las terminales adrenergicas y noradrenergicas, y ha sido reportado que tal maniobra es suficiente para evitar las alteraciones en la actividad locomotora (Nilsson, y cols., 1988).

Con respecto a los niveles de ansiedad se ha reportado que la disminución de la serotonina hipocampal disminuye la ansiedad asociada con las condiciones aversivas, y que lo contrario ocurre con el incremento de serotonina (Hillegaart, 1991). Además la aplicación de agonistas 5-HT_{1A} en el hipocampo incrementa la ansiedad en las ratas (File, y cols., 1996). De acuerdo con estos reportes es posible que el grupo control presentara una ansiedad menor ante el estímulo aversivo que representa la situación dentro del agua en la tina, mientras que los animales experimentales experimentarían una disminución en la ansiedad que les produjo tal situación. Sin embargo, dado que no se presentó un patrón de alteraciones conductuales consistente para los animales controles y los experimentales, no se pueden explicar los hallazgos conductuales en función de dicha alteración en niveles de ansiedad. Esto es, los tres grupos controles deberían reflejar alteraciones en el desempeño conductual semejantes, relacionadas con una menor ansiedad (mayor eficiencia conductual), mientras que los grupos experimentales deberían presentar efectos relacionados con una mayor ansiedad (deficiencia conductual). Sin embargo el efecto dependió del tipo de estrategia evaluado.

Así, las diferencias de desempeño observadas en el presente trabajo aparentemente son resultado de la desorganización de los procesos de adquisición de información espacial. Con respecto a los factores exploración y ansiedad, una interferencia de ellos en el desempeño de la tarea es poco probable dado que no se observó un patrón semejante en ninguno de los otros grupos que recibieron el 5-7DHT, o ácido ascórbico y que tuvieron igualmente la concentración de serotonina hipocampal disminuida (Ver adelante). Este dato es importante, ya que revela un efecto del abatimiento de serotonina hipocampal diferente para la evaluación conductual dependiente del hipocampo, y las “no-dependientes”.

Electroencefalograma

Con respecto a la actividad eléctrica registrada concurrentemente al entrenamiento conductual, en el primer criterio de comparación (etapa y banda de frecuencia), los datos de PR de los animales testigo entrenados en la prueba de aprendizaje de lugar mostraron un patrón consistente de diferencias entre bandas en el que la potencia de las tres bandas consideradas fue significativamente diferente en las tres etapas conductuales evaluadas. La PR de la banda de alta frecuencia fue mayor con respecto a la de baja frecuencia en las tres etapas conductuales, y fue mayor durante la búsqueda con respecto a la basal y a la meta. Los animales del grupo control igualmente mostraron una mayor PR en la banda de alta frecuencia con respecto a la de baja frecuencia en las tres etapas conductuales, pero no fue diferente entre la búsqueda y la meta. La PR de la banda de alta frecuencia del grupo experimental, no fue mayor con respecto a la de baja frecuencia durante la etapa basal de registro, pero sí lo fue en las otras dos etapas conductuales y además fue mayor durante la búsqueda con respecto a la basal y la meta. El grupo experimental mostró una menor PR durante la búsqueda (45.62%) mientras que los grupos testigo y control mostraron una PR semejante (48.15% y

48.7% respectivamente) (Ver tabla R1). Esta diferencia aunque no significativa es de relevancia puesto que el grupo experimental mostró deficiencias leves en la parte inicial de la adquisición de la prueba conductual (Ver figura R5). Así, esta menor -aunque no significativa- PR en la banda de alta frecuencia podría estar relacionada con las deficiencias observadas en la ejecución conductual de estos animales.

Con este mismo criterio de comparación en la prueba de aprendizaje de señal, los animales del grupo testigo mostraron una mayor PR en la banda de alta frecuencia con respecto a las otras dos bandas en las tres etapas conductuales, mientras que no presentaron diferencias en la PR de la banda de alta frecuencia entre las tres etapas conductuales. Esto es interesante porque existe la posibilidad de que esta falta de diferencias entre basal, búsqueda y meta en la banda de alta frecuencia sea el reflejo de que estos animales no estaban haciendo uso del hipocampo durante la búsqueda de la plataforma visible ni hicieron uso de la información espacial cuando estaban sobre la plataforma.

Los animales del grupo control por su parte, además de no mostrar mayor PR de alta frecuencia durante la búsqueda con respecto a la basal y la meta, tampoco mostraron mayor actividad de alta frecuencia con respecto a la de baja frecuencia durante la búsqueda; esto es, la PR de baja y alta frecuencia fueron semejantes durante la búsqueda de la plataforma; estos animales además presentaron deficiencias durante el desempeño conductual (Ver tabla R2 y figura R22). De este modo, un segundo punto remarcable es que si bien no es necesaria una mayor actividad de alta frecuencia durante la búsqueda con respecto a la basal para que el aprendizaje de señal sea eficiente (como ocurrió con el grupo testigo) al parecer sí es necesaria una separación entre las bandas de baja y alta frecuencia durante la búsqueda para que el aprendizaje ocurra eficientemente.

Sin embargo, el grupo experimental mostró mayor PR en la banda de alta frecuencia durante las tres etapas conductuales con respecto a las otras dos bandas estudiadas y además mostró mayor actividad de alta frecuencia durante la

búsqueda con respecto a la basal y la meta. Estos animales fueron conductualmente eficientes. Además, este grupo mostró una tendencia a la facilitación conductual ya que disminuyó su latencia de escape significativamente desde el segundo día de entrenamiento, mientras que los animales testigo lo hicieron hasta el tercer día. Aunque esta misma tendencia se observó durante el aprendizaje inicial en el grupo control, no se observó una PR de alta frecuencia comparable a la búsqueda, probablemente por que estos últimos mostraron una deficiencia final del aprendizaje (Ver figura R22). Además, los animales del grupo control que fueron los menos eficientes conductualmente, también presentaron la menor PR en la banda de alta frecuencia (40.01%, mientras que el testigo tuvo 45.64% y el experimental 49.20%) (Ver tabla R2). Así, de manera semejante a lo ocurrido en la prueba de aprendizaje de lugar el grupo con la menor PR en la banda de alta frecuencia presentó deficiencias conductuales.

En la prueba de aprendizaje egocéntrico, los animales del grupo testigo mostraron una mayor actividad de alta frecuencia con respecto a las otras dos bandas en las tres etapas conductuales y una mayor PR de alta frecuencia durante la búsqueda con respecto a la basal y a la meta. Los animales del grupo control mostraron un patrón semejante al descrito para el grupo testigo. Mientras que los animales del grupo experimental no mostraron diferencias entre las bandas de baja y alta frecuencia durante la etapa basal y además mostraron mayor actividad de alta frecuencia durante la meta con respecto a la basal. Este último grupo presentó deficiencias conductuales severas e incluso una incipiente tendencia espacial, la cual podría estar relacionada con la mayor PR de la banda de alta frecuencia durante la etapa de meta que podría indicar el esfuerzo del animal por resolver la prueba mediante el uso de mapas. Además, cabe mencionar que la pérdida de diferencias entre la PR de las bandas de alta y baja frecuencia durante la etapa basal es semejante a lo ocurrido en los animales experimentales entrenados en aprendizaje de lugar que también presentaron deficiencias conductuales. Por último, de nuevo fue el grupo experimental de los tres entrenados en aprendizaje

egocéntrico, el que presentó la menor PR de alta frecuencia durante la búsqueda (46.86%, 47.14% y 45.37 para los grupos testigo, control y experimental; respectivamente) (Ver tabla R3).

Así la actividad de alta frecuencia presente durante el registro en la meta podría reflejar el esfuerzo de los animales por establecer la posición de la plataforma a partir de señales alocéntricas, mientras que la menor actividad con respecto a los otros grupos podría estar relacionada con el deficiente desempeño conductual.

Es importante señalar que los patrones observados parecen estar más relacionados con el desempeño conductual de cada tipo de prueba que con la manipulación experimental del sistema serotoninérgico. Este punto será discutido más ampliamente.

Hasta aquí, dos hechos deben ser recapitulados. Primero, los tres grupos conductualmente deficientes mostraron la menor PR de alta frecuencia durante la búsqueda (aprendizaje de lugar, grupo experimental; aprendizaje de señal, grupo control, y; aprendizaje egocéntrico, grupo experimental). Segundo, no hubo diferencias en la banda de alta frecuencia entre etapas para los animales entrenados en la prueba de aprendizaje de señales. Lo anterior pudo deberse a que no existe procesamiento predominante del hipocampo; sin embargo, sí fue necesaria una separación entre la banda de baja y alta frecuencia durante la búsqueda para que el procesamiento de esta información fuera eficiente.

El segundo criterio de comparación fue la potencia total en cada sub-banda de frecuencia con respecto al día de entrenamiento, de manera que cambios entre bandas y entre días por banda fueron considerados. En la prueba de aprendizaje de lugar observamos una separación de bandas bien definida, esto es; diferencias significativas entre las tres bandas para cada día de entrenamiento en el sentido de que la PR de la banda de alta frecuencia fue mayor que la PR de la banda de baja frecuencia, para los grupos testigo y control, mientras que el grupo experimental

no mostró ésta separación entre las bandas de baja y alta frecuencia los dos primeros días de entrenamiento, mismos en que su desempeño conductual fue deficiente con respecto al del grupo testigo; y durante el cuarto día (ver figuras R5, R9 y R11). De ésta manera podría existir una relación entre un patrón bien definido de bandas separadas (baja y alta frecuencia) y la eficiencia conductual, de manera que en aquellos días en que no alcanza a ser mayor la PR de alta frecuencia con respecto a la de baja frecuencia (tomando como conjunto las tres etapas conductuales) el desempeño conductual fue deficiente con respecto al de los animales testigo.

Aunque esta interpretación debe ser explorada, en apoyo a ésta hipótesis los animales entrenados en la prueba de aprendizaje de señales también mostraron una separación de bandas bien definida para el grupo testigo (días 1 al 5, ver figura R26) y experimental, pero no para el grupo control; mismo que presentó un desempeño conductual menos eficiente que los otros dos grupos. Sin embargo, debe mencionarse que en ninguno de los grupos entrenados en aprendizaje de señal el análisis de varianza reveló efectos significativos de ésta interacción y que el comportamiento de bandas antes descrito fue observado sobre las comparaciones pareadas.

Con éste mismo criterio de comparación, en la prueba de aprendizaje egocéntrico los animales del grupo testigo mostraron una separación bien definida de la PR de las tres bandas todos los días de entrenamiento, mientras que los animales del grupo control mostraron dicha separación todos los días excepto el primero, y; paralelamente, a éste grupo le tomó un día más que al testigo establecer una disminución significativa de latencias. El grupo experimental mostró un patrón fluctuante de separación de bandas de manera que alternó días de separación con días sin separación (Ver figura R42 a la R44) de la PR de las bandas de baja y alta frecuencia. Concomitantemente a ello, este grupo de animales no logró reducir significativamente sus latencias de escape. Sin embargo, de la misma manera que los animales entrenados en aprendizaje de señales, el análisis de

varianza correspondiente a estas comparaciones no fue significativo para los grupos testigo y experimental aunque sí para el grupo control, por lo que estos resultados deben manejarse de manera cauta como una tendencia. Pese a lo anterior, es notable el patrón repetitivo de pérdida de separación entre las bandas de baja y alta frecuencia durante malas ejecuciones conductuales en lo que respecta a las tres estrategias (Figura D3).

	Grupo	T	C	E
Aprendizaje		5HT	5HT ↓	5HT ↑
De lugar		BF < AF [*] eficiente	BF < AF eficiente	BF = AF deficiente
De señal		BF < AF eficiente	BF = AF deficiente	BF < AF eficiente
Egocéntrico		BF < AF eficiente	BF < AF eficiente	BF = AF deficiente

Figura D3. Resumen de los resultados obtenidos en la comparación entre las bandas de baja frecuencia alta frecuencia, con respecto a la eficiencia conductual de los animales. T, testigo; C, control (serotonina disminuida); E, experimental (Actividad serotoninérgica incrementada). BF, baja frecuencia; AF, alta frecuencia, *, significativamente mayor.

Por otro lado, esta falta de efectos en el análisis de varianza para el aprendizaje de señal y el egocéntrico puede obedecer a que estas dos estrategias no son organizadas predominantemente por el hipocampo aunque, como fue mencionado en la sección de discusión de los datos conductuales, una participación paralela del hipocampo en su organización puede ser postulada y es

en función de ella que podría proponerse que esta debilidad estadística obedece a la participación complementaria del hipocampo en estas pruebas. En otras palabras, si partimos del hecho de que esta separación de bandas propuesta se origina en el incremento de actividad de alta frecuencia y la disminución de la actividad de baja frecuencia existe una asociación repetida entre deficiencia conductual y mala separación de bandas a través de las tres pruebas conductuales. El que esta separación de bandas solo sea estadísticamente significativa en el caso del grupo de aprendizaje de lugar, pudo deberse a que éste aprendizaje depende netamente del hipocampo. Mientras tanto, en las otras dos estrategias la pérdida de separación de bandas podría reflejar la pérdida de interacción entre estrategias luego de la manipulación experimental a que fueron sometidos los animales. La significancia de los análisis de varianza en las estrategias extrahipocampales no sería dramática dado que reflejaría la participación paralela del hipocampo como lo plantea el punto de vista presentado previamente con respecto a los resultados conductuales.

Existen numerosas evidencias que correlacionan la actividad theta con respuestas orientadas de aproximación (Bures, y cols., 1967), en situaciones de transición ambiental (Green, y cols., 1990) y durante la adquisición y consolidación de información en memoria de trabajo y memoria episódica (Givens y Olton, 1994; Klimesh, y cols., 1996; Wiebe y Staübli, 2001; Raghavachari, y cols., 2001). Se ha propuesto que la actividad theta está relacionada con varias funciones independientes. Primero, como oscilación en gran escala en la red corteza entorrinal-hipocampo hace posible que las neuronas hipocampales sean activadas con la mínima cantidad de energía, dadas sus propiedades intrínsecas que están afinadas a frecuencias theta (Llinás, 1988; Leung y Yim, 1991; Ylinen, y cols., 1995). Segundo, la actividad theta incrementa la razón ruido-senal, silenciando la mayoría de las células principales y manteniendo sus potenciales de membrana cerca pero debajo del umbral. Como resultado, relativamente pocas aferentes

activas, ya sea de corteza entorrinal o fibras musgosas de células granulares, son suficientes para hacer disparar a las células principales (Buszaki, 1996).

En éste sentido los hallazgos derivados del presente estudio apuntan hacia una separación de bandas definida, como requisito para un procesamiento espacial óptimo, lo que podría estar relacionado con dicha razón ruido-señal. De esta manera, la separación de las bandas de baja y alta frecuencia significaría una mayor actividad theta de alta frecuencia asociada con una afinación y activación selectiva de aquellas neuronas principales (piramidales) relacionadas con la codificación de información.

Si bien solo la prueba de aprendizaje de lugar depende del procesamiento hipocampal, esta relación entre menor PR de alta frecuencia y deficiencia conductual se expresó en los tres tipos de entrenamiento. Esto no es de sorprender puesto que independientemente de la o las estrategias espaciales desplegadas por un animal en un ambiente determinado, las células principales del hipocampo presentan una fuerte correlación de su actividad con respecto a la posición que el animal ocupa dentro de la arena (O'Keffe y Dostrovsky, 1971; McNaughton, y cols., 1983); de manera que cada una de éstas células tiene una posición preferida y como población las células hipocampales parecen proporcionar una representación actualizada de la posición momentánea del animal en el espacio (Sharp y Green, 1994). Por otro lado, en redes neuronales gobernadas por una oscilación, la fase en la cual una célula dispara en relación a dicha oscilación puede codificar información (Hopfield, 1995). Se ha sugerido que tal modo de codificación de información ocurre en el hipocampo y sus células de lugar (Jensen y Lisman, 2000), de manera que el disparo de las células de lugar está relacionado con las redes de oscilación en frecuencias theta (7-12 HZ) en una manera compleja. Existe poco disparo de estas células cuando el animal está fuera del campo preferido de una célula; cuando el animal se mueve dentro de ese campo, el disparo de las células ocurre dentro de cada ciclo actividad theta hasta que el animal sale del mismo (Jensen y Lisman, 2000). Cuando el animal se mueve a través del campo, la fase de

disparo de la célula se va haciendo progresivamente más temprana sobre cada ciclo sucesivo de actividad theta, un fenómeno conocido como “presesión de fase theta” o “avance en la fase theta” (O’Keffe y Recce, 1993; Skaggs, y cols., 1996).

Así, la presencia de actividad theta en los tres tipos de entrenamiento correspondería a la codificación del espacio y la posición de la rata dentro del mismo, por lo que éste patrón de theta con mayor alta frecuencia durante la búsqueda podría estar relacionado con la codificación espacial adecuada en las tres pruebas mientras que solo existirían cambios relacionados con el aprendizaje en el grupo entrenado en aprendizaje de lugar. Esto último es lo que se observó con respecto al tercer criterio de comparación y se discutirá a continuación.

El tercer criterio de comparación de la actividad eléctrica hipocampal fue la interacción de los factores día/etapa/banda. De los animales entrenados en la prueba de aprendizaje de lugar; solamente el grupo testigo mostró un efecto significativo. La PR de la banda de baja frecuencia fue menor el quinto día de entrenamiento con respecto a la PR durante el registro basal, mientras que la PR de la banda de alta frecuencia fue mayor durante la búsqueda los días 3 y 5 de entrenamiento con respecto a la basal y durante la meta del quinto día de entrenamiento con respecto a la basal. Es importante mencionar que al inicio del entrenamiento no hubo diferencias entre etapas conductuales para cada banda de frecuencia y que fue con el transcurso del entrenamiento que la PR de cada etapa conductual sufrió modificaciones hasta mostrar las diferencias significativas antes descritas para la PR de las bandas de baja y alta frecuencia.

En éste sentido, se ha reportado que la expresión del ritmo theta hipocampal depende de manera estrecha de la clase de conducta desplegada por los animales y que los cambios en la conducta (conducta tipo 1 vs. conducta tipo 2) determinan cambios en la expresión de actividad theta, de manera que hay un incremento significativo en la actividad theta cuando el animal se desplaza, con respecto a la mostrada durante alerta inmóvil (Vanderwolf, 1988; Vanderwolf, y cols., 1989). En

el presente trabajo no se observaron éstas diferencias al inicio del entrenamiento, lo cual puede deberse a varias razones: 1) el registro realizado en el presente trabajo corresponde a una zona limitada en la región CA1 (electrodo bipolar concéntrico), además; 2) se tomó la potencia absoluta de la banda theta (4-12 Hz) y se calculó la potencia relativa para las tres sub-bandas definidas en el estudio. Los trabajos en los que se reporta un incremento de theta con el desplazamiento lo hacen considerando la potencia de theta durante inmovilidad y el cambio porcentual durante el desplazamiento (ej: inmóvil = 100, desplazamiento = X) (Vanderwolf, 1988; Vanderwolf, y cols., 1989). De ésta manera, el criterio de comparación es diferente por lo cual no era de esperarse que se reprodujeran dichos resultados.

Así, considerando que el cambio en actividad theta debido al tipo de conducta está implícito en el primer día de entrenamiento, las diferencias observadas en el grupo testigo entrenado en la prueba de aprendizaje de lugar, podrían estar relacionadas con la adquisición de la información espacial por parte de los animales. Sin embargo, y de ser así, lo mismo debería haber sido observado para el grupo control que tuvo un desempeño conductual semejante al grupo testigo. En este sentido, aunque el análisis de varianza para este criterio de comparación no fue significativo para los grupos control y experimental, las diferencias entre bandas mostraron un comportamiento semejante para el grupo control y no así para el experimental. Con la finalidad de remarcar estas diferencias entre bandas en los tres grupos se realizó la comparación de los datos a partir de bloques de dos días de entrenamiento para las bandas de baja y alta frecuencia; de esta manera, observamos que tanto el grupo control como el experimental, mostraron una mayor actividad de alta frecuencia durante la búsqueda con respecto a la basal. Además hubo una mayor actividad de alta frecuencia durante la meta con respecto a la basal en el grupo control, mientras que el grupo experimental no alcanzó a mostrar diferencias entre etapas para ninguna de las dos bandas.

Mientras que, resulta plausible una relación entre el desempeño conductual y la separación de bandas semejante a la propuesta en los criterios de comparación previos, es importante recalcar que esta ausencia de separación de bandas no impidió el desarrollo de mapeo cognoscitivo por parte de los animales del grupo experimental; por lo que una relación directa entre estos dos hallazgos parece poco probable. Sin embargo, dado que la modulación serotoninérgica de la conducta posee una naturaleza sutil (modulando a los sistemas de neurotransmisión que sostienen las capacidades cognoscitivas), que se ha reportado que toma relevancia sólo en condiciones de lesión del sistema colinérgico o en condiciones de incremento de la función serotoninérgica (el cual sería el caso de nuestro grupo experimental) y dado que las deficiencias conductuales son sutiles también; no puede descartarse *a priori* una relación entre dichas variables. Además, en éste criterio de comparación solamente los animales entrenados en el aprendizaje de lugar mostraron un patrón de separación de bandas surgido del aprendizaje de la prueba, por lo que estos cambios sutiles en la manifestación de la actividad eléctrica de baja y alta frecuencia podrían estar relacionados con el procesamiento óptimo de la información espacial por parte del hipocampo y, siendo así, no se observarían en ninguna de las otras dos pruebas conductuales dado que sin importar la participación cooperativa del hipocampo en la organización de ellas, el aprendizaje como tal no depende de manera preponderante del hipocampo, ni en el aprendizaje de señal, ni en el egocéntrico.

De acuerdo con lo anterior, mientras que una separación de bandas bien definida durante la búsqueda es suficiente y necesaria para un desempeño conductual eficiente en las pruebas de aprendizaje de señal y egocéntrico, el procesamiento eficiente del aprendizaje de lugar va acompañado de un incremento ulterior en la potencia de alta frecuencia muy posiblemente relacionado al procesamiento hipocampal de información espacial en forma de mapas.

Con la finalidad de observar la separación de bandas para cada una de las etapas conductuales se procedió a representarlas en un gráfico de líneas (Figura R16) de manera que la separación significativa entre baja y alta frecuencia pudiera ser establecida. En éste sentido los animales del grupo testigo mostraron una separación bien definida desde el primer día de entrenamiento entre ambas bandas durante la búsqueda, aunado a un progresivo incremento de la PR de la banda de alta frecuencia a lo largo de los días de entrenamiento. Por su parte, el grupo control mostró un patrón semejante de separación de bandas aunque el análisis de varianza para estas comparaciones no fue significativo. El grupo experimental además de que no mostró efectos significativos en el análisis de varianza, mostró una pérdida de la separación de bandas durante la etapa de meta, lo que podría estar relacionado con deficiencias en adquisición de la información durante esa etapa y consecuentemente en su desempeño (Véase la sección de conducta).

Esta separación de bandas relacionada con la adquisición de información fue explorada con relación al aprendizaje diario al comparar la diferencia entre la PR del registro basal y cada uno de los 4 ensayos de cada día de entrenamiento, bajo la premisa de que las diferencias entre basal y búsqueda originadas en el desempeño motriz están implícitas en el primer día de entrenamiento; entonces las diferencias relacionadas con el aprendizaje deberían surgir con el transcurso de los días. A este respecto los animales del grupo testigo mostraron una mayor PR de alta frecuencia con respecto al registro basal los días 3, 5 y 6 de entrenamiento (Ver figura R17), mientras que los animales del grupo control no mostraron incrementos con respecto a la basal ningún día de entrenamiento, si bien durante todos los días la PR de las bandas de baja y alta frecuencia fueron diferentes entre sí; mientras que, el grupo experimental mostró nuevamente una separación de bandas mal definida y ninguna diferencia entre basal y búsqueda en ningún día de entrenamiento. De esta manera, los cambios observados en el grupo testigo en la PR de alta y baja frecuencia parecen estar relacionados con el procesamiento eficiente de información por parte del hipocampo y la disminución de la

concentración de serotonina (en el grupo control) determina que estos cambios sutiles desaparezcan, pero no altera la separación de bandas ni el desempeño conductual; mientras que el incremento en la actividad serotoninérgica (grupo experimental), además de determinar la desaparición de los cambios relacionados con el procesamiento eficiente, altera la separación de bandas y el desempeño conductual concomitante. Ninguno de los grupos entrenados en aprendizaje de señal y egocéntrico mostró efectos sobre este criterio de comparación.

Los resultados anteriores demuestran entonces que solo los grupos testigo y control mostraron cambios en la actividad theta relacionados con el aprendizaje.

Existen reportes que indican una relación de la actividad theta hipocampal con las características del movimiento independientemente de la adquisición de información (White y Oulliete, 1997). En éste sentido, se han reportado asociaciones entre la frecuencia theta y la velocidad de nado así como cambios en la misma concomitantes a los cambios en velocidad (Stanwinska y Kasicki, 1998). Además, se ha reportado una relación entre la expresión de theta y la producción de movimiento voluntario *per se* (Oddie y Bland, 1998). Nuestros resultados mostraron que en ésta prueba de aprendizaje espacial los animales de los tres grupos estudiados mostraron un incremento significativo en la velocidad de nado (Ver figura R7). Sin embargo, ninguno de los resultados obtenidos en cuanto a la expresión de la actividad theta muestra una relación con dichos cambios de velocidad. De hecho, los animales del grupo experimental mostraron un incremento en la velocidad de nado desde el segundo día de entrenamiento que fue máximo para el cuarto día, a pesar de no haber mostrado cambios en la PR relativos al entrenamiento y a pesar de haber mostrado una menor PR en la banda de alta frecuencia (asociada con el desplazamiento); en las comparaciones intergrupales (Ver figura R20). Así, es improbable que los cambios de actividad theta observados en relación al aprendizaje de lugar se deban a las propiedades del movimiento durante la búsqueda de la plataforma; en cambio, se propone que

estos sean más bien debidos a un proceso activo de extracción de información contextual, eso si, durante el desempeño motor.

Mientras que, por una parte se ha encontrado que la actividad theta hipocampal muestra fuertes correlaciones con la actividad locomotora, también se ha demostrado su correlación con el aprendizaje. Igualmente, se ha propuesto que el rafe medial podría estar involucrado en la regulación tanto de la locomoción como de la memoria: esto es, bajo condiciones de poca o ninguna consecuencia para la rata, el rafe medial puede suprimir ambas funciones. Inversamente, estímulos significativos pueden, a través de algún mecanismo, inhibir al rafe medial liberando así la locomoción y activando la memoria. Interrupciones de largo plazo de la función del rafe medial -como la lesión experimental- podrían relegar a la rata a un estado en el cual esté muestreando constantemente su ambiente para satisfacer necesidades percibidas (Vertes, y cols., 1994). De acuerdo con ello, los animales experimentales entrenados en el aprendizaje de lugar tendrían una restricción de los mecanismos de activación de la memoria en función de la mayor actividad serotoninérgica.

El posible control dual del rafe medial sobre locomoción y estados de EEG hipocampal puede tener importantes consecuencias funcionales. Es obviamente crítico para la rata cuando se mueve a través de su ambiente captar aspectos relevantes de éste y transferirlos a la memoria. De aquí, el acoplamiento de la conducta motora con la actividad theta para codificar información durante el movimiento (Viana-Di-Prisco, y cols., 2002). Este punto de vista concuerda con la hipótesis de que la actividad theta de alta frecuencia es necesaria para codificar información espacial cualquiera que sea la estrategia usada y además para la adquisición de información en forma de mapas, proceso que estaría modulado por el rafe medial.

En las comparaciones intergrupales por banda y día de entrenamiento, los animales entrenados en la prueba de aprendizaje de lugar mostraron una mayor PR en la banda de baja frecuencia con respecto al grupo control, el segundo día de

entrenamiento y una menor PR en la banda de alta frecuencia con respecto a los otros dos grupos los días 2 y 4 de entrenamiento.

En la prueba de aprendizaje de señales los animales del grupo experimental mostraron una menor PR en la banda de baja frecuencia con respecto a los animales control los días 4 y 5 de entrenamiento mientras que en la banda de alta frecuencia mostraron una mayor PR con respecto al los animales control los días 3, 4 y 5 de entrenamiento (Ver figura R36). No hubo diferencias entre los grupos testigo y control ni entre el testigo y el experimental. En cambio, hubo una tendencia del grupo control a presentar menor actividad de alta frecuencia que sí fue significativa con respecto al grupo experimental, mismo grupo que fue conductualmente deficiente los últimos días de entrenamiento.

Los resultados de la prueba de aprendizaje de lugar y de aprendizaje de señal agregan un segundo elemento discutible a los datos obtenidos con respecto a la actividad eléctrica hipocampal tras la alteración de la transmisión serotoninérgica; y es que el efecto de la alteración de las concentraciones de serotonina sobre la actividad eléctrica hipocampal dependió de la modalidad de información a ser procesada y de la eficiencia conductual, más que de la alteración serotoninérgica. De esta manera, la disminución de serotonina hipocampal (grupo control) modificó el patrón de separación de bandas relacionado con el aprendizaje de lugar eficiente sin producir cambios intergrupales en la PR de alta frecuencia y sin alterar la conducta; mientras que en animales entrenados en aprendizaje de señales tal reducción de serotonina produjo una tendencia a la disminución de la actividad de alta frecuencia y a alteraciones conductuales. Por otro lado, el incremento de la actividad serotoninérgica derivado de la lesión con 5,7-DHT produjo una disminución de la PR de alta frecuencia asociada a deficiencias conductuales en el grupo entrenado en aprendizaje de lugar; mientras que no modificó la actividad eléctrica de los animales entrenados en el aprendizaje de señales que presentaron un desempeño conductual eficiente. En este mismo, sentido ninguno de los resultados farmacológicos, ni la disminución de la

serotonina ni el incremento de función serotoninérgica hipocampal alteraron la expresión de PR en los animales entrenados en la prueba de aprendizaje egocéntrico, a pesar de que esta prueba conductual fue la más severamente afectada. Así, la expresión y modulación de la actividad eléctrica hipocampal en las bandas de baja y alta frecuencia dependieron en mayor grado del tipo de información procesada por el animal en la resolución de una prueba conductual, que de la alteración de la transmisión serotoninérgica.

Se ha reportado que la inactivación farmacológica del núcleo del rafo medial o bien el bloqueo farmacológico de la actividad serotoninérgica cerebral son suficientes para producir trenes continuos de actividad theta sin importar el estado conductual del animal. Además, se ha observado que el núcleo del rafo es el único capaz de desincronizar la actividad theta hipocampal (Vertes, 1986; Vinogradova, 1995; Vertes, y cols., 1994). Assaf y Millar (1978) demostraron que la estimulación del rafo medial desincroniza al EEG hipocampal e interrumpe la descarga rítmica de células septales que son el marcapasos de la actividad theta (Vertes, y cols., 1994; Assaf y Millar, 1978). La efectividad para producir actividad theta luego de estimulación septal aumenta significativamente a partir de la destrucción de las fibras serotoninérgicas ascendentes (McNaughton, y cols., 1980). Varios reportes indican que el abatimiento de serotonina cerebral tras la administración de PCPA o 5,7-DHT da como resultado la aparición continua de ritmo theta durante inmovilidad conductual en un porcentaje de los animales evaluados (Vanderwolf y Baker, 1986; Vertes, y cols., 1994; Mushiake, y cols., 1988). En éste sentido nuestros resultados electroencefalográficos concuerdan con los resultados neuroquímicos en los animales entrenados en la prueba de aprendizaje de lugar en los que obtuvimos una exacerbación de la actividad serotoninérgica a partir del incremento de su velocidad de utilización. Consecuentemente, la actividad theta de alta frecuencia se vio disminuida posiblemente como resultado de esta actividad incrementada de la función serotoninérgica hipocampal. En contraste, esto no ocurrió en los animales

experimentales entrenados en la prueba de aprendizaje de señal o egocéntrico, lo cual sugiere que no es simple la relación entre la modificación de serotonina hipocampal y la expresión de la actividad theta y que la mayor influencia sobre la actividad theta la tiene el tipo de información procesada.

Por el otro lado, los animales de los grupos control en los que se observó una disminución del 50% en el contenido de serotonina hipocampal no mostraron alteraciones en su actividad theta, ni trenes continuos de theta; como ha sido reportado que ocurre tras el abatimiento de serotonina cerebral o la inactivación del rafe medial. Por ejemplo, se ha observado que la inactivación de células serotoninérgicas del rafe medial tras la aplicación de agonistas 5HT_{1A} produce un incremento en la amplitud de la actividad theta asociada con un incremento en la velocidad de descarga de la interneuronas hipocampales en ratas, durante una conducta de abastecimiento de alimento (Nitz y McNaughton, 1999). Sin embargo, en estos experimentos la disminución de serotonina fue general a todas las regiones cerebrales inervadas por el rafe medial. La liberación de serotonina en el hipocampo causa la reducción en la amplitud del EEG y la supresión de la actividad punta- onda espontánea, mientras que aumenta la excitabilidad de las células granulares dentadas a la estimulación aferente extrínseca (Richter-Levin y Segal, 1990), lo que se ha encontrado compatible con el papel de regulador del nivel de activación cerebral atribuido a la serotonina (Baumgarten, 1993). Así mismo, estos resultados son compatibles con la reducción de actividad de alta frecuencia observada en nuestros animales experimentales tras el incremento en la actividad serotoninérgica hipocampal, pero no con los resultados de los otros dos tipos de entrenamiento.

Estas discrepancias podrían deberse a que en los experimentos mencionados que apuntan a un efecto des-sincronizador de la serotonina del rafe medial sobre la actividad eléctrica hipocampal, han realizado la inactivación específica del núcleo del rafe o la interferencia de la función de la serotonina cerebral, alterando la innervación en el todo sistema sincronizador ascendente, por lo que dicha

desincronización puede deberse a la influencia de la serotonina sobre cualquiera de los puntos de relevo en ésta vía, ya sea a nivel del área septal medial (donde se lleva a cabo la modulación de la potencia), a nivel del complejo núcleo hipotalámico posterior/núcleo supramamilar (donde se lleva a cabo la modulación de la frecuencia), o bien desde el marcapaso original de dicha actividad en el núcleo pontis oralis (Bland y Oddie, 1998). Esta modulación ocurre a partir de que los centros de proyección colinérgica (núcleo basal de Meynert, banda diagonal, núcleo preóptico magnocellular y núcleo septal medial) reciben aferentes serotoninérgicos, por lo que se ha sugerido que la serotonina es capaz de modular la actividad de las neuronas colinérgicas septales (Baumgarten, 1993). Aún no se conoce la relación exacta de las terminales axónicas serotoninérgicas con las células colinérgicas; sin embargo, ésta podría comprender contactos somáticos, axodendríticos directos o relaciones indirectas a través de interneuronas (Baumgarten, 1993). Estudios inmunohistoquímicos revelan arreglos de terminales axónicos serotoninérgicos peri-celulares dentro del área septal de gatos y ratas (Törk, 1990; Gall y Moore, 1984). De ésta manera los aferentes serotoninérgicos al cerebro anterior parecen restringir tónicamente la actividad colinérgica en el hipocampo y la neocorteza, dado que la destrucción selectiva de proyecciones serotoninérgicas por medio de la inyección local de 5,7-DHT en el rafé rostral causa un incremento en el recambio de acetilcolina en la neocorteza (lesionando rafé dorsal o medial) y en el hipocampo (después de lesionar el rafé medial) (Robinson, 1983).

En nuestros experimentos produjimos alteraciones de la función serotoninérgica a nivel hipocampal exclusivamente. No existen reportes previos acerca de las consecuencias electroencefalográficas de la manipulación de la serotonina hipocampal específicamente. En ese sentido, nuestros resultados muestran que la disminución de serotonina en el hipocampo no alteró la actividad theta, mientras que el incremento de la actividad serotoninérgica hipocampal en el grupo experimental produjo la disminución de PR en la banda de alta frecuencia solamente en los animales entrenados en la prueba de aprendizaje de lugar. Así

mismo, nuestros resultados muestran que los efectos de la modulación serotoninérgica sobre el hipocampo propio no son semejantes a lo que ocurre tras el abatimiento general de serotonina cerebral ni en forma ni en magnitud, lo que se explica por que la modulación serotoninérgica sobre el septo medial y las áreas sincronizadoras de la formación reticular no fueron afectadas. De acuerdo con esto, Vinogradova y colaboradores registraron la actividad espontánea del hipocampo durante theta persistente (inactivando el rafe medial) o durante completa ausencia de theta (inactivando el septo medial) y evaluaron los cambios en las respuestas sensoriales hipocampales en estos dos estados (Vinogradova, y cols., 1999). El bloqueo del rafe medial produjo una liberación de la actividad neuronal hipocampal y la transformación del ritmo theta después de la estimulación o bloqueo del rafe medial ocurre a nivel de neuronas del septo medial, lo que es reflejado secundariamente en el EEG y en la actividad neuronal del hipocampo (Assaf y millar, 1978; Vinogradova, y cols., 1999; Kinney, y cols., 1996).

Se ha propuesto que existe una disociación bioquímica de la actividad theta hipocampal, de manera que durante la ocurrencia de conductas tipo uno (como el nado) la actividad theta es producida por la activación conjunta de los sistemas colinérgico y serotoninérgico; si alguna de ellas es inactivada experimentalmente, la segunda actuará sola para producirlo. Incluso se ha llegado a postular una dicotomía en la que la actividad theta de baja frecuencia tendría naturaleza colinérgica y la actividad theta de alta frecuencia estaría sustentada por actividad serotoninérgica (Vanderwolf, 1988). Se ha postulado que el papel de la serotonina procedente del rafe medial es generar la actividad theta asociada con conductas tipo 1 e inhibir la actividad theta asociada con conductas tipo 2 en animales alertas (Vanderwolf, 1988). Nuestros resultados muestran que una disminución del 50 % de la serotonina hipocampal (grupo control) no produjo alteraciones en la actividad theta en ninguna frecuencia, lo que estaría en contra de tal dicotomía. Por otro lado, el incremento de la actividad serotoninérgica (grupo experimental), sí fue capaz de disminuir la actividad theta de alta frecuencia, lo que estaría a favor

de un papel des-sincronizador para la serotonina hipocampal, de acuerdo con los hallazgos reportados otros autores (Vertes, 1986; Vertes, y cols., 1994; Vinogradova, y cols., 1999). Sin embargo, de ser esto así, los animales del grupo control deberían haber mostrado una mayor actividad theta tras la liberación de la influencia des-sincronizadora de la serotonina, lo que no ocurrió. Esto pudo deberse a que la disminución de la serotonina hipocampal no fue lo suficientemente grande como para alterar la regulación del theta hipocampal, lo cual explicaría la ausencia de cambios en el aprendizaje de lugar de mapeo de estos animales. Por otro lado, los estudios que postulan la capacidad desincronizadora de la actividad serotoninérgica y la manifestación de trenes continuos de theta al inactivar la actividad del núcleo accumbens no son específicos para la función serotoninérgica hipocampal como lo sugieren los resultados del presente trabajo, por lo que se refuerza la idea antes mencionada en el sentido de que dichos efectos estarían mediados por otras regiones de relevo como los componentes del sistema sincronizador ascendente.

Se ha propuesto que la serotonina es importante para la activación del EEG hipocampal y neocortical en ratas sujetas a inhibición de la transmisión colinérgica por atropina o escopolamina [actividad neocortical rápida de bajo voltaje (LVFA) y actividad hipocampal rítmica lenta (RSA) resistente a atropina durante conductas voluntarias tipo 1] (Vanderwolf, 1988). Alteraciones de la transmisión serotoninérgica a través de la inhibición prolongada de la síntesis (con dosis repetidas de PCPA) o destrucción de las proyecciones serotoninérgicas ascendentes (por aplicación intracerebral de 5,7-DHT) en ratas tratadas con escopolamina evita que ocurra LVFA y RSA resistentes a atropina durante la conducta voluntaria (Vanderwolf, y cols., 1990). Sin embargo; la hipótesis de que existen dos tipos de theta, uno de ellos dependiente de serotonina, presenta varios problemas: El primer resultado problemático es la demostración de que el abatimiento severo de serotonina sola no produce por sí mismo ninguna reducción en la cantidad de theta (Staübli y Xu, 1995, Streckler y Sargal, 1995).

Vinogradova y colaboradores sugieren que la actividad theta puede ser considerada como un filtro selectivo, para el proceso y registro de información y simultáneamente protege de la interferencia de otros estímulos que aparecen durante tal procesamiento (Vinogradova, y cols., 1999). Dichos autores propusieron que la actividad theta participa en la atención selectiva como la función hipocampal principal y como base para la formación del trazo de memoria. En condiciones normales las características de la actividad theta dependen de los mecanismos colinérgicos del septo medial que controlan parcialmente su expresión (amplitud) pero no su frecuencia (Brazhnik, y cols., 1993). Esta importante regulación depende de las estructuras reticulares distribuidas en el tallo cerebral que controlan tanto el nivel de expresión (amplitud) como la frecuencia a través de su influencia sobre el septo medial. El control dinámico del theta ocurre con la participación del rafe medial, el cual es probablemente la única estructura que lo desincroniza (Vertes, 1986; Vertes y Kocsis, 1997).

En resumen los resultados de nuestros experimentos electrofisiológicos arrojaron las siguientes conclusiones parciales:

- La actividad theta hipocampal durante el entrenamiento conductual depende principalmente del tipo de información procesada.
- La codificación eficiente del espacio, sin importar el tipo de estrategia, requiere de la separación de las bandas de baja y alta frecuencia durante el entrenamiento.
- Solo en la prueba de aprendizaje de lugar existió un incremento ulterior en la PR de alta frecuencia con el curso del entrenamiento que se relaciona con un desempeño óptimo.
- Estos cambios relacionados con el aprendizaje de lugar no tuvieron relación alguna con las características del movimiento desplegado por los animales.
- El efecto de la manipulación serotoninérgica sobre la actividad theta hipocampal dependió del tipo de estrategia de manera que solo los animales

entrenados en la prueba de aprendizaje de lugar mostraron disminución de PR de alta frecuencia asociada al incremento de serotonina.

- La disminución de serotonina no produjo incremento de la actividad theta.
- Los efectos reportados en la literatura sobre la desincronización de la actividad theta por parte de la serotonina no se observaron en todos los casos de incremento de la función serotoninérgica probablemente debido a que este efecto es mediado por el área septal misma que no sufrió modificaciones serotoninérgicas en nuestro estudio.
- Nuestros resultados no apoyan la existencia de una modalidad de actividad theta hipocampal dependiente de serotonina.

Citoarquitectura

Con respecto a las modificaciones en la citoarquitectura neuronal de las células piramidales del campo CA1 hipocampal, derivadas de las modificaciones en el patrón de innervación serotoninérgica; los resultados mostraron una menor densidad total de espinas para los grupos control y experimental con respecto al testigo, sin existir diferencias entre estos dos grupos (Ver figura R52); sin considerar el tipo de dendrita. Con respecto al tipo de espinas dendríticas, consideradas en el estudio, encontramos que los grupos control y experimental mostraron una mayor proporción de espinas gordas con respecto al grupo testigo. Además, mientras que el grupo testigo tuvo una mayor proporción de espinas en hongo con respecto a las espinas gordas, ninguno de los grupos control y experimental mostró diferencias entre estos dos tipos de espinas (Ver figura R53).

En el Cuerno de Ammón y el giro dentado -donde las sinapsis serotoninérgicas sobre dendritas de células piramidales y granulares son escasas- se ha sugerido la acción extrasináptica de la serotonina a través de varicosidades (Morilak, y cols., 1993; Oleskevich, y cols., 1991). Además, se ha reportado que la

serotonina modula la actividad hipocampal a través de sus efectos sobre una subpoblación de interneuronas sobre las que ejerce un efecto inhibitorio neto (Segal, 1990; Halasy, y cols., 1992). Como fue mencionado antes, la disminución de la serotonina hipocampal ha sido asociada a una mayor frecuencia de actividad de interneuronas hipocampales (Nitz y McNaughton, 1999, Baumgarten, 1993). Las interneuronas hipocampales en canasta y biestratificadas inhiben el soma y las dendritas intermedias de neuronas piramidales respectivamente (Ali, y Thomson, 1998). Así, la disminución de serotonina hipocampal podría producir una mayor inhibición de neuronas principales, mientras que el incremento de la función serotoninérgica hipocampal podría producir el efecto opuesto.

Dado que las espinas son el sitio de contacto excitador por excelencia y que prácticamente todas las espinas tienen sinapsis glutamatérgicas (Gray, 1959), la disminución de la densidad de espinas dendríticas sería un indicador de disminución de sitios de contacto excitador en los grupos control y experimental. Sin embargo, y dado que la disminución de serotonina estaría asociada a un incremento en la excitabilidad, mientras que el aumento de serotonina lo estaría a una mayor inhibición por parte de la serotonina, los resultados en ambos grupos parecen contradictorios.

En el caso de los animales control la mayor excitabilidad conduciría a incrementos en el calcio citosólico que determinarían la desaparición de espinas dendríticas. En éste sentido el incremento de calcio citosólico puede promover tanto una extensión como un encogimiento de las espinas, lo que explicaría los aparentemente contradictorios resultados de inhibición o incremento de excitación sobre la morfología de la espina (Segal, 2001). Es probable que en algunas condiciones experimentales la actividad excitadora resultante sea tan intensa que incremente el contenido de calcio citosólico a concentraciones tales que conduzcan al encogimiento de las espinas y su eventual desaparición (Drakew, y cols., 1996; Harris, 1999). Con respecto al grupo experimental, la mayor inhibición resultante del incremento en la función serotoninérgica podría estar asociada con la falta de

estimulación sobre espinas funcionales; nuestros resultados no concuerdan con evidencias de la proliferación de espinas cuando las sinapsis son globalmente silenciadas (Harris, 1999). Sin embargo, dado que la mayor inhibición en este grupo no involucró pérdida de entradas excitadoras sino, solamente una mayor inhibición sobre las entradas excitadoras existentes, la falta de actividad pudo condicionar la desaparición de aquellas espinas que dejaron de percibir actividad presináptica como resultado de la inhibición exacerbada.

Con respecto a la mayor proporción de espinas gordas, los animales experimentales podrían haber disminuido la proporción de espinas en hongo a favor de las espinas gordas debido a la falta de actividad puesto que ha sido reportado que la activación de las espinas puede producir cambios en la forma de las espinas, en el sentido de que activación mayor produce espinas en hongo y largas mientras que menor activación podría conducir a la transformación de estas espinas en espinas gordas (Harris, 1999^a). Mientras que de igual manera una activación elevada que conduce al LTP sostenido durante largo tiempo de igual manera puede producir la transformación de espinas eficientes –en hongo, o largas- en espinas gordas como un mecanismo para disminuir la excitabilidad de la entrada sináptica (Harris, 1999^a).

De ésta manera, ambos grupos control y experimental mostraron una disminución en la densidad de espinas y una proporción mayor de espinas menos eficientes en la transmisión del impulso nervioso, pero a partir de cambios opuestos en la excitabilidad de las neuronas. Sin embargo, es importante recalcar que la modulación de la actividad eléctrica hipocampal dependió de manera predominante de la información procesada por el hipocampo por lo que no es posible establecer relaciones causales directas entre estas modificaciones estructurales y los patrones de actividad eléctrica observados en los animales, concomitantes al desempeño de las tareas conductuales. Sin embargo, este cambio de espinas más eficientes a espinas menos eficientes es un indicador de una menor

eficacia en la transmisión sináptica puesto que se ha postulado que las espinas que tienen cuellos cortos -como las gordas- son menos proclives de sufrir LTP, dado que sus concentraciones de calcio se disipan rápidamente (Majewska, 2001). Además, espinas de cabeza más grande pueden generar mayores corrientes sinápticas que las espinas de cabeza pequeña como es el caso de las espinas en hongo (Majewska, 2001), pues existe una relación directa entre el volumen de la cabeza de la espina y el número de vesículas presinápticas ancladas (Schicorski y Stevens, 1999). Así, el volumen de la cabeza directamente refleja la fuerza de la sinapsis (Majewska, 2001). Las espinas de las células de CA1 representan solo compartimientos de difusión y no eléctricos (Sabatini, y cols., 2001); el influjo de calcio en neuronas piramidales ocurre principalmente a través de canales NMDA cuya activación está asociadas al LTP (Murtha y Pappas, 1994; Riekkinen, y cols., 1990). Así, ambos grupos presentarían una menor probabilidad de sufrir LTP el cual se sabe, se produce preferentemente con estimulación que sigue el patrón de actividad theta (Vinogradova, 1995) de manera que existe una posible relación entre menor proporción de espinas eficientes, menor actividad theta de alta frecuencia (siempre que hubo pérdida de la separación de bandas) y menor capacidad de producción de LTP, en relación con el desempeño conductual deficiente tanto en animales control como en animales experimentales.

DISCUSIÓN GENERAL

Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican por un lado que la serotonina está fuertemente involucrada en la modulación de los tres tipos de aprendizaje evaluados, pero que esta modulación involucra la actividad theta hipocampal solamente en las pruebas de aprendizaje de lugar (que depende del hipocampo) y aprendizaje de señal (que ocurre con participación hipocampal). En ambas pruebas hubo una modificación en la expresión de la actividad theta luego de la alteración de la actividad serotoninérgica asociada al desempeño conductual deficiente (Ver figura D4). De manera que en la prueba de aprendizaje de lugar solamente el incremento de la función serotoninérgica alteró el patrón de actividad theta (disminuyó la actividad de alta frecuencia y aumentó la de baja frecuencia) y produjo deficiencias en la adquisición de la información por parte de los animales, aunque solo en la etapa temprana del entrenamiento. En la prueba de aprendizaje de señal, la disminución moderada de la concentración de serotonina hipocampal (grupo control) produjo deficiencias en la ejecución de la prueba (en los últimos días de entrenamiento) de manera que aunque lograron realizar el aprendizaje no lo hicieron al mismo nivel que los testigo, concomitantemente en estos animales la disminución de serotonina hipocampal produjo modificaciones del patrón de actividad theta (disminución de actividad de alta frecuencia e incremento de la actividad de baja frecuencia) que aunque no fue significativo con respecto al grupo testigo si lo fue con respecto al grupo experimental (cuya conducta no fue alterada), mientras que entre estos últimos no hubo diferencias (Ver figura D4). Por último los animales entrenados en la prueba de aprendizaje egocéntrico mostraron deficiencias solamente como resultado del incremento de la función serotoninérgica (grupo experimental) y estas deficiencias no estuvieron relacionadas con la actividad theta concomitante a la ejecución de la prueba ya que no mostraron modificaciones del patrón de actividad theta. Así parece existir

una relación entre el patrón de actividad theta y el desempeño conductual solamente en aquellas pruebas que involucran la codificación alocéntrica del espacio (aprendizaje de lugar y de señal). Lo interesante aquí es que la maniobra experimental que altero el patrón de actividad eléctrica y el desempeño conductual fue diferente en los dos tipos de aprendizaje, esto es, en el aprendizaje de lugar el incremento de la función serotoninérgica, mientras que, en aprendizaje de señal la disminución de la concentración de serotonina hipocampal; pero en ambos casos la alteración del patrón de actividad eléctrica fue semejante. Así, parece haber una estrecha relación entre la eficiencia conductual y el patrón de actividad theta, mientras que el efecto de la manipulación del sistema serotoninérgico dependerá fuertemente del tipo de información procesada.

	Grupo	T	C	E
		5HT	5HT ↓	5HT ↑
Aprendizaje				
De lugar		BF AF eficiente	BF = AF = eficiente	BF ↑ AF ↓ deficiente
De señal		BF AF eficiente	BF ↑ AF ↓ deficiente	BF = AF = eficiente
Egocéntrico		BF AF eficiente	BF = AF = eficiente	BF = AF = deficiente

Figura D4. Relación entre la PR de las bandas de baja y alta frecuencia y el desempeño conductual, para cada tipo de entrenamiento y grupo de experimentación. =, sin cambio; flecha hacia arriba, incremento; flecha hacia abajo, disminución.

Al incorporar los resultados de la evaluación morfológica observamos que en ambos grupos, control y experimental existieron modificaciones semejantes como producto de dos alteraciones opuestas en la función serotoninérgica y que concomitantemente, las alteraciones en el patrón de actividad eléctrica en estas dos manipulaciones opuestas de la función serotoninérgica también fueron semejantes. De lo anterior se desprende la idea de que una vez que las modificaciones estructurales y electrofisiológicas como resultado de la manipulación experimental del sistema serotoninérgico han tenido lugar, es la naturaleza de la información procesada la que determinará el resultado conductual final observado, y que, las deficiencias conductuales están relacionadas con la expresión del patrón de actividad theta solamente cuando involucran la codificación aloclétrica del espacio.

CONCLUSIONES

Conducta

- El abatimiento moderado de la serotonina hipocampal no produjo efectos en el aprendizaje de lugar, produjo deficiencias moderadas en la consolidación del aprendizaje de señal y no produjo alteraciones en el aprendizaje egocéntrico; si bien tampoco produjo la facilitación sobre éste tipo de aprendizaje reportada en la literatura.
- El incremento de la función serotoninérgica hipocampal alteró la etapa inicial de adquisición en el aprendizaje de lugar, no alteró el aprendizaje de señales y evitó completamente el aprendizaje egocéntrico.

Nuestros resultados sugieren fuertemente la participación de la serotonina en:

- La organización de la información egocéntrica y una posible modulación cooperativa de la integración de información egocéntrica en mapas (durante la fase inicial del aprendizaje de lugar).
- La modulación cooperativa sobre el establecimiento de asociaciones estímulo-respuesta.

Electroencefalograma

- La actividad theta hipocampal durante el entrenamiento conductual depende principalmente del tipo de información procesada.

- La codificación eficiente del espacio sin importar el tipo de estrategia requiere de la separación de las bandas de baja y alta frecuencia durante el entrenamiento.
- Solo en la prueba de aprendizaje de lugar existió un incremento ulterior en la PR de alta frecuencia con el curso del entrenamiento que se relaciona con un desempeño óptimo.
- Los cambios electroencefalográficos relacionados con el aprendizaje de lugar no tuvieron relación alguna con las características del movimiento desplegado por los animales.
- El efecto de la manipulación serotoninérgica sobre la actividad theta hipocampal dependió del tipo de estrategia, de manera que solo los animales entrenados en la prueba de aprendizaje de lugar mostraron disminución de PR de alta frecuencia asociada al incremento de serotonina.
- Los efectos reportados en la literatura sobre la desincronización o sincronización de la actividad theta hipocampal luego de la manipulación serotoninérgica cerebral no se observaron en el presente trabajo, probablemente debido a que este efecto es mediado por el área septal misma que no sufrió modificaciones serotoninérgicas en nuestro estudio.
- Nuestros resultados no apoyan la existencia de una modalidad de actividad theta hipocampal dependiente de serotonina.

Citoarquitectura

- Tanto el incremento como la disminución de la serotonina hipocampal produjeron una menor densidad de espinas dendríticas y una disminución proporcional de espinas en hongo, ambos cambios indicadores de una menor eficacia sináptica.

CONCLUSIÓN GENERAL

La modificación de la función serotoninérgica hipocampal produjo deficiencias en el desempeño de las tres pruebas de aprendizaje espacial. Las consecuencias conductuales de la modificación funcional de la serotonina hipocampal dependieron de la naturaleza de la información procesada, de manera que la disminución de serotonina hipocampal produjo deficiencias en el aprendizaje de señal, mientras que el incremento de la actividad serotoninérgica produjo deficiencias en la prueba de aprendizaje de lugar y egocéntrico. Estas deficiencias conductuales estuvieron relacionadas con el patrón de actividad theta solamente en las pruebas que requieren codificación alocéntrica del espacio (aprendizaje de lugar y de señal). En estas pruebas, sin importar el sentido de las modificaciones de la función serotoninérgica, las alteraciones en el patrón de actividad theta relacionadas con la ejecución conductual deficiente tuvieron el mismo sentido (disminución de la actividad theta de alta frecuencia e incremento de la actividad theta de baja frecuencia), de manera que el patrón de actividad theta y el desempeño conductual estuvieron estrechamente relacionados. Finalmente, las consecuencias funcionales de la manipulación del sistema serotoninérgico hipocampal dependen de la naturaleza de la información procesada.

REFERENCIAS

1. Albert, S.M. Cognitive and neurobiologic markers of early Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93:13547-13551, 1996.
2. Ali, A.B., Thomson, A.M. Facilitating pyramid to horizontal oriens-alveus interneurone inputs: dual intracellular recordings in slices of rat hippocampus. *J. Physiol.*, 507:185-199, 1998.
3. Altman, H.J., Ögren, S.O., Berman, R.F., Normile, H.J. The effects of p-chloroamphetamine, a depletory of brain serotonin, on the performance of rats in two types of positively reinforced complex spatial discrimination tasks. *Behav. Neural. Biol.*, 52:131-144, 1989.
4. Altman, H.J., Normile, J. H., Galoway, P. M., Ramírez, A. and Azmitia, C. E. Enhanced spatial discrimination learning in rats following 5,7-DHT-induced serotonergic deafferentation of the hippocampus. *Brain Res.*, 518:61-66, 1990.
5. Amaral, D.G., Witter, M.P. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of the anatomical data. *Neuroscience*, 31:571-91, 1989.
6. Assaf, S.Y., Miller, J.J. The role of a raphe serotonin system in the control of septal unit activity and hippocampal desynchronization. *Neuroscience*, 3:539-550, 1978.
7. Baumgarten, H.G. Control of vigilance and behavior by ascending serotonergic systems. En: Zschocke, S., Speckmann, E.J. (Eds) *Basic Mechanisms of the EEG*. Birkhäuser Boston. 1993: 231-268.
8. Bland, B., Oddie, S.D. Anatomical, electrophysiological and pharmacological studies of ascending brainstem hippocampal synchronizing pathways. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 22:259-273, 1998.

9. Brasted, P.J., Humby, T., Dunnet, S.B., Robbins, T.W., Unilateral lesions of the dorsal striatum in rats disrupt responding in egocentric space. *J Neurosci*, 17:8919-1926, 1997.
10. Brazhnik, E.S., Vinogradova, O.S., Stafekhina, V.S., Kitchigina, V.F. Acetylcholine, theta rhythm and activity of hippocampal neurons in the rabbit.- I. Spontaneous activity. *Neuroscience*, 53:961-970, 1993.
11. Buhl, H.B., Schwerdtfeger, K.W., Germroth, P. New anatomical approaches to reveal afferent and efferent hippocampal circuitry. En: Chan-Palay, V. and Köhler, C. H. (Eds.). *The hippocampus*. New Vistas. Alan R. Liss, Inc. USA. 1989:71-83.
12. Buhot, M.C., Patra, S.K., Naili, S. Spatial memory deficits following stimulation of hippocampal 5-HT_{1B} receptors in the rat. *Eur. J. Pharmacol.*, 285:221-228, 1995.
13. Bures, J., Petran, M., Zachar, J. Electrophysiology of subcortical structures. En: Josef Holubar, J. and Ipser, A. (Eds.). *Electrophysiological methods in biological research..* Academia Publishing House of Czechoslovak Academy of Sciences, Prague. Academic Press, New York, 1967:609, 1967.
14. Buszaki, G. The hippocampo-neocortical dialogue. *Cereb. Cortex*, 6:81-92, 1996.
15. Buszaki, G., Leung, L.S. and Vanderwolf, C.H. Cellular bases of hippocampal EEG in the behaving rat. *Brain Res. Rev.*, 6:139-171, 1983.
16. Carli, M., Luschi, R., Garofalo, P., Samanin, R. 8-OH-DPAT impairs spatial but not visual learning in a water maze by stimulating 5-HT_{1A} receptors in the hippocampus. *Behav. Brain Res.*, 67: 67-74, 1995.
17. Drakew, A., Muller, M, Gahwiler, B.H., Thompson, S.M., Frotscher, M. Spine loss in experimental epilepsy: quantitative light and electron microscopic analysis of intracellularly stained CA3 pyramidal cells in hippocampal slice cultures. *Neuroscience*, 70:31-45, 1996.

18. Edwards, F. A. Anatomy and electrophysiology of fast central synapses lead to a structural model for long-term potentiation. *Physiol. Rev.*, 75:759-787, 1995.
19. Eichenbaum, H., Otto, T. The hippocampus-what does it do? *Behav. Neural Biol.*, 57: 2-36, 1992.
20. Feria-Velasco, A. and Karnovsky, M.J. Optima preservación ultraestructural del sistema nervioso central por perfusión intravascular con glutaraldehído. *Arch. Inv. Med.*, 1:201-220, 1970.
21. Fibiger, H.C., Campbell, B.A. The effect of p-cholophenylalanine on spontaneous locomotor activity in the rat. *Neuropharmacology*, 10:25-32, 1971.
22. File, S.E., Gonzalez, L.E., Andrews, N. Comparative study of pre- and postsynaptic 5-HT_{1A} receptor modulation of anxiety in two ethological animal tests. *J. Neurosci.*, 16:4810-4815, 1996.
23. Fletcher, P.J., Korth, K.M. Selective destruction of brain serotonin neurons by 5.7-dihydroxytryptamine increases responding for a conditioned reward. *Psicopharmacology*, 147:291-299, 1999.
24. Gall, C., Moore, R.Y. Distribución of enkephalin, substance P, tyrosine hydroxylase, and 5-hydroxytryptamine immunoreactivity in the septal region of the rat. *J. Comp. Neurol.*, 196:377-389, 1984.
25. Gerson, S.C., Baldessarini, R.J. Motor effects of serotonin in the central nervous system. *Life. Sci.*, 27:1435-1451, 1980.
26. Givens, B., Olton, S.D. Local modulation of basal forebrain: effects on working and reference memory. *J. Neurosci.*, 14:3578-3587, 1994.
27. González-Burgos, I., Tapia-Arizmendi, G. and Feria-Velasco, A. Golgi method without osmium tetroxide for the study of the central nervous system. *Biotech. Histochem.*, 67:288-296, 1992.
28. Gravrilov, V.V., Wiener, Y.S., Berthoz, A. Enhanced hippocampal theta EEG during whole body rotations in awake restrained rats. *Neurosci. Lett.*, 197:239-241, 1995.

29. Gray, E.G. Electron microscopy of synaptic contacts on dendritic spines of the cerebral cortex. *Nature*, 183:1592-4, 1959.
30. Green, E., McNaughton, J., Barnes, C.A. Exploration-dependent modulation of evoked responses in fascia dentate: dissociation of motor, EEG, and sensory factors and evidence for synaptic efficacy change. *J. Neurosci.*, 10:1455-1471, 1990.
31. Greenough, W.T., Bailey, C.H. The anatomy of a memory: Convergence results across a diversity of tests. *Trends Neurosci.*, 11:142-47, 1988.
32. Halasy, K., Miettinen, R., Szabot, E., Freund, T. GABAergic interneurons are the major postsynaptic targets of median raphe afferents in the rat dentate gyrus. *Eur. J. Neurosci.*, 4:144-153, 1992.
33. Harris, K.M. Structure, development, and plasticity of dendritic spines. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 9:343-348, 1999.
34. Harris, K.M. Calcium from internal stores modifies dendritic spine shape. *PNAS*, 96:12213-12215, 1999a.
35. Harris, K.M., Kater, S.B. Dendritic spines: cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function. *Annu. Rev. Neurosci.*, 17:341-71, 1994.
36. Hikosaka, O., Miyashita, K., Miyachi, S., Sakai, K., Lu, X. Differential roles of the frontal cortex, basal ganglia, and cerebellum in visuomotor sequence learning. *Neurobiol. Learn. Mem.*, 70:137-149, 1998.
37. Hillegaart, V. Functional topography of brain serotonergic pathways in the rat. *Acta Physiol. Scand. Suppl.*, 142:1-54, 1991.
38. Hillered, L., Persson, L., Bolander, H.G., Hallstrom, A., Ungersted, U. Increased extracellular levels of ascorbate in the striatum after middle cerebral artery occlusion in the rat monitored by intracerebral microdialysis. *Neurosci. Lett.*, 95:286-90, 1988.

39. Holscher, C. and Smidt, J.W. Quinolinic acid lesion of rat entorhinal cortex pars medialis produces. *Behav. Brain. Res.*, 63:187-194, 1994.
40. Hong, Y. And Krnjevic, M. Serotonin blocks the facilitatory action of muscarinic and nicotinic agents in the hippocampus *in vivo*. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 67:47-53, 1989.
41. Hopfield, J.J. Pattern recognition computation using action potential timing for stimulus representation. *Nature*, 376:33-36, 1995.
42. Jacobs, B.L., Simm, S.M., Ruimy, D.D., Trulson, M.E. A quantitative rational model for studying serotonergic function in rat. *Brain Res.*, 124:271-281, 1977.
43. Jarrad, E.J. On the role of the hippocampus in learning and memory in the rat. *Behav. Neural. Biol.*, 60:9-26, 1993.
44. Jensen, O., Lisman, J.E. Position reconstruction from an ensemble of hippocampal place cells: contribution of theta phase coding. *J. Neurophysiol.*, 83:2602-2609, 2000.
45. Kesner, R.P., Hunt, M.E., Williams, J.M., Long, J.M. Prefrontal cortex and working memory for spatial response, spatial location, and visual object information in the rat. *Behav. Neurosci.*, 103:956-961, 1996.
46. Kinney, G.G., Kocsis, B., Vertes, R.P. Medial septal unit firing characteristics following injections of 8-OH-DPAT into the median raphe nucleus. *Brain Res.*, 708:116-122, 1996.
47. Klimesh, W., Dopplemayer, M., Russegger, H., Pachinger, T. Theta band power in the human scalp EEG and the encoding of new information. *Neuroreport*, 7:1235-1240, 1996.
48. Lacaille, J.C., Kunkel, D.D., Chwartzkroin, A.P. Electrophysiological and morphological characterization of hippocampal interneurons. En: Chan-Palay, V. and Köhler, C. H. (Eds.). *The hippocampus*. New Vistas. Alan R. Liss, Inc. USA. 1989:287-305.

49. Lamberti, Y. And Gower, A.J. Cholinergic modulation of spatial learning in mice in a Morris-type water maze. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, 309:5-19, 1991.
50. Leung, L.S., Yim, C.C. Intrinsic membrane potential oscillations in hippocampal neurons *in vitro*. *Brain Res.*, 553:261-274, 1991.
51. Llinás, R.R., The intrinsic electrophysiological properties of mammalian neurons: insight into central nervous system. *Science*, 242:1654-1664, 1988.
52. Majewska, A. Function of dendritic spines. *Neuroscientists*, 7:387-395, 2001.
53. McDonald J.R. and White, M.N. A triple dissociation of memory systems: Hippocampus, amygdala, and dorsal striatum. *Behav. Neurosci.*, 107:3-22, 1993.
54. McDonal, J.R. and White, M.N. Parallel information processing in the water maze: evidence for independent memory systems involving dorsal striatum and hippocampus. *Behav. Neural Biol.*, 61:260-270, 1994.
55. McDonald, J.R. and White, M.N. Hippocampal and nonhippocampal contributions to place learning in rats. *Behav. Neurosci.*, 109:579-593, 1995.
56. McNamara, R.K. And Skelton, R.W. The neuropharmacological and neurochemical bases of place learning in the Morris water maze. *Brain Res. Rev.*, 18:33-49, 1993.
57. McNaughton, B.L., Barnes, C.A. O'Keffe, J. The contributions of position, direction, and velocity to single unit activity in the hippocampus of freely-moving rats. *Exp. Brain Res.*, 52:41-49, 1983.
58. McNaughton, N., Azmitia, E.C., Williams, J.H., Buchan, A. and Gray, J.A. Septal elicitation of hippocampal theta rhythm after localized de-afferentation of serotonergic fibers. *Brain Res.*, 200:259-269, 1980.
59. Mercugliano, M., Nguyen, H,m Djali, S., Lucki, I. Developmental alterations in 5-hydroxytryptamine concentration and turnover after treatment of neonatal rats with 5,7-Dihydroxytryptamine. *Neurobiol. Learn. Mem.*, 65:163-76, 1996.

60. Moghadam, M., Bures, J. Contribution of egocentric spatial memory to place navigation of rats in Morris water maze. *Behav. Brain Res.*, 78:121-129, 1996.
61. Molinari, M., Leggio, M.G., Solida, A, Ciorra, R., Misciagna, S., Silveri, M.C., Petrosini, L. Cerebellum and procedural learning: Evidence from focal cerebellar lesions. *Brain*, 120:1753-1762, 1997.
62. Monmaur, P. and Thomson, M.A. Spatial distribution of hippocampal-dentate theta rhythm following colchicine injection into the hippocampal formation of the rat. *Brain Res.*, 365:269-277, 1986.
63. Morilak, D.A., Garlow, S.J., Ciaranello, K.D. Immunocytochemical localization and description of neurons expressing serotonin 2 receptors in the rat brain. *Neuroscience*, 54:701-717, 1993.
64. Morris, R.G. M., Davis, S. and Butcher, S.P. Hippocampal synaptic plasticity and NMDA receptors: a role in information storage?. *Pill. Trans. R. Soc. Lond.*, 329:187-204, 1990.
65. Murtha, J.E.S. and Pappas, A.B. Neurochemical, histopathological and mnemonic effect of combined lesions of the medial septal and serotonin afferents to the hippocampus. *Brain Res.*, 651:16-26, 1994.
66. Mushiake, H., Kodama, T., Shima, K., Yamamoto, M., Nakahama, H. Fluctuations in spontaneous discharge of hippocampal theta cells during sleep-waking states and PCPA-induced insomnia. *J. Neurophysiol.*, 60:925-939, 1988.
67. Nilsson, O.G., Strecker, R.E., Daszuta, A. and Björklund, A. Combined cholinergic and serotonergic denervation of the forebrain produced severe deficits in a spatial learning task in the rat. *Brain Res.*, 453:235-246, 1988.
68. Nitz, D.A., McNaughton, B.L. Hippocampal EEG and unit activity responses to modulation of serotonergic median raphe neurons in the freely behaving rat. *Learn. Mem.*, 6:153-167, 1999.
69. Noback, Ch.R. and Demarest, R.J. The human nervous system. Basic principles of neurobiology. McGraw Hill. USA 1975.

70. Oddie, S.D., Bland, H.B. Hippocampal formation theta activity and movement selection. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 22:221-231, 1998.
71. O'Keefe, J., Dostrovsky, J. The hippocampus as a spatial map: preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res.*, 34:171-175, 1971.
72. O'Keefe, J., Recce, M.L., Phase relationship between hippocampal place units and the EEG theta rhythm. *Hippocampus*, 3:317-330, 1993.
73. Oleskevich, S., Descarries, L., Watkins, K.C., Sequela, P., Daszuta, A. Ultrastructural features of the serotonin innervation in adult rat hippocampus: an immunocytochemical description in single and serial thin sections. *Neuroscience*, 42:777-791, 1991.
74. Oliveira, M.G., Bueno, F.A., Pomarico, E., Guliano, B.E. Strategies used by hippocampal- and caudate-putamen-lesioned rats in a learning task. *Neurobiol. Learn. Mem.*, 68:32-41, 1997.
75. Olpe, H.R., Klebs, K. Küng, E., Campiche, P., Glatt, A., Ortmann, R., D'Amato, F., Pozza, M.F., Mondadori, C. Cholinomimetics induce theta rhythm and reduce hippocampal pyramidal cell excitability. *Eur. J. Pharmacol.*, 142:275-283, 1987.
76. Olton, S.D., Walker, A.J., Gage, H.G. Hippocampal connections and spatial discrimination. *Brain Res.*, 139:295-308, 1976.
77. Olton, D.S., Becker, J.T., Handelman, G.E. Hippocampus, space and memory. *Behav. Brain Sci.*, 2:313-365, 1979.
78. Olvera-Cortés, E., Pérez-Vega, M.I., Barajas-López, G., Del Angel-Meza, A.R., González-Burgos, I. and Feria-Velasco, A. Place learning impairment in chronically tryptophan-restricted rats. *Nutr. Neurosci.*, 1:223-235, 1998.

79. Olvera-Cortés, E., Barajas-Pérez, M., Morales-Villagrán, A., González-Burgos, I. Cerebral serotonin depletion induces egocentric learning improvement in developing rats. *Neurosci. Lett.*, 313:29-32, 2001.
80. Packard, M.G., McGaugh, J.L. Inactivation of hippocampus or caudate nucleus lesions with lidocaine differentially affects expression of place and response learning. *Neurobiol. Learn. Mem.*, 65:65-72, 1996.
81. Pascual-Leone, A., Grafman, J., Clark, K., Stewart, B.A., Massaquoi, S., Lou, J.S. Procedural learning in Parkinson's disease and cerebellar degeneration. *Ann. Neurol.*, 34:594-602, 1993.
82. Paxinos, G. and Watson, Ch. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 2nd. ed. Academic Press. USA. 1986.
83. Pérez-Vega, M.I., Feria-Velasco, A., González-Burgos, I. Prefrontocortical serotonin depletion results in plastic changes of prefrontocortical pyramidal neurons, underlying a greater efficiency of short-term memory. *Brain Res. Bull.*, 53:291-300, 2000.
84. Pitler, T.A., Alger, B.E. Cholinergic excitation of GABAergic interneurons in the rat hippocampal slice. *J Physiol.*, 450:127-142, 1992.
85. Poucet, B. Spatial cognitive maps in animals: new hypotheses on the structure and neural mechanism. *Psychol. Rev.*, 100:63-182, 1993.
86. Raghavachari, S., Kahana, M.J., Hirsuto, D.S., Caplan, J.B., Kirschen, M.P., Bourgeois, B., Madsen, J.R., Lisman, J.E. Gating of human theta oscillations by a working memory task. *J. Neurosci.*, 21:3175-3183, 2001.
87. Richter-Leving, G. and Segal, M. The effects of serotonin depletion raphe grafts on hippocampal electrophysiology and behavior. *J. Neurosci.*, 11:1585-1596, 1991.
88. Richter-Leving, G. and Segal, M. Spatial performance is severely impaired in rats with combined reduction of serotonergic and cholinergic transmission. *Brain Res.*, 447:404-407, 1989.

89. Richter-Levin, G., Segal, M. Effects of serotonin releasers on dentate granule cell excitability in the rat. *Exp. Brain Res.*, 82:199-207, 1990.
90. Richter-Levin, G., Greenberger, V. and Segal, M. Regional specificity of raphe graft induce-recovery of behavioral functions impaired by combined serotonergic/cholinergic lesions. *Exp. Neurol.*, 121:256-260, 1993.
91. Riekkinen, P.Jr., Sirviö, J., Riekkinen, P. Interaction between raphe dorsalis and nucleus basalis magnocellularis in spatial learning. *Brain Res.*, 527:342-345, 1990.
92. Riekkinen, P.Jr., Jäkälä, P., Sirviö, J., Riekkinen, P. The effects of increased serotonergic and decreased cholinergic activities on spatial navigation performance in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 39:25-29, 1991.
93. Robbins, T.W., Everitt, B.J., Muir, J.L., Harrison, A. Understanding the behavioural functions of neurochemically defined arousal systems. *IBRO News*, 20:7, 1992.
94. Robinson, S.E. Effect of specific serotonergic lesions on colinergic neurons in the hippocampus, cortex and striatum. *Life Sci.*, 32:345-353, 1983.
95. Sabatini, B.L., Maravalland, M., Svodoba, K. Ca²⁺ signaling in dendritic spines. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 11:349-356, 2001.
96. Schicorski, T., Stevens, C., Quantitative fine structural analysis of olfactory cortical synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:4107-12, 1999.
97. Segal, M. Serotonin modulation of hippocampal activity. En: Chan-Palay, V. and Köhler, C. H. (Eds.). *The hippocampus*. New Vistas. Alan R. Liss, Inc. USA. 1989: 307-315.
98. Segal, M., Serotonin attenuates a slow inhibitory postsynaptic potential in rat hippocampal neurons. *Neuroscience*, 36:631-641, 1990.
99. Segal, M. Rapid plasticity of dendritic spine: hints to possible functions? *Prog. Neurobiol.*, 63:61-70, 2001.

100. Sharp, E.P., Green, C. Spatial correlates of firing patterns of single cells in the subiculum of freely moving rat. *J. Neurosci.*, 14:2339-2356, 1994.
101. Shen, Y., Specht, S.M., De Saint-Ghislain, I. and Li, R. The hippocampus: A biological model for studying learning and memory. *Prog. Neurobiol.*, 44:485-496, 1994.
102. Shepherd, G.M. *The synaptic organization of the brain*. New York, NY: Oxford Univ. Press. 4th edition, 1998.
103. Skaggs, W.E., McNaughton, B.L., Wilson, M.A., Barnes, C.A., Theta phase precession in hippocampal neuronal populations and the compression of temporal sequences. *Hippocampus*, 6:149-172, 1996.
104. Song, J.H., Shin, S.H., Ross, G.M. Oxidative stress induced by ascorbate causes neuronal damage in an in vitro system. *Brain Res.*, 895:66-72, 2001.
105. Staübli, U. and Xu, B. Effects of 5-HT₃ receptor antagonism on hippocampal theta rhythm, memory, and LTP induction in the freely moving rat. *J. Neurosci.*, 15:2445-2452, 1995.
106. Stawinska, U., Kasicki, S. The frequency of rat's hippocampal theta rhythm is related to the speed of locomotion. *Brain Res.*, 796:2327-2331, 1998.
107. Streckler, T., Sargal, A. The role of serotonergic-cholinergic interactions in the mediation of cognitive behavior. *Behav. Brain Res.*, 67:165-199, 1995.
108. Stubley-Weatherly, L., Harding, W.J., Wright, W.J. Effects of discrete kainic acid-induced hippocampal lesions on spatial and contextual learning and memory in rats. *Brain Res.*, 716:29-38, 1996.
109. Törk. Anatomy of the serotonergic system. In: Whitaker-Azmitia, P.M., Peroutka S.J. (Eds.). *The Neuropharmacology of serotonin*, Ann NY Acad. Sci. 1990:194-205.
110. Trullier, O., Wiener, Y.S., Berthoz, A. and Meyer, J.A. Biologically based artificial navigation systems: Review and prospects. *Prog. Neurobiol.*, 51:483-544, 1997.

111. Vanderwolf, C.H., Baker, G.B. Evidence that serotonin mediates non-cholinergic neocortical low voltage fast activity, non-cholinergic hippocampal rhythmical slow activity and contributes to intelligent behavior. *Brain Res.*, 374:342-356, 1986.
112. Vanderwolf, C.H. Near-total loss of 'learning' and 'memory' as a result of combined cholinergic and serotonergic blockade in the rat. *Behav. Brain Res.*, 23:43-57, 1987.
113. Vanderwolf, C.H. Cerebral activity and behavior: control by central cholinergic and serotonergic systems. *Int. Rev. Neurobiol.*, 30:255-325, 1988.
114. Vanderwolf, C.H., Leung, L.W.S., Baker, G.B., Stewart, D.J. The role of serotonin in the control of cerebral activity: studies with 5,7-dihydroxytryptamine. *Brain Res.*, 504:181-191, 1989.
115. Vanderwolf, C.H., Baker, G.B., Dickson, C. Serotonergic control of cerebral activity and behavior: Models of dementia. In: Whitaker-Azmitia, P.M., Peroutka S.J. (Eds.). *The neuropharmacology of serotonin*. Ann NY Acad Sci, 1990:366-383.
116. Vertes, P.R. Brainstem modulation of the hippocampus. Anatomy, physiology and significance. En: Isaacson, R.L., Pribram, K.H. (Eds.). *The hippocampus*. Volume 4. Plenum Pres N.Y. and London, 1986.
117. Vertes, R.P., Kinney, G.G., Kocsis, B., Fortin, W.J. Pharmacological suppression of the medial raphe nucleus with serotonin_{1A} agonists, 8-OH-DPAT and Buspirone, produces hippocampal theta rhythm in the rat. *Neuroscience*, 60:441-451, 1994.
118. Vertes, R.P., Kocsis, B. Brainstem—diencephalo-septohippocampal systems controlling the theta rhythm of the hippocampus. *Neuroscience*, 81:893-926, 1997.

119. Viana Di Prisco, G., Albo, Z., Vertes, R.P., Kocsis, B. Discharge properties of neurons of the median raphe nucleus during hippocampal theta rhythm in the rat. *Exp. Brain Res.*, 145:383-394, 2002.
120. Vinogradova, O.S. Expression, control, and probable, functional significance of neuronal theta-rhythm. *Prog. Neurobiol.*, 45:523-583, 1995.
121. Vinogradova, O.S., Kitchigina, V.F., Kudina, T.A., Zenchenko, K.I. Spontaneous activity and sensory responses of hippocampal neurons during persistent theta-rhythm evoked by median raphe nucleus blockade in rabbit. *Neuroscience*, 94:745-753, 1999.
122. Volpe, V.T., Hendrix, C.S., Park, D.H., Towle, A.C., Davis, H.P. Early post-natal administration of 5,7-dihydroxytryptamine destroys 5-HT neurons but does not affect spatial memory. *Brain Res.*, 589:262-267, 1992.
123. White, N.M., McDonald, J.R. Multiple parallel memory systems in the brain of the rat. *Neurobiol. Learn. Mem.*, 77:125-184, 2002.
124. Wiebe, S.P., Staübli, U. Recognition memory correlates of hippocampal theta cells. *J. Neurosci.*, 21:3955-3967, 2001.
125. Winson, J. Behaviorally dependent neuronal gating in the hippocampus. En: Isaacson, R.L., Pribram, K.H. (Eds.). *The hippocampus, Volume 4*. Plenum Press N.Y. and London, 1986:77-91.
126. White, M.N., Oulliete, C.M. Roles of movement and temporal factors in spatial learning. *Hippocampus*, 7:501-510, 1997.
127. Witter, P.M. Connectivity of the rat hippocampus. En: Chan-Palay, V., Köhler, C. H. (Eds.). *The hippocampus. New Vistas*. Alan R. Liss, Inc. USA. 1989:53-69.
128. Ylinen, A., Soltész, I., Bragin, A., Penttonen, M., Sik, A., Buszaki, G. Intracellular correlates of theta rhythm in hippocampal pyramidal cells, granule cells and basket cells. *Hippocampus*, 5:78-90, 1995.

129. Yusa, T. Increase extracellular ascorbate release reflects glutamate re-uptake during the early stage of reperfusion after forebrain ischemia in rats. *Brain Res.*, 897:104-113, 2001.

ANOTACIONES Y COMENTARIOS

PUBLICACIONES

Cerebral serotonin depletion induces egocentric learning improvement in developing rats

Esther Olvera-Cortés^{a,*}, Maricruz Barajas-Pérez^a,
Alberto Morales-Villagrán^b, Ignacio González-Burgos^a

^aLaboratorio de Psicobiología, Centro de Investigación Biomédica de Michoacán, Instituto Mexicano del Seguro Social, A.P. 7-70; C.R. 58261, Morelia, Michoacán Mexico

^bCentro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco Mexico

Received 24 July 2001; received in revised form 23 August 2001; accepted 23 August 2001

Abstract

Egocentric learning ability of developing serotonin (5-HT)-depleted female rats was evaluated in the Morris maze test. 5-HT depletion was accomplished by a unique intracisternal injection of 5,7-dihydroxytryptamine at 21 days-old. A first behavioral test was applied before the lesion procedure. The animals were thereafter challenged to resolve the same test at 40 and 60 days-old. 5-HT depletion caused a dual effect on the rats' egocentric learning ability, i.e. at 40 days; control rats learned the task while the experimental rats were unable to learn it. At 60 days, control animals were unable to learn the test, while the experimental rats showed a successful performance. These results strongly suggest that 5-HT neurotransmission is necessary for egocentric learning establishment and regulation. © 2001 Published by Elsevier Science Ireland Ltd.

Keywords: Spatial learning; Egocentric; Morris maze; Neurotransmitters; Serotonin; 5,7-Dihydroxytryptamine

Serotonin (5-HT) is strongly involved in the modulation of place learning ability after cholinergic system lesion. Impairments resulting from combining 5-HTergic and cholinergic depletion on place learning, have been shown to be more severe than those produced by cholinergic depletion alone; which also included impairments in the searching strategies displayed [12,13,17]. These results had been obtained both in reference memory tests using the Morris maze, and in working memory tests using the Olton radial maze. In both tests, 5-HT depletion alone was unable to produce any effect on place learning [11,12,15,16]. In other results, adverse effects on both place and cue learning tests following the application of 5-HT reuptake blockers and 5-HT agonists have been observed [3,4,17], while an enhancement in the Stone maze performance (a sequential T maze requiring learning of a series of right-left turns for resolving) by 5-HT depleted rats, has also been reported [1,13]. Altogether, these results suggest that 5-HT system may realize a differential learning modulation in regard to the nature of the information processed and, consequently, of the strategy used to solve the tasks too. Thus, the effect of

5-HT manipulations in different behavioral tests could be a result of the specific requirement of each behavioral test for a predominant searching strategy. In this sense, the learning enhancement observed in the Stone maze, which evaluate predominantly the use of egocentric information [1,11,13], implicates to 5-HT system in egocentric learning modulation. Accordingly, impairments in standard water maze test performance, i.e. predominance for egocentric strategies (in spite of the availability of environmental cues) by chronically tryptophan-restricted rats, have been reported [14]. Thus, a possible role for 5-HT in the egocentric learning ability modulation remains to be elucidated. In the present work, the egocentric learning ability by pharmacologically 5-HT-depleted rats in the Morris water maze was evaluated.

Sixty six female Sprague–Dawley rats, 21-days-old, maintained under standard laboratory conditions and light-dark cycles 12:12 h were used. The rats were distributed into three groups: one control (C) group ($n = 22$); one operated (O) group ($n = 22$); and one lesioned (L) group ($n = 22$). At 21-days-old, all rats were challenged to solve a pre-treatment test. Thereafter, the L rats received an intracisternal injection of 5,7-Dihydroxytryptamine (5,7-DHT, 10 μg of free base dissolved in 10 μl of saline solution with 2% ascorbic acid as antioxidant), under ketamine anesthesia (50 mg/kg). In

* Corresponding author. Tel./fax: +52-4-324-1610.

E-mail address: maesoico@yahoo.com (E. Olvera-Cortés).

order to avoid damage to catecholaminergic cells, the rats were also given 40 mg/kg (intraperitoneally) of pargyline dissolved in saline solution, 30 min before the application of 5,7-DHT. The O group was subjected only to the surgical procedure without the neurotoxin application. The same behavioral evaluation was additionally performed both at 40 and 60 days of age, for all groups. The behavioral tests were carried out using the Morris maze (130 cm diameter). The rats had to find a square sunken platform without the use of visuo-spatial cues. For this, the maze was rounded with a black curtain, and both the platform position and starting point were rotated 90° by turn into the maze, but maintained in spatial constant relationship between them in order to avoid the use of auditive cues by the rats. Five consecutive trials with an inter-trial period of 2 min were given to each animal. If the animal was not capable of finding the platform within 1 min, it was located onto the platform by the experimenter, where it remained for a 15 s period. The tests were video recorded and the escape latency was obtained from the records and analyzed using the Friedman ANOVA and the Wilcoxon post-hoc test. Once the '60 days-age' tests were accomplished, six rats from each group were decapitated and cerebral 5-HT content was measured using high pressure liquid chromatography determinations. For these determinations the ANOVA and Tukey's test were used for statistical comparisons.

The cerebral 5-HT content of L group was significantly less in comparison with that from C group (96.7%, $P = 0.01$). The O group also had less 5-HT but the difference was not significant, in regard to the C group (data not shown).

Intragroup comparisons of escape latencies between the first trial and all four subsequent trials showed that at 21-day-old, the rats from all three groups were unable to significantly reduce their swimming escape latency (Fig. 1A). However, at 40 days, the animals of group C reduced their escape latency from trial 2 to 5, while those from the group O showed a reduction in the escape latency in trials 3, 4 and 5. The L group rats were unable to reduce their escape latency on this age (Fig. 1B). At 60 days, the C group did not reduce their escape latency, while the O group showed a reduction in trials 2 and 3; the L group reduced their escape latency in trials 4 and 5 of training (Fig. 1C).

Intergroup comparisons of the escape latency in each of the trials were made per age. In this sense, there were no significant differences among groups at 21-days-old (Table 1). However, at 40 days of age the escape latency was longer for the L group in regard to the O group in trials 3, 4 and 5. The same was seen in trials 2 through 5 when L group values were compared to those from the C group (Table 1). At 60 days of age, the escape latency was less for the O group in regard to the C group in trials 3 and 4, and it was shorter on trials 2 through 5 for the L group when compared to the C group. Moreover, the escape latency for the L group was shorter in trials 1, 2, 4 and 5 in regard to the O group (Table 1). At this age, the L rats did not show a circling

swim pattern around the maze. Instead, they swam throughout the pool starting from the first trial.

In the present work, the effect of cerebral 5-HT depletion on egocentric learning ability was evaluated through female rats development by using the water maze. A greater sensitivity to changes in 5-HT activity for behavioral expression has been shown in female than in male rats [6]. Female rats show vaginal opening around 40 days. At adulthood, both the release of gonadotrophic hormones as well as estral cycle are modulated by the cerebral 5-HTergic activity, and prolonged anestrus periods produced by general 5-HT depletion, has been reported [5]. In addition, effects on non-

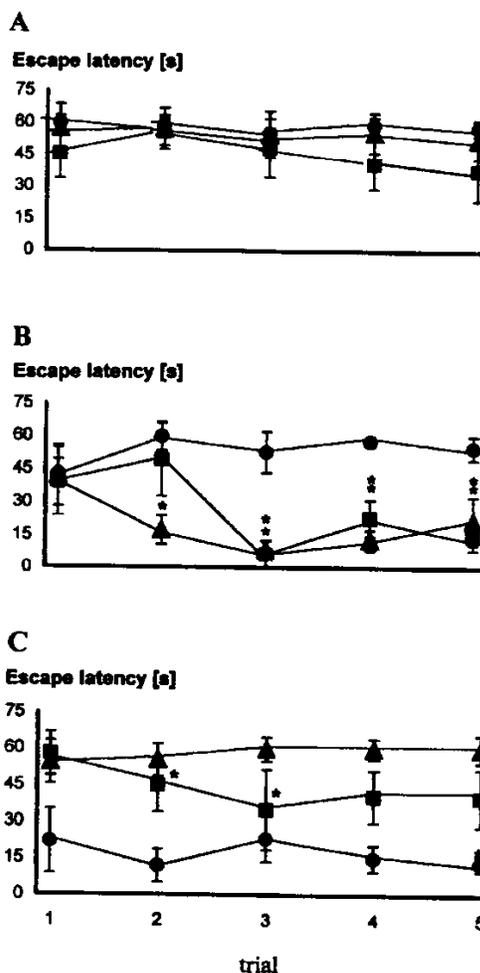


Fig. 1. Comparisons of the escape latencies displayed by the animals from the three groups studied, between the first and each of the following trials. Triangles, control group; squares, operated group; and circles, lesioned group. (A) 21 days of age, (B) 40 days of age, and (C) 60 days of age. Medians \pm Median standard error. * $P < 0.01$.

Table 1
Intergroup comparisons of escape latency (s)^a

Age	Group	Trial 1	Trial 2	Trial 3	Trial 4	Trial 5
21 days	Control	57.0 ± 11.2	57.5 ± 9.6	55.0 ± 10.8	56.0 ± 9.2	53.0 ± 9.2
	Operated	45.5 ± 11.7	56.0 ± 6.4	48.5 ± 13.8	24.7 ± 11.8	38.0 ± 13.8
	Lesion	60.0 ± 3.3	59.0 ± 4.6	55.5 ± 2.6	59.5 ± 3.6	58.5 ± 3.5
40 days	Control	42.0 ± 13.8	17.5 ± 6.4	8.5 ± 3.8	13.0 ± 4.7	22.0 ± 10.7
	Operated	39.5 ± 15.4	49.5 ± 16.6	13.0 ± 6.4	23.0 ± 8.2	15.0 ± 6.4
	Lesion	43.0 ± 6.5	60.0 ± 1.9 ^c	53.0 ± 9.4 ^{od}	58.0 ± 2.4 ^{od}	55.0 ± 5.3 ^{od}
60 days	Control	54.50 ± 8.8	55.5 ± 6.7	60.0 ± 4.8	60.0 ± 4.2	60.0 ± 5.7
	Operated	58.0 ± 9.0	45.0 ± 10.7	35.0 ± 16.5 ^b	40.5 ± 10.7 ^b	40.0 ± 11.7
	Lesion	22.0 ± 132 ^c	12.0 ± 6.7 ^{od}	23.0 ± 9.4 ^c	15.0 ± 5.4 ^{od}	13.0 ± 3.0 ^{od}

^a Median ± Median' standard error. $P \leq 0.01$.

^c Control Vs. lesioned.

^d Operated Vs. lesioned.

^b Control Vs. operated.

spatial strategies such as egocentric learning, has not been reported. Based on these, our study was conducted in female rats, and hormonal influences on the present findings can be discarded.

The results obtained showed a dual effect in regard to the age of testing. At day 40, the L group was unable to resolve the test, while both control groups successfully learned to find the platform. At 60 days, however, the C group was unable to learn the task. Two interpretations can be made for these findings: First, 5-HT depletion could lead to the retardation in egocentric learning ability maturation. This is based on the impaired behavioral performance observed in L rats at 40 days of age and on the enhancement occurred at 60 days. Thus, the results observed in the control animals at 40 days could correspond to those seen in experimental animals until 60 days of age. The second possibility is that 5-HT does sustain the egocentric learning ability. According to Whishaw, cholinergic lesions do not affect the ability to display cue or position responses (egocentric) to find the platform in the water maze [18], but combined 5-HT and acetylcholine lesions lead to impairments in both types of strategies [12]. It has also been reported that the cholinergic-hippocampal-based place learning memory system is still immature at 40-days-old [2]. The 5-HT lesion induced in the present work impeded the animals to learn the position of the platform using egocentric information at day 40. Because this impairment was evident without cholinergic lesion, we suggest that a 5-HT-dependent egocentric learning must exist, and that is functionally active before the establishment of the place learning memory system.

At 60 days of age, the control animals were unable to resolve the task, while the 5-HT-depleted animals learned it successfully. This is in agreement with evidences suggesting that 5-HT exerts a negative modulation on learning tests in which an egocentric learning component is present [1,13,14]. However, these findings can also be explained in view of the 5-HT-dependent egocentric learning proposed here. In this sense, both competitive and cooperative interactions between memory systems have been

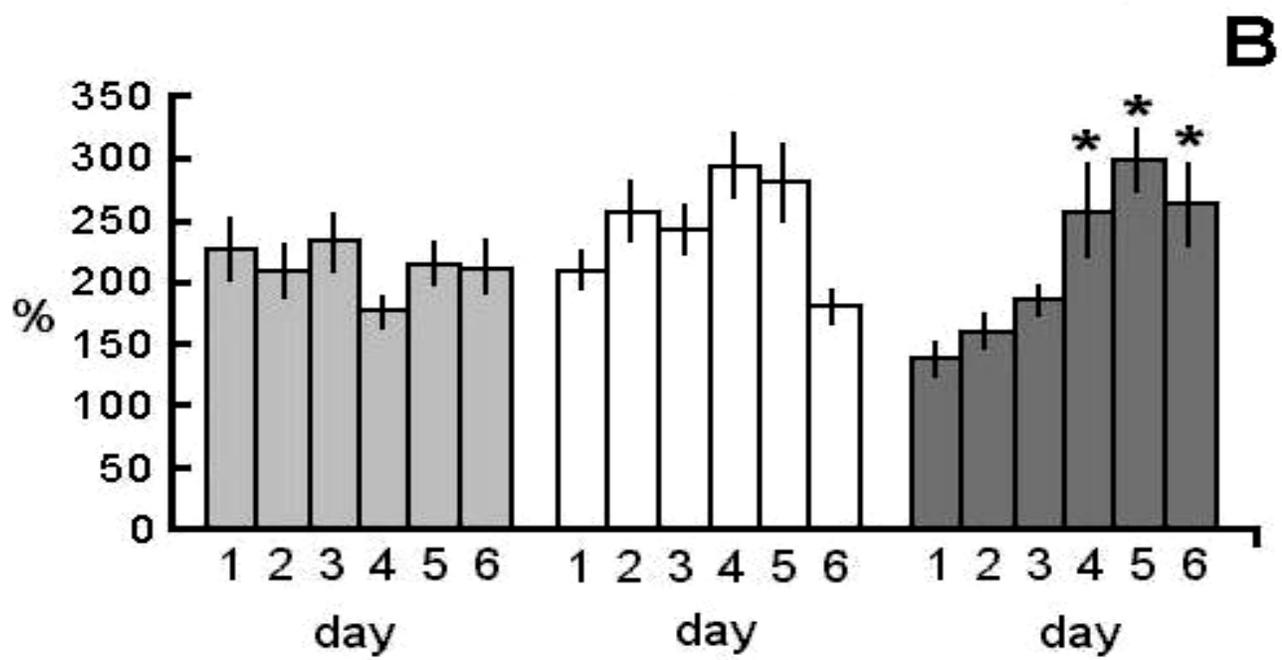
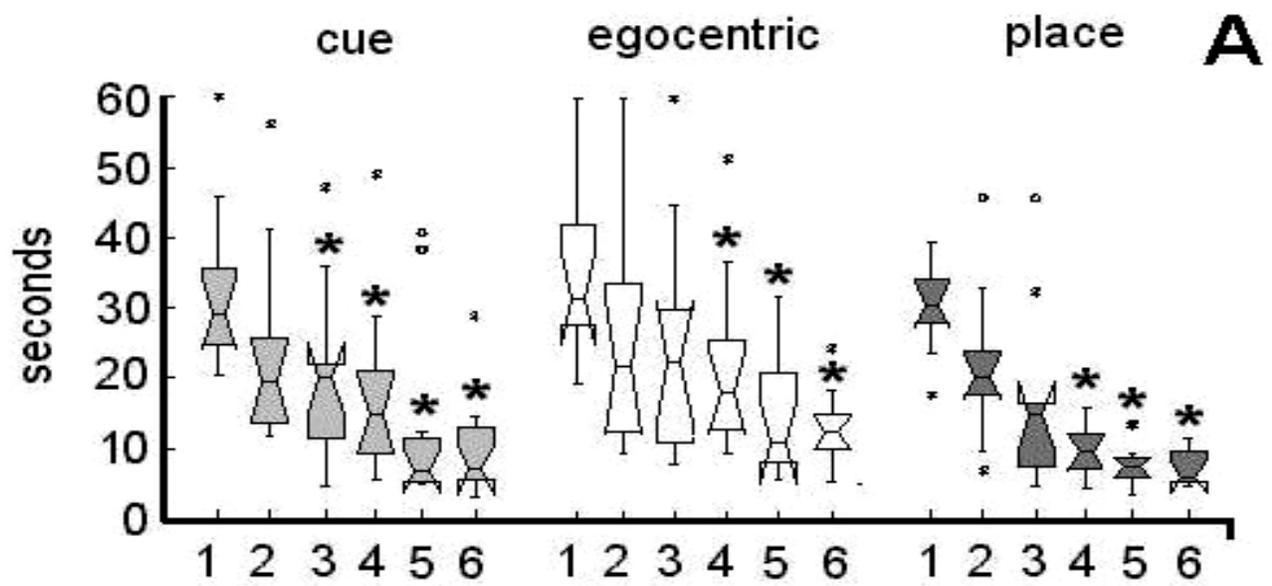
reported to occur in the resolution of spatial problems [8]. Thus, the behavioral inability to resolve the task by the control animals at 60 days of age, could be the result of competitive interactions between the neural system underlying the egocentric learning, putatively 5-HT-dependent, and that related with the place learning (i.e. the hippocampal system). In the rat, this latter is yet completely mature at 60 day of age [2]. Accordingly, the learning improvement seen in the 5-HT-depleted animals, could be the result of the loss of 5-HT-sustained egocentric learning ability which, in normal conditions, could exert a competitive interaction with the place learning system. This interpretation implies a putative capability to process egocentric information by the hippocampus, which has been traditionally related to allocentric learning processing. In this sense, the reliable establishment of egocentric-based maps has been postulated [10]. Furthermore, changes in the hippocampal EEG activity in relation to body rotations and consequently with proprioceptive information both in light and dark conditions, has been reported [7]. Moreover, egocentric information can be successfully incorporated into spatial maps under 5-HT-depletion conditions, and it can be used – although not into a map, in cholinergic-depletion conditions too. Altogether, these reports strongly suggest that a hippocampal ability for processing egocentric information could exist. The egocentric learning enhancement observed in the experimental group could be mediated by the place learning memory system. This is in agreement with the evidence that the enhancement in the Stone maze performance takes place after specific hippocampal 5-HT depletion in rats. Moreover, this effect can be attenuated by cholinergic denervation [13]. Likewise, the memory impairments caused by enhancement of 5-HTergic neurotransmission can be reversed by the application of 5-HT_{1A} antagonists in the hippocampal CA1 field [4]. In view of the present data, these evidences can be interpreted as the result of the hippocampal system managing egocentric information working without 5-HTergic interference.

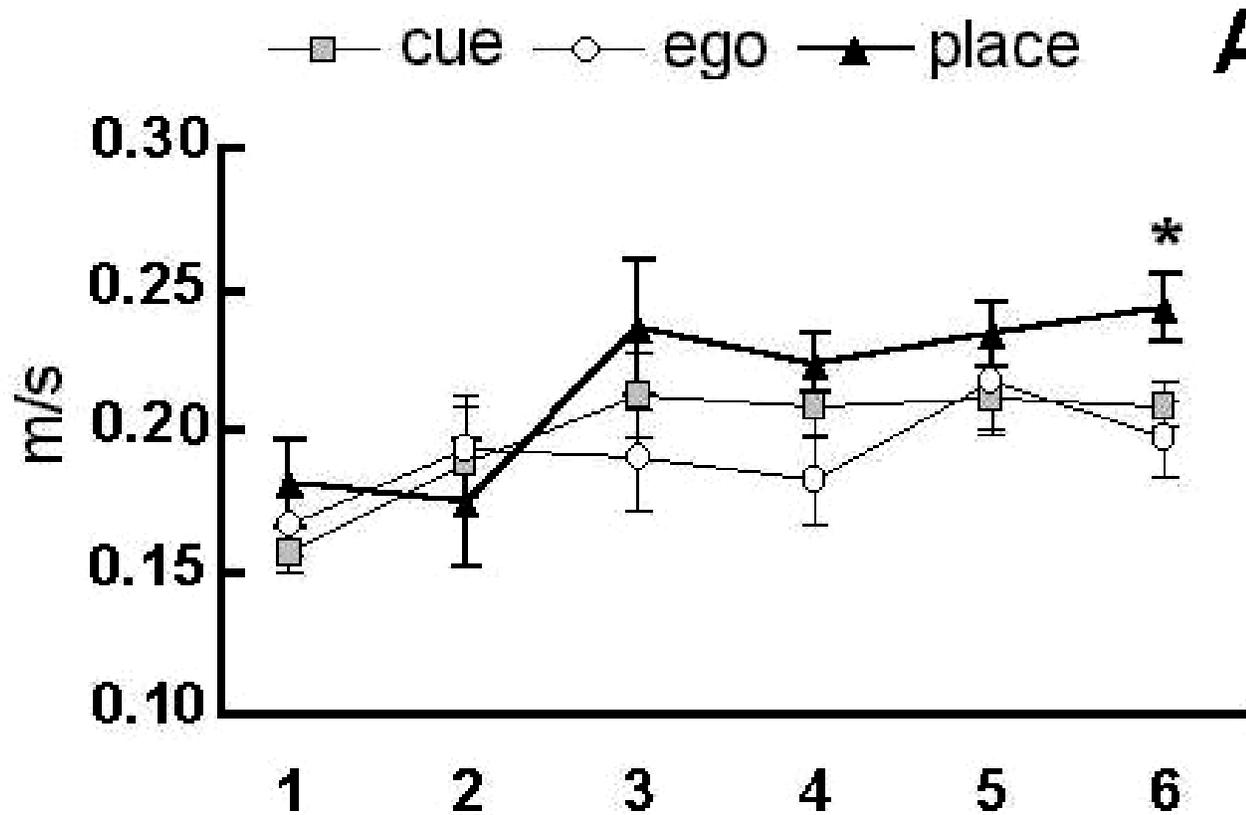
The latter data support the possibility of a parallel and

interactive processing of egocentric information by both, the 5-HTergic and cholinergic-hippocampal systems. In this sense, incorrect spatial behaviors have been reported to occur, when the information processed by two different memory systems compete [9]. Thus, the competitive interaction between two memory systems could explain both the behavioral inability observed in intact animals as well as the efficient improvement observed in the 5-HT-depleted rats, at 60-days-old. We strongly propose that the hippocampal cholinergic-dependent system sustaining place learning, and the putatively 5-HT-dependent system underlying egocentric learning here proposed; would be involved in such competitive interaction. This interpretation allows us to explain both the improvement of behavioral performance on egocentric information-using tests, as well as the apparently controversial 5-HT-dependence of non-cholinergic strategies expressed as more severe damage in place learning tasks, following combined 5-HTergic and cholinergic depletion.

In conclusion, the present results are in agreement with the notion that non-cholinergic spatial strategies, specifically the egocentric learning, could be sustained by the 5-HT system. Accordingly, 5-HT appears to be necessary for the establishment of egocentric learning at early age; while at latter ages, the egocentric learning 5-HT-depletion dependent enhancement may be mediated by the maturation of allocentric memory neural systems working without 5HT system interference.

- [1] Altman, J.H., Normile, J.H., Galloway, P.M., Ramirez, A. and Azmitia, C.E., Enhanced spatial discrimination learning in rats following 5,7-DHT-induced serotonergic deafferentation of the hippocampus, *Brain Res.*, 518 (1990) 61–66.
- [2] Blozovski, D., El hipocampo, *Mundo Científico*, 6 (1983) 516–523.
- [3] Buhot, M.C., Patra, K.S. and Naïli, S., Spatial memory deficits following stimulation of hippocampal 5-HT_{1B} receptors in the rat, *Eur. J. Pharmacol.*, 285 (1995) 221–228.
- [4] Carli, M., Luschi, R., Garolafo, P. and Samanin, R., 8-OH-DPAT impairs spatial but not visual learning in a water maze by stimulating 5-HT_{1A} receptors in the hippocampus, *Behav. Brain Res.*, 67 (1995) 67–74.
- [5] Del Angel-Meza, A.R., Ferla-Velasco, A., Ontiveros-Martínez, L., Gallardo, L., González-Burgos, I. and Beaz-Zárate, C., Protein- and tryptophan-restricted diets induce changes in rat gonadal hormone levels, *J. Nutr. Biochem.*, 4 (2001) 192–199.
- [6] Delgado, P.L., Charney, D.S., Price, L.H., Landis, H. and Heninger, G.R., Neuroendocrine and behavioral effects of dietary tryptophan restriction in healthy subjects, *Life Sci.*, 45 (1989) 2323–2332.
- [7] Gravirov, V., Enhanced hippocampal theta EEG during whole body rotations in awake restrained rats, *Neurosci. Lett.*, 197 (1995) 239–241.
- [8] Hirsh, R. and Kraiden, J., The hippocampus and the expression of knowledge, In R.L. Isaacson and N.E. Spear (Eds.), *The Expression of Knowledge: Neurobehavioral Transformations of the Information into Action*, Plenum Press, New York, 1982, pp. 213–241.
- [9] McDonald, R.J. and White, N.M., A triple dissociation of memory systems: hippocampus, amygdala and dorsal striatum, *Behav. Neurosci.*, 107 (1993) 3–22.
- [10] Moghadam, M. and Bures, J., Contribution of egocentric spatial memory to place navigation of rats in Morris water maze, *Behav. Brain Res.*, 78 (1996) 121–129.
- [11] Murtha, S.J.E. and Pappas, B.A., Neurochemical, histopathological and mnemonic effects of combined lesions of the medial septal and serotonin afferents to hippocampus, *Brain Res.*, 651 (1994) 16–26.
- [12] Nilsson, O.G., Strecker, R.E., Daszuta, A. and Björklund, A., Combined cholinergic and serotonergic denervation of the forebrain produces severe deficits in spatial learning task in the rat, *Brain Res.*, 453 (1998) 235–264.
- [13] Normile, J.H., Jenden, J.D., Kuhn, M.D., Wolf, A.W. and Altman, J.H., Effects of combined serotonin depletion and lesions of the nucleus basalis magnocellularis on acquisition of a complex spatial discrimination task in the rat, *Brain Res.*, 536 (1990) 245–250.
- [14] Olvera-Cortés, E., Pérez-Vega, M.I., Barajas-López, G., Del Angel-Meza, A.R., González-Burgos, A.R. and Ferla-Velasco, A., Place learning impairment in chronically tryptophan-restricted rats, *Nutr. Neurosci.*, 1 (1998) 223–235.
- [15] Richter-Levin, G., Greenberger, V. and Menahem, S., Regional specificity of raphe graft-induced recovery of behavioral functions impaired by combined serotonergic/cholinergic lesions, *Exp. Neurol.*, 121 (1993) 256–260.
- [16] Riekkinen, P.J., Sirviö, J. and Riekkinen, P., Interaction between raphe dorsalis and nucleus basalis magnocellularis in spatial learning, *Brain Res.*, 527 (1990) 342–345.
- [17] Riekkinen, P.J., Jäkälä, P., Sirviö, J. and Riekkinen, P., The effects of increased serotonergic and decreased cholinergic activities on spatial navigation performance in rats, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 39 (1991) 25–29.
- [18] Whishaw, I.Q., Cholinergic receptor blockade in the rat impairs locale but not taxon strategies for place navigation in a swimming pool, *Behav. Neurosci.*, 99 (1985) 979–1005.



A**B**